HAL
open science

Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés

Bernard B. Monties

▶ To cite this version:

Bernard B. Monties. Les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Gauthier-Villard, 345 p., 1980, 2-04-010480-1. hal-02859796

HAL Id: hal-02859796
https://hal.inrae.fr/hal-02859796v1

Submitted on 8 Jun 2020

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.

‘ReDoc ®’: Recueils documentaires,

bases numériques de données et de connaissances INRA.

Bernard Monties

LES POLYMERES VEGETAUX :

Second volume - part 1 :

‘LIGNINS’

clic here for a 'short survey': introductive cyle

' Bibiographic updating '

‘Mise à jour bibliographique’

de

‘LES POLYMERES VEGETAUX ... ’

Bordas 1980 - Gauthier-Villars (épuisé)

A second cyle of hyperlinks, in blue... , illustrates the evolution of the concept of 'lignin self-organisation' and of knowledge transmission according to '**ReDoc**', see also shown in the **part 2** of this **Second *volume*** ; clic here to start !

clic here for the next

Présentation du fichier, file, : ‘Les polymères végétaux, second volume : part 1’

Ce fichier numérique assemble les 176 pages de 7 chapitres extraits d’un livre ‘ancien’, publié en 1980, et 16 revues plus récentes, 299 pages, centrés sur le thème ‘Lignines, parois cellulaire et produits lignifiés’ (fig.). Ce ‘montage informatique’ permet de mettre à jour les données et connaissances de données et d’en suivre l’évolution spécifique. Le cadre des procédures et bases documentaires ReDoc, illustré en ‘part 2’, permet des ‘mise à jour bibliographique’ personnalisées bien plus générales. Le format pdf retenu ici permet les copié- collés, accélère les révisions de fichiers après recherches sur ‘mot clés’ trouvés dans les textes et références par moteurs de recherche. Cela n’affecte hélas pas la compréhension des concepts, difficulté débattue dans la revue numérisée ici n° 5. La fenêtre ‘Recherche PDF’ (fig) montre le résultat d’une telle recherche sur le concept d’hétérogénéité conduite sur deux d’entre des ‘mots clés’ correspondant possibles, ici français et anglais abrégés (*) : autre difficulté pratique, revue déjà aussi en n° 5.

This numeric file assemble the 176 pages of 7 chapters extracted from an ‘old’ book, 1980 edition, and 16 more recent reviews, 299p., concerning the theme ‘Lignins, lignified cell walls and products’ (fig.). This ‘informatic way’ allows to update as survey the specific evolution of both data and knowledges. The frame of the ReDoc procedures and bases, illustrated in ‘part 2’, allows much more extended personal updating. The pdf format here chosen, allows copy-paste procedures, make faster the file’s revisions after researches of key-word found in texts and references by ‘research motors’ without alas however the understanding of concepts, problem soon debated in the numerized review, number 5. The ‘Recherche PDF’ window (fig) shows the result of such a research on the concept of heterogeneity based on two of some possible related ‘key words’, french and english abridged (*) : another practical problem also soon reviewed in n° 5

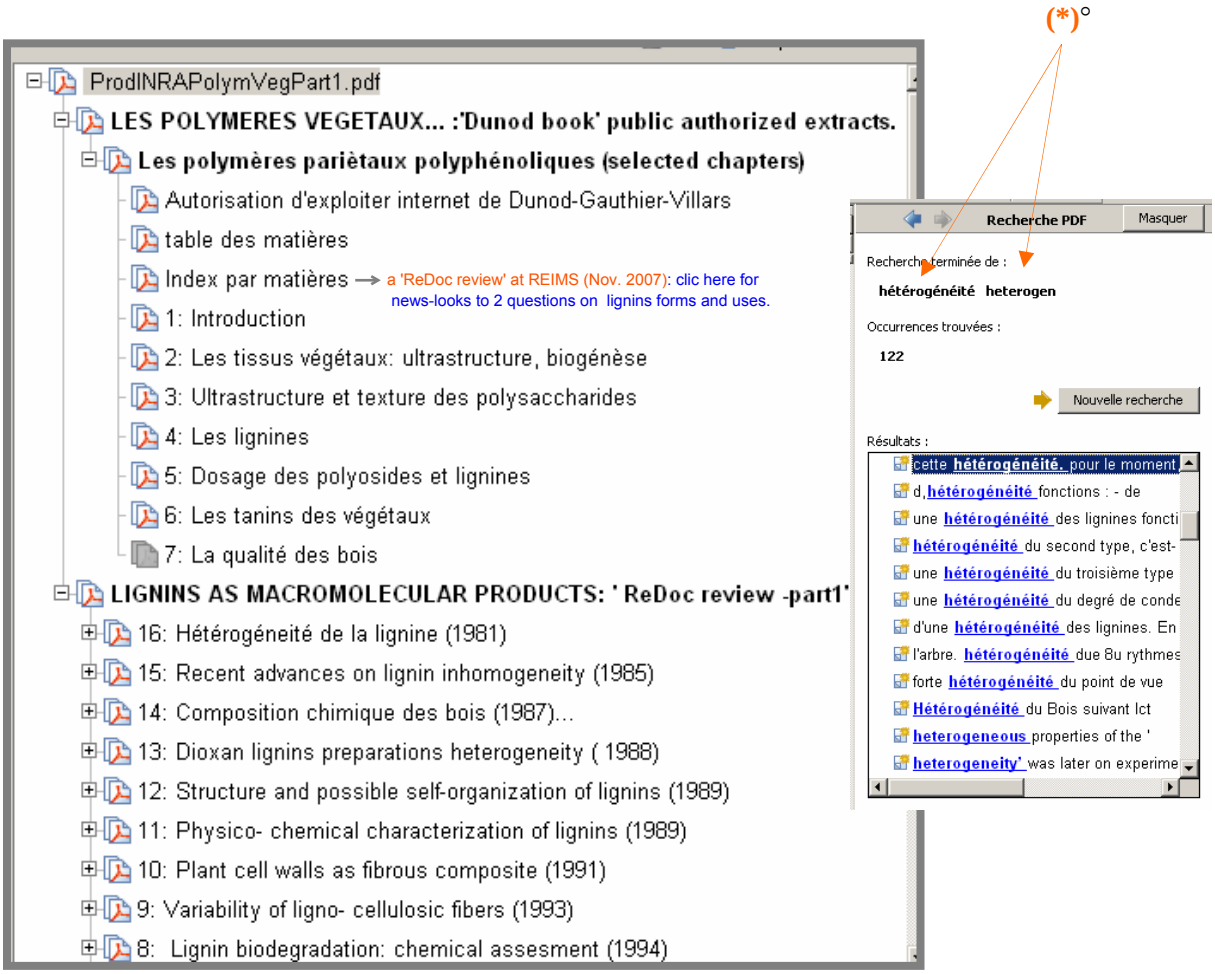


Table des matières (fenêtre ‘Recherche’):
chaque ‘cible’ est accessible par ‘simple clic gauche’ sur son titre surligné via les ‘signets actifs’ ouvrant vers le contenu du sous- paragraphe.

Table of content (‘Research’ window):
each ‘item’ is open by ‘single left clic’ on its overlined title via the ‘active bookmarks’ opening then the sub-section content.

'ReDoc ®': Recueils documentaires,

bases numériques de données et de connaissances INRA.

Bernard Monties

LES POLYMERES VEGETAUX

Second volume , part 1 :

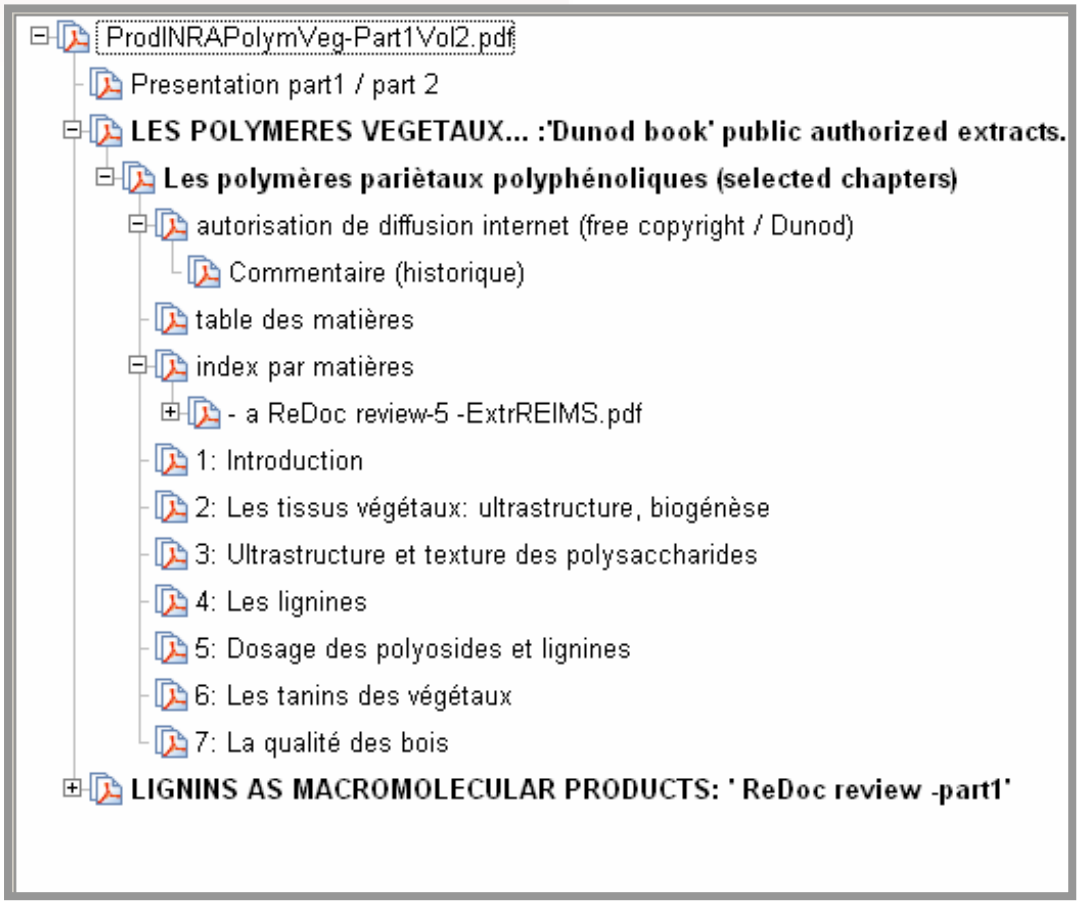
'Mise à jour bibliographique'

de

'LES POLYMERES VEGETAUX ... '

Bordas 1980 - Gauthier-Villars (épuisé)

clic here for the next



BIOCHIMIE APPLIQUEE

Collection dirigée
par Claude Costes

Bernard Monties

A.M. Catesson, J.C. Roland, F. Barnoud, J.P. Joseleau, M.T. Tollier,
C. Mercier, J.F. Thibaut, M. Metche, G. de Lestang-Bremond, G. Janin

LES POLYMERES VEGETAUX

Polymères pariétaux et alimentaires non azotés

clic here for
the next

PAROIS COMPOSITION
ALIMENTS FIBRES
CYTOCHIMIE
DOSAGE

gauthier-villars

Exemplaire d'auteur
(Rte biblio birea

Bernard Monties

A.M. Catesson, J.C. Roland, F. Barnoud, J.P. Joseleau, M.T. Tollier, C. Mercier, J.F. Thibaut, M. Metche, G. de Lestang-Bremond, G. Janin

clic here for the next

LES POLYMERES VEGETAUX

Ce fichier présente les copies autorisées de six des chapitres du livre original épuisé; les autres chapitres, voir 'table des matières', sont par ailleurs disponibles à la demande. Ces six chapitres concernent les polymères polyphénoliques végétaux et la cytologie pariétale ciblés dès lors sur le thême ' structure et organisation macromoléculaire' et dnnc aussi 'auto- assemblage' ou 'auto- organisation'.

Numérisé sous .pdf, cet 'extrait de livre ' peut ainsi être coupé-copié-collé et surtout exploré par tout moyen informatique. Il devient ainsi complémentaire de fichiers 'ReDoc' ciblés sur les lignines, les parois végétales et les produits lignifiées', composés pour diffusion intranet dans le cadre d'une mission INRA à B. Monties. De ce fait ce 'fichier extrait' doit être considéré comme un premier chapitre de ce Volume 2 (part 1) introductif à un second fichier **sous format .pdf** , ici à la suite, édité dans ce cadre, par assemblage informatique de 16 revues publiées sur ce thême depuis 1981. Cet assemblage permet aussi d'illustrer les possibilités d'actualisation, **'Révison sous ReDoc',** de livres et fichiers numérisés.
Ce dernier aspect est précisées aussi dans la 'part 2- Vol. 2' du Second volume de 'LES POLYMERES VEGETAUX '; **ici débute donc le cycle de liens commentés correspondant sur ce thême à ces objectifs, cliquer l' encadré bleu tireté.**

Collection dirigée
par Claude Costes

1980 - Bordas Dunod (épuisé av).

gauthier-villars

DUNOD

Paris, le 10 octobre 2005

Monsieur **Bernard MONTIES**
36, route du Pontel
78760 JOUARS PONTCHARTRAIN

Votre ouvrage : « Les polymères végétaux » Bordas 1980. Epuisé.
Collection Biochimie Appliquée/Gauthier-Villars

Cher Monsieur,

A la suite de votre appel téléphonique de ce jour, nous vous confirmons bien volontiers que vous pouvez exploiter toute ou partie de votre ouvrage sur un site internet, comme vous l'entendez.

En espérant vous avoir donné satisfaction, veuillez agréer, Cher Monsieur, l'expression de nos meilleurs sentiments.

M. Vitry

Maryvonne Vitry
Droits Etrangers et Dérivés
e-mail : m.vitry@dunod.com
☎ + 33 (0)1 40 46 35 50
Fax + 33 (0)1 40 46 49 95

B.

NB: voir en page suivante le §:: 'commentaire historique'

DUNOD ÉDITEUR • 5 rue Laromiguière, 75240 Paris Cedex 05 • Tél. : +33 (0)1 40 46 35 00 • Fax : +33 (0)1 40 46 49 95 • http://www.dunod.com
SA au capital de 900 000 € - RCS Paris 316 053 628 - Siret : 316 053 628 00129 - Code APE 221A - TVA : FR 58 316 053 628

table des matières

C. COSTES. Présentation de la collection « Biochimie appliquée » V

B. MONTIES. Introduction IX

A.M. CATESSON. Les tissus végétaux 1

J.C. ROLAND. Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural 30

J.C. ROLAND. Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales 46

F. BARNOUD. La cellulose 66

J.P. JOSELEAU. Les hémicelluloses 87

B. MONTIES. Les lignines 122

M. Th. TOLLIER, A.M. RIQUET. Dosage des polyosides 156

F. DUPRAT, D. GALLANT, A. GUILBOT, Christiane MERCIER, et J.P. ROBIN. L'amidon 176

J.F. THIBAULT. Les substances pectiques 232

M. METCHE et M. GIRARDIN. Les tanins des végétaux 252

G. de LESTANG-BREMOND, M. QUILLET. Les Polysaccharides des parois des algues brunes 289

G. JANIN et G. NEPVEU. La qualité des bois 319

Inserted at the end of the present pdf-file, under its sub -title: ' *réferences* '), the 49 pages named ' a ReDoc review-56ExtREIMS ', provide some complementary views related to the question of 'macromolecular organisation models of lignins' concerning 1: ***the spatial organization*** and 2: the ***current optimum uses of lignins***. These 'point of view' were presented during the 'Second generation lignins -'Li.2. G'- Seminar organized by Dr bernard KUREK, at INRA- Reims in November 2007. Having to also introduce into the procedures of the ReDoc-files construction, the two corresponding sets of slides, diaporama, were then inserted, as examples, in a 'ReDoc- pdf- commented- hyperlinked file' named ' a ReDoc review-5- Draft ', (a look into ReDoc procedures is given here also in part2 of this Vol 2 !) . Due however to current copyright constraints, none public diffusion was possible. Only a very limited number of copies was thus send 'for information and private use only', asking further in some cases, the Editor authorization of 'free internet diffusion', which were generously given by the Editorial management of both 'Advances in Phytochemistry' and of ' Cellulose Chemistry and Technology'). In the present 'PolymVegVol2part1.pdf ' file, the insertion of the 49 pages was done by 'extraction-insertion', saving thus the whole 'table of content' of the source-file which can bee then open using the 'active ' bookmarks, (signets *in French*). A 'thematic' cycle draws across the papers, preprints presentations and comments, dotted blue frame hyperlinks, completing the 'survey' one, in red frames.

Index

— A —

Accroissement annuel, 320
Acétylation, 97, 98, 234, 240, 261, 265
Acides benzoïque, 125, 148
— chebulique, 253, 256, 257
— cinnamique, 150
— ellagique, 253, 256, 257, 271
— galacturonique, 233, 235
— gallique, 253, 254, 257, 271, 272, 283
— glucuronique, 16, 110, 113, 303
— guluronique, 293, 299
— hexahydroxydiphénique, 256
— hydroxycinnamique, XII, 125
— mannuronique, 293, 299
— périodique, 97
— polygalacturonique, 167, 233
— sulfurique, 303, 311, 315
— uronique, XII, 110, 157, 172, 291, 303
— valonique, 253, 256, 257
Acidolyse, 126, 129, 136, 142
Alginates, 41, 61, 291 à 303
Algues, 1, 41, 43, 49, 53, 55, 74, 77, 80, 289 à 339
Amidon, VIII, 9, 14, 15, 20, 112, 176 à 229
Amylase Alpha, 195 à 198, 200, 219, 220
Amylase Beta, 195 à 200
Amyloglucosidae, 196, 200
Amylopectine, XII, 183 à 186, 188 à 190, 195, 199 à 202, 204, 208
Amylose, 179, 181 à 183, 189, 190, 195, 201, 202, 204, 208
Anhydroglucopyranose (glucopyranosyl), 69, 181, 183, 184, 190
Anthocyanidines, 261, 265, 270
Anthocyanogènes, 275, 286
Arabinose, 57, 115, 116
Arabynoxylane, 107
Arceaux (structure en), 52
Astringence, 259, 260, 269, 277, 281, 283
Aubier, 20, 320
Auto-assemblage, 58, 60, 63
Self - assembling ' citations cycle: clic hre

— B —

Bière, 270, 281, 284
Biosynthèse alginate, 298
— amidon, 71, 82, 83, 223, 227, 228
— cellulose, 118
— fucoïdanes, 308
— hemicellulose, 111 à 119, 148 à 153
lignines, 27, 28
pectines, 245
Biréfringence, 217, 227
Bois, 1, 8, 9, 14, 20, 21, 28, 48, 49, 66, 73, 81, 90, 91, 110, 122, 133, 141, 143, 144, 147 à 149, 256, 257, 265, 319 à 340
Bois de réaction, 49, 50, 103, 110, 144, 149, 334
Bouturage, 332

— C —

Calcium, 61, 63, 239, 240, 295, 300, 305, 310
Callose, 35
Cambium, 6, 8, 13, 55
Catéchine, 262, 263, 266, 267, 271 à 273, 278
Carragheenanes, 37, 41, 43, 61
Castaline, 257
Cellobiose, 66, 68, 73, 84
Cellulose, 5, 9, 22, 23, 24, 31, 48, 49, 56, 57, 66 à 85, 87, 88, 90, 111, 113, 156 à 159, 170, 303, 308, 319
Cétose, 91
Chanvre, 66
Chitine, 49, 83
Chloroplastes (voir plastes), 14, 17, 226
Cidre, 267, 270, 281, 283, 286
Collagène, 252, 267, 279, 283
Collenchyme, 5, 6, 17
Complexe (amidon), 180, 181
Complexes ioniques, 300 à 315
Contraintes de croissance, 148, 329
Coopérative (interaction), 295
Corilagine, 256
Coton, 66, 77, 80
Cristallines (structures de cristallites) 67, 69, 70, 77, 78, 80, 84, 183, 189, 193, 194, 214, 217, 295
Cyanidine, 259, 261, 262, 265, 268, 274

— D —

Déhydropolymère, 133, 135, 136, 138 à 140, 144, 145, 150, 153
Densité, 322
D-enzyme, 227
Déroulage, 322, 329
Détergent, 160, 306
Dextrine, 185, 186, 195 à 197, 199
DHP (voir déhydropolymère)
DP (degré moyen de polymérisation) 72, 74, 79, 81, 82, 83
Dichroïsme circulaire, 296
Dosage alginates, 299
— amidon, 200
— cellulose, 72, 157
— fucoïdanes, 308
— hemicelluloses, 163
— lignines, 168
— pectines, 166, 243, 244

— E —

Échanges d'ions, 300, 310
Écorce, 1, 5, 8, 15
Élimination (ß-) 91, 92, 101, 241 à 243
Ellagitanins, 253, 254, 257
Empesage, 204, 207, 208
Enzyme déramifiante, 199, 200
Enzyme pectolytique, 47, 242
Épiderme, 4, 5, 8, 16, 47, 52
Épimérases, 113 à 115, 299
Essence, 16, 328
Ether (liaisons), 66, 78, 92, 116, 125, 128, 129, 140, 144, 147, 234
Ester (liaisons), 66, 78, 90, 100, 140, 148, 151, 305, 313
Extensine, 52
Extraction alginates, 291
— cellulose, 158 à 162, 165, 177
— fucoïdanes, 305, 306
— hemicelluloses, 88 à 92, 170
— holocellulose, 90
— lignines, 132, 168, 169
— pectines, 166, 245, 246
— tanins, 169, 268

— F —

Fibres, X, 8, 17, 18, 20, 49, 50, 66, 107, 122, 142, 149, 156, 160, 303, 308, 319
Fibrilles, 18, 24, 31, 49, 50, 53, 59, 74, 77, 78, 82, 149, 319
Fibrilles élémentaires, 77, 82
Flavane-3-ol, 260, 262, 264, 265, 268, 270, 275
Flavane-3,4-diol, 260, 262, 268
Flavène, 262, 268, 278
Fractionnement algine, 291
— amidon, 179
— fucoïdanes, 305

— hémicelluloses, 91, 156, 179, 245, 246
— lignines, 125 à 131, 168, 169
— macromolécules réseau, X
— pectines, 166, 172, 248
— tanins, 252, 269, 270
Fourrages, 9, 156, 161, 173
Fucoïdanes, 40, 303 à 315
Furfural, 165

— G —

Galactanes, X, 41, 52, 87, 99, 103, 107, 108, 236
Galactomannanes, 61
Gallocatéchines, 266, 272, 275
Gallotanins, 253, 254, 256, 283, 285
Gel, gélification, 61, 132, 204, 208, 238, 294, 317
Glucanes, 66, 68, 78, 82, 83, 87, 99, 103, 107, 110, 117, 157, 291
Glucose, 89, 109, 110, 113, 116, 118, 172
Glucomannanes, 31, 49, 51, 89, 90, 92, 99, 107, 110, 117, 118
Golgi (appareil de), 9, 10, 14, 16, 17, 26, 118, 119, 298
Gonflement, 46, 53, 149, 308, 317
Glycoprotéines, IX, 32, 38, 46, 53, 84, 119, 252, 303

— H —

Hélice (structure en), 53, 83, 88, 188, 202, 263, 279, 283, 305, 317
Hémicelluloses, 9, 22, 63, 78, 81, 82, 87 à 119, 148, 157, 158, 174, 245, 246, 327
Hémilignines, 147
Héritabilité, 332
Hexosanes, 157
Holocellulose, 81, 90, 91
Hydrogène (liaisons), 52, 69, 71, 77, 87, 203, 204, 206, 207, 280, 284, 286, 317
Hydrolyse (voir aussi acidolyse), 67, 94, 169, 177, 182, 185, 186, 188, 190, 242, 243, 253, 256, 257, 261, 265, 274, 292, 293
Hydrophilie, 294, 308

— I —

Insoluble cellulosique, 158
Inositol, 113, 116, 247

— J —

Jute, 66

— L —

Lamelle mitoyenne (ou moyenne), 9, 22, 25, 47, 48, 108, 132, 149, 245, 320
Latex, 16
Lectine, 36, 37, 39, 40, 92, 119
Levure, 42, 43
Liber, 8, 27
Liège, 8, 14
Lignine, VIII, 9, 14, 17, 21 à 26, 81, 82, 87, 88, 90, 122 à 153, 156 à 159, 170, 327
Lignifiée(s), 18, 28
Lignocellulose, 81, 162, 163, 170
Lignol, 130, 135, 136
Lin, 66

— M —

Macromolécules, IX, XII, XIII, 1, 60, 66, 72, 78, 79, 87, 88, 177, 179 à 181, 201, 203, 220, 232, 319
Magnésium, 300, 310, 313
Mannane, 41, 43, 49, 88, 92, 99, 157
Mannitol, 291
Membranes végétales (voir parois), 33, 157, 289 à 317
Méristème, 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14
Méthylation, 67, 96, 97, 102, 117, 234, 254, 305
Méthylènequinone, 123, 136, 140
Microfibrille, 23, 48, 55, 58, 74, 75, 82, 87, 156, 319
Microgranule, 220, 223, 225
Microtubule, 9, 25, 59
Mucilage, X, 16, 158, 289 à 317
Multiréseau (voir réseau)
MWL (Lignine de bois moulu), 133

— N —

Nectar, 16
Nucléosides, 111, 112, 113, 119

— O —

Oses, 33, 34, 37
Oxydation, 217, 219, 220

— P —

Parenchyme, 5, 8, 13, 14, 15, 18, 20, 21, 106, 310, 330
Parois, 5, 8, 9, 13, 17, 18, 21 à 28, 32, 33, 40, 41, 47, 48, 49, 63, 64, 65, 66, 78, 80, 81, 82, 87 à 89, 107, 110, 111, 114, 118, 156 à 158, 170, 245, 319
Paroi primaire, 13, 17, 18, 22 à 25, 48, 51, 53, 77, 82, 87, 88, 107, 109, 132, 149, 245, 289 à 339
— secondaire, 18, 22 à 25, 28, 48, 49, 59, 74, 87, 107, 109, 132, 142, 149, 245
Pâte papier, 66, 81, 320, 327, 332
Pectate-lyase, 244
Pectines, 9, 22, 24, 28, 33, 47, 61, 77, 81, 87, 113, 116, 156 à 158, 166, 168, 174, 232
Pectine-estérase, 63, 243
Pectine-lyase, 244
Pedunculagine, 257
Pentosane, 157, 166
Peroxydase, 27, 38, 41, 53, 134, 135, 151, 271
Phloème, 4, 5, 6, 8, 18, 20, 141
Phosphorylase, 197, 198, 228
Plan ligneux, 38, 40, 44, 46, 52, 56, 58, 64, 319, 329
Plasmalemme, 8, 9, 13, 82, 118
Plastes, 9, 10, 13 à 15, 223, 226
Polygalacturonase, 244
Polymolécularité, 72, 73
Polyosides (voir polysaccharides), 122, 123, 141, 147, 149, 152, 156 à 158, 170, 237
Polyphénols, 27, 258, 271, 272, 282, 291
Polyphénolique, 16
Polysaccharides (voir polyosides), 16, 17, 21, 23, 30, 32, 34, 36, 37, 40 à 44, 46 à 49, 56, 60 à 63, 65, 66, 78, 87 à 91, 109 à 111, 114, 156, 237, 289 à 339
Proanthocyanidine, 259, 261, 265, 267, 268, 272
Procyanidine, 115, 261 à 263, 265, 268, 272, 275, 277, 278, 282, 284
Protéine, 9, 15, 20, 39, 59, 62, 77, 246, 252, 259, 264, 270, 279, 281 à 287, 303, 310
Protolignine, 125, 132
Protopectine, 246
Pseudolignine, 152
Pullulanase, 184, 197, 199, 200
Punilagine, 257
Pyrolyse, 194

— Q —

Q-enzyme, 198
Quinone méthyde (voir méthylènequinone), 123

— R —

Radiolyse, 194
Ramie, 66, 157
Rayon ligneux, 8, 21, 319
Rayonne, 66, 70, 78
Réseau, X, 52, 62, 125, 132, 142, 145, 295
Résines, 16, 30
Réticulum endoplasmique, 9, 14 à 16, 27
Rétrogradation, 208, 209
Rhannose, 233, 235, 236

— S —

Sciage, 329
Sclérenchyme, 8, 18
Solubilité (solubilisation)
— algine, 291
— amidon, 208

— cellulose, 72, 79, 80, 168, 327
— hémicelluloses, 91, 327
— fucoïdanes, 303
— lignine, 327
— pectines, 237
— tanins, 267, 269, 283
Sorbitol, 291, 299
Sorption, 204 à 206, 319
Spectroscopie infrarouge, 98
— r.m.n., 99
Substituant, 191
Synergie des polysaccharides, 317

— T —

Tanins (ou tannins), 9, 16, 66, 157, 158, 252 à 287
— condensés, 252, 260, 270, 275, 277, 279
— hydrolysables, 252 à 257
— de Chine, 254, 282
— de Sumach, 254, 282
Thé, 270, 272, 276, 281, 286
Théarubigine, 272, 276, 286
Thiolyse, 128, 272, 276, 286
Toluène α -thiol, 262, 265
Tonoplaste, 9, 14
Tracheide, 15, 18, 21 à 23, 319
Tranchage, 330
Transférase, 112, 114
Transglucolysation, 193
Turn-over des sulfates, 315

— U —

UDP-glucose (voir aussi nucléotides), 41, 111 à 118, 248
UDP (ADP) glucosyl transférase, 195, 198
Ultrastructure (amidon), 215, 217, 222
Uronides, 167

— V —

Vacuole, 9, 14, 15, 55, 181
Vaisseau, 5, 8, 18, 21, 23, 26, 122, 141, 142, 289, 319, 326
Vin, 270, 275 à 278, 281, 284, 286
Viscosité, 294, 301, 307
Viscosité des pectines, 238

— X —

Xylanase, 101
Xylane, 88, 90, 99, 107, 110, 115, 116, 157
Xyloglucanes, 77, 108, 109
Xylème (voir bois), 4, 5, 18, 28, 141
Xylose, 110, 111, 113, 115, 118, 165

— Z —

Zonation des algues, 289

B. MONTIES

Introduction

clic here for
the next

> Mais tous ces êtres dont j'ai parlé sont de ceux que produit la nature. Ils s'accroissent de façon telle que la manière dont ils sont faits, les formes qu'ils revêtent, les fonctions qu'ils comportent, les moyens qu'il possèdent de composer avec les localités et les saisons sont liés entre eux ...
>
> Mais quand aux objets qui sont l'œuvre de l'homme il en va tout autrement... L'homme, te dis-je, fabrique par abstraction ignorant et oubliant une grande partie des qualités de ce qu'il emploie, s'attachant seulement à des conditions claires et distinctes, qui peuvent le plus souvent être simultanément satisfaites non par une seule mais plusieurs espèces de matière.
>
> *Paul VALERY* — 1944,
> *Eupalinos ou l'architecte*

Dans le domaine des polymères que produit la nature, l'homme n'a pas manqué non plus d'ignorer une grande partie des qualités des produits qu'il a employés. Les progrès des connaissances en ce domaine en témoignent. Afin de mieux contrôler les usages de la cellulose du coton, du tanin du jus de pomme, de l'amidon de la pomme de terre et de la lignine du bois il a été contraint de les analyser. Il a résulté de ces analyses, la découverte de plusieurs sortes de celluloses, de tanins, d'amidons et de lignines.

A la tendance unitaire primitive a donc succédé la prise de conscience de la diversité des polymères naturels.

Or, la nécessité urgente et impérieuse de trouver des sources nouvelles d'énergie et de produits chimiques conduit à utiliser les végétaux non seulement comme sources de matière et d'énergie métabolisables, sous forme d'aliments, mais encore comme sources de matériaux et de combustible, sous forme de biomasse. Actuellement, lorsque l'on envisage la valorisation de la biomasse, on néglige sa diversité essentielle. Etant donné le variabilité naturelle des produits végétaux, il faut donc s'attendre à ce que des problèmes qualitatifs de valorisation des biomasses prennent le relai de celui de la valorisation de « la » biomasse. C'est pour tenter de se préparer à résoudre ces problèmes que le présent ouvrage a été entrepris. Il devient alors de plus en plus indispensable de connaître non

seulement les polymères naturels dans leur diversité mais encore la manière dont ils sont liés. Au niveau des polymères végétaux non azotés ces problèmes sont particulièrement aigus : sauf cas très particulier ces polymères sont encore très mal connus.

C'est pour tenter de faire le point sur ces problèmes, que fut organisé en septembre 1977 à l'Institut National Agronomique, un cycle de conférences sur le thème « Macromolécules non azotées d'origine végétale ». Douze conférenciers, chercheurs au CNRS, à l'INRA ou à l'Université, acceptèrent d'y participer.

Le cycle fut organisé autour de quatre thèmes :

1) « *Données ultrastructurales et cytochimiques* » par Mlle A.M. Catesson et par J.C. Rolland;
2) « *Constituants et dosage des produits ligneux* » : cellulose par F. Barnoud, hémicelluloses par J.P. Joseleau, lignines par B. Monties et dosage des constituants des parois par Mme M.T. Tollier;
3) « *Polymères à intérêt alimentaire* » : amidon par Mme C. Mercier, pectines par J.F. Thibault et J.L. Doublier, tanins par M. Metche, polyosides acides des algues par Mme De Lestang-Bremond et enfin;
4) « *Relations avec la qualité des produits* » : les bois par G. Janin et les fourrages par P. Thivend.

Le présent ouvrage a été entrepris à la suite de ce cycle et il a été ordonné selon le même plan : les chapitres successifs correspondent, à une exception près, à chacune des conférences.

Ce cycle de conférences, organisé dans le cadre de l'ADEPRINA, visait à la formation permanente d'agronomes, d'ingénieurs et de chercheurs; il en va de même pour cet ouvrage. Ce n'est donc pas à des spécialistes que ce livre est destiné mais à des agronomes, ingénieurs ou étudiants. Dans cette perspective seul un nombre limité de références bibliographiques a été retenu ; cependant, à côté des ouvrages et revues de base figurent des articles parfois très spécialisés, susceptibles d'ouvrir de nouvelles perspectives. Dans ce même but, certains conférenciers, coauteurs de l'ouvrage, ont fait appel à des collaborateurs qui ont participé à la rédaction des textes; les noms de ces derniers figurent donc en tête des chapitres correspondants.

Je tiens à remercier chacun des coauteurs et chacun de leur collaborateurs qui ont accepté de contribuer à ce travail de synthèse d'autant plus difficile à réaliser qu'il visait une présentation simplifiée et prospective de l'état actuel de nos connaissances. Certaines parties apparaitront parfois sommaires et même trop simplistes aux spécialistes.

On pourra, par exemple, remarquer que les bois ne sont pas seulement composés d'hémicelluloses, celluloses et lignines et qu'il est nécessaire de tenir compte de la présence d'au moins un quatrième constituant, l'eau, pour pouvoir établir des corrélations entre composition chimique et propriétés mécaniques. De même, on pourra regretter que le souci de se limiter aux polymères non azotés ait conduit à ne pas aborder les glycoprotéines des parois cellulaires, du type extensine. De même on pourra déplorer l'absence de monographie concer-

nant les gommes, mucilages et autres arabinogalactanes. Ces composés nous ont semblé encore trop partiellement connus pour pouvoir faire, dans le cadre choisi, l'objet d'une monographie simple ([1]).

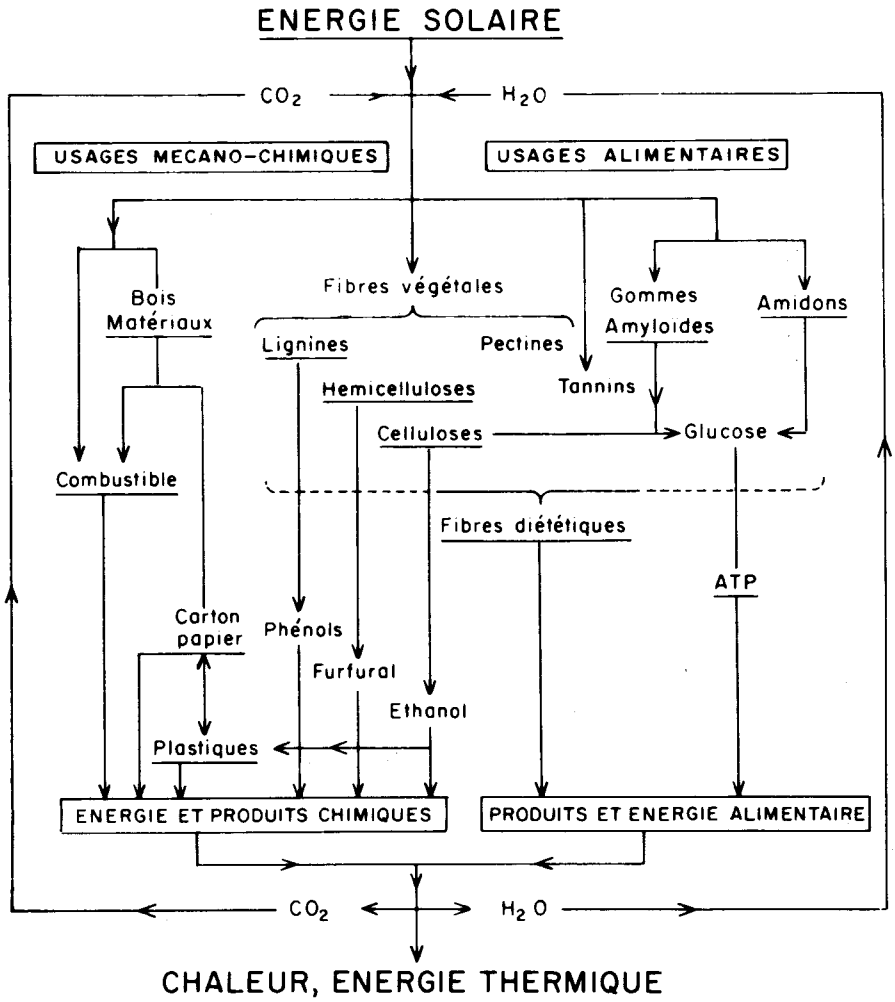


Fig. 1 — Cycle du carbone au travers des macromolécules végétales non azotées

Dans le cadre d'une valorisation énergétique il ne faudrait pas ignorer, ici encore et comme précédemment, les différentes qualités possibles d'énergie et en particulier tenir compte du flux entropique.

([1]) Pour ces deux derniers thèmes on pourra cependant consulter par exemple la revue récente et très détaillée que *A.E. Clarke, R.L. Anderson* et *B.A. Stone* viennent de consacrer aux glycoprotéines et protéoglycanes dans *Phytochemistry,* **18**, 521-540.

Nous nous sommes donc limités à envisager les polymères végétaux non azotés qui nous ont paru être, à la fois, les moins mal connus et les plus fréquents dans les diverses plantes. Chacun de ces polymères sont à des titres divers utilisés soit comme source d'énergie ou de produits à usages alimentaires ou chimiques. Bien que ces polymères soient fondamentalement différents, nous les avons réunis ici parce que la valorisation et les usages de chacun sont souvent fonction de la présence des autres. Il suffit pour se persuader de cela de considérer le cycle de carbone au travers de ces macromolécules non azotées (fig. 1). Il est commode d'opposer dans ce cycle les usages alimentaires et les usages mécano-chimiques. Dans les deux cas, l'énergie emmagasinée dans les composés organiques sous forme de liaisons interatomiques est finalement dégradée sous forme de chaleur restituant le gaz carbonique et l'eau. En amont, se situe l'activité photosynthétique des cellules végétales qui captent l'énergie solaire et l'utilisent pour organiser des ensembles moléculaires à partir du gaz carbonique et de l'eau. C'est à ce niveau que l'intérêt porté sur le plan énergétique aux biomasses trouve son origine. Il est donc possible que, dans un premier temps, « l'homme qui fabrique » puisse négliger les autres particularités des cellules végétales. Par contre, pour les autres usages chimiques ou alimentaires, l'homme ne peut ignorer une seconde particularité essentielle des cellules végétales : ces cellules sont entourées d'une paroi polyosidique plus ou moins incrustée de polymères polyphénoliques qui lui confèrent à la fois résistance mécanique et résistance aux agents chimiques et biochimiques de dégradation. Dans les parois végétales, tous ces polymères seraient même liés entre eux, principalement par des liaisons covalentes et des liaisons hydrogène. De l'existence de ce réseau de liaisons résulteraient les qualités de résistance mécanique et chimique des bois et de leurs dérivés ainsi que celles des fibres diététiques qui sont indispensables à un transit intestinal normal. De l'existence de ce même réseau résulteraient aussi les difficultés de valorisation des polyosides pariétaux comme source d'énergie alimentaire telle par exemple d'adénosine triphosphate (ATP). C'est encore de l'existence de ce réseau que résulteraient les difficultés de fractionnement des constituants des parois végétales qui sont des sources potentielles de produits chimiques, de type aliphatique tels que l'éthanol, le méthanol et le furfural et aromatiques tels des phénols. Enfin, c'est encore de l'existence de ce réseau que proviendraient aussi les difficultés analytiques de fractionnement et de dosage de ces divers polymères que l'on ne sait pas encore isoler sans nécessairement les modifier.

Dans le présent ouvrage les notions de réseau et de liaisons entre polymères apparaissent surtout dans les chapitres consacrés à l'ultrastructure. Dans les autres monographies ces notions n'ont pas été envisagées en détail parce que l'on connait encore trop mal, sur le plan chimique, les modalités quantitatives et qualitatives d'interconnexions entre ces polymères.

Il est certain cependant que cette notion est très importante. Avec quelques autres auteurs, il est tentant de considérer que la paroi cellulaire constitue une macromolécule unique, en forme de sac, dans laquelle les différents polymères sont interconnectés et constituent un polymère en réseau.

Etant donné l'importance pratique que pourrait avoir un tel concept il est utile de rappeler ici quelques principes de chimie macromoléculaire. Reprenant une définition de J.P. Flory on peut entendre par macromolécule toute substance polymérisée dans laquelle sont connectés de façon séquentielle des éléments en forme de chaîne de longueur quelconque. Même dans les polymères ramifiés, la caractéristique essentielle demeure ainsi la présence de chaînes interconnectées par liaisons de valence. C'est donc l'existence d'enchainements qui est la caractéristique essentielle des macromolécules. Certains polymères peuvent même former des structures réticulées indéfiniment étendues. Ce type de macromolécule a été analysé en détail par J.P. Flory dans l'ouvrage « *Principles of Polymers chemistry* » dont la neuvième édition est parue en 1975. De tels polymères peuvent en effet être constitués d'une macromolécule unique dont la taille atteint les dimensions macroscopiques. Dans ce cas, c'est donc la continuité de la structure plus que son individualité qui est essentielle pour expliquer ses propriétés mécano-chimiques. De la formation de tels polymères peuvent résulter des comportements paradoxaux tels que ceux des caoutchoucs, autre polymère non azoté non envisagé dans cet ouvrage parce que peu fréquent dans les végétaux. C'est ainsi par exemple, qu'une lanière de caoutchouc se raccourcit quand on la chauffe, s'allonge quand on la refroidit et s'organise en structure cristalline fibreuse quand on l'étire. Les analyses théoriques de Flory ont montré que ce comportement peut être observé chez les polymères contenant de longues chaînes interconnectées par un nombre relativement très faible de liaisons covalentes. La présence d'un enchaînement d'une centaine d'éléments, parfois même davantage, entre deux connexions est une condition nécessaire d'existence de la viscoélasticité du type caoutchouc. Il est nécessaire, de plus, que les chaînes interconnectées puissent se déplacer librement les unes par rapport aux autres. De ce fait, la permanence de la forme macroscopique de la molécule résulte de l'existence des interconnexions présentes pourtant en très faible nombre. Ainsi, de façon générale, un système de chaînes interconnectées peut s'organiser en une molécule unique douée de propriétés mécaniques et chimiques particulières. Selon Flory on peut appliquer le terme de réseau infini, infinite netwook, à ces macromolécules formant une molécule unique.

Compte tenu de ces données, il est tentant de rapprocher les concepts de macromolécule unique appliqués à la paroi cellulaire à celui de réseau infini au sens de Flory. La présence de monomères polyfonctionnels, c'est-à-dire capables d'établir plus de deux connexions dans une chaîne polymérisée, est nécessaire à la formation d'un tel réseau. Les monomères constitutifs des macromolécules non azotées végétales, le glucose des amidons, les acides uroniques des hémicelluloses, les alcools hydroxycinnamiques des lignines, les flavanes des tanins condensés satisfont cette condition. Celle-ci n'est cependant pas suffisante. Flory a démontré que des monomères polyfonctionnels peuvent former des polymères infinis, par condensation au hasard, sans pouvoir parfois former un réseau infini. Les produits d'étherification intermoléculaires que forme le D-glucose en présence d'acides dilués, l'amylopectine, l'amidon ou le glycogène en sont, d'après Flory, des exemples. A notre connaissance, il n'existe pas d'études systématiques analogues concernant les autres molécules non azotées végétales. Compte tenu des relations établies par Flory entre composition chimique et qualités mécaniques

des caoutchoucs on ne peut que souhaiter que des études analogues soient entreprises sur les parois cellulaires et sur les autres polymères non azotés végétaux.

Une telle entreprise serait certainement aussi digne d'intérêt sur le plan fondamental qu'utile pour la pratique. Elle contribuerait aussi au développement de la chimie macromoléculaire qui trop souvent est délaissée par les biochimistes. On peut trouver à cet état de fait des raisons historiques et scientifiques.

Pour se limiter à l'une des raisons historiques il faut rappeler que ce n'est qu'à partir de 1920 que Staudinger a tenté d'expliquer les propriétés des polymères au moyen des notions ordinaires de la chimie et, en particulier, de celle de liaisons de valence. Le concept de macromolécules et le terme lui-même, qui fut introduit en 1922, par Staudinger ne se sont imposés que lentement et cela malgré l'attribution à son auteur du prix Nobel en 1953. L'historique de l'essort de l'hypothèse macromoléculaire a été fait par J.P. Flory dans son ouvrage, cité plus haut, ainsi que par Magda Staudinger dans la revue *Trends in Biochemical Science,* (**3**, (6), N 123-124).

Pour ne citer que deux raisons scientifiques on peut déplorer que les enseignements de chimie, même macromoléculaire, ne traitent rarement en détail des polymères naturels. A ceci il faut ajouter que les biochimistes n'ont pas été fortement incités à l'étude des macromolécules non azotées : ils les ont donc sacrifiées, sur les autels de la biologie moléculaire, aux protéines et acides nucléiques dont l'étude est évidemment elle aussi indispensable.

Je souhaite donc pour conclure que cet ouvrage, que ses coauteurs ont voulu simple et facilement abordable, contribue d'une part à développer l'intérêt que les biochimistes porteront aux macromolécules et permette d'autre part aux ingénieurs et techniciens d'aborder l'étude de ces substances.

Dans les deux cas, il est vraisemblable que s'intéressant à un polymère défini ils ne pourront pas négliger les autres qui pourraient lui être associés. Puissent-ils alors, en considérant les propriétés décrites dans les diverses monographies, se souvenir que « l'homme fabrique en ignorant une grande partie des qualités des choses » : il ne leur faudra surtout pas oublier, ensuite, qu'ils ont choisi, dans un premier temps, d'abstraire donc d'ignorer.

Juillet 1979

Clic here for the last B. MONTIES !!

clic here for
the next

A.M. CATESSON

Les tissus végétaux
Ultrastructure biogenèse

Ce chapitre n'a pas la prétention de couvrir en une trentaine de pages l'organogenèse végétale. Il se propose simplement de rappeler les quelques bases d'anatomie et de cytologie végétales nécessaires au lecteur pour situer dans une cellule les macromolécules dont il sera question par la suite, pour comprendre dans quels compartiments cellulaires elles sont élaborées et pour connaître les tissus où elles s'accumulent. Les lectures suggérées à la fin de ce chapitre permettront à celui qui le désire d'approfondir tel ou tel aspect de l'organisation d'un végétal.

Les plantes vivaces présentent la particularité de pouvoir *croître indéfiniment* grâce à la multiplication de certaines cellules. Ces cellules, qui demeurent capables de se diviser pendant toute la vie du végétal, conservent un aspect juvénile (on dit *indifférencié*); elles sont appelées *cellules méristématiques* (du grec *μερος* : partagé) et constituent les *méristèmes.* Les cellules qui en dérivent grandissent puis se spécialisent (se *différencient*) pour accomplir diverses fonctions (protection, soutien, conduction de la sève, etc...). Un ensemble de cellules spécialisées dans une même fonction constitue un *tissu.* Chez les plantes annuelles, la croissance se fait de même façon mais elle est en principe limitée dans le temps puisque la plante meurt après avoir donné ses fruits.

Chez certains végétaux, tels les Algues et les Champignons, la différenciation cellulaire est moins poussée et il ne se forme pas de véritables tissus diversifiés. La figure 1 montre la structure des cellules dans la zone de croissance d'une Algue à pigment rouge : le *Polysiphonia.* Hormis cet exemple, nous nous limiterons ici à l'étude de plantes possédant des tissus caractéristiques c'est-à-dire les plantes à fleurs et les Conifères.

I. ORIGINE ET MISE EN PLACE DES TISSUS

Les premiers méristèmes (*méristèmes primaires*) sont déjà reconnaissables dans l'embryon à l'extrémité de la future tige (apex caulinaire ou point végétatif) et de la future racine (apex racinaire). Leur fonctionnement débute au moment de la germination de la graine et permet la croissance en longueur des tiges et des racines ainsi que la formation des feuilles. Chez certaines plantes d'autres zones méristématiques (*méristèmes secondaires*) se forment à partir des méristèmes primaires et assurent la croissance en épaisseur des organes. Elles sont responsables de la production du bois et de la majeure partie de l'écorce chez les arbres. Elles

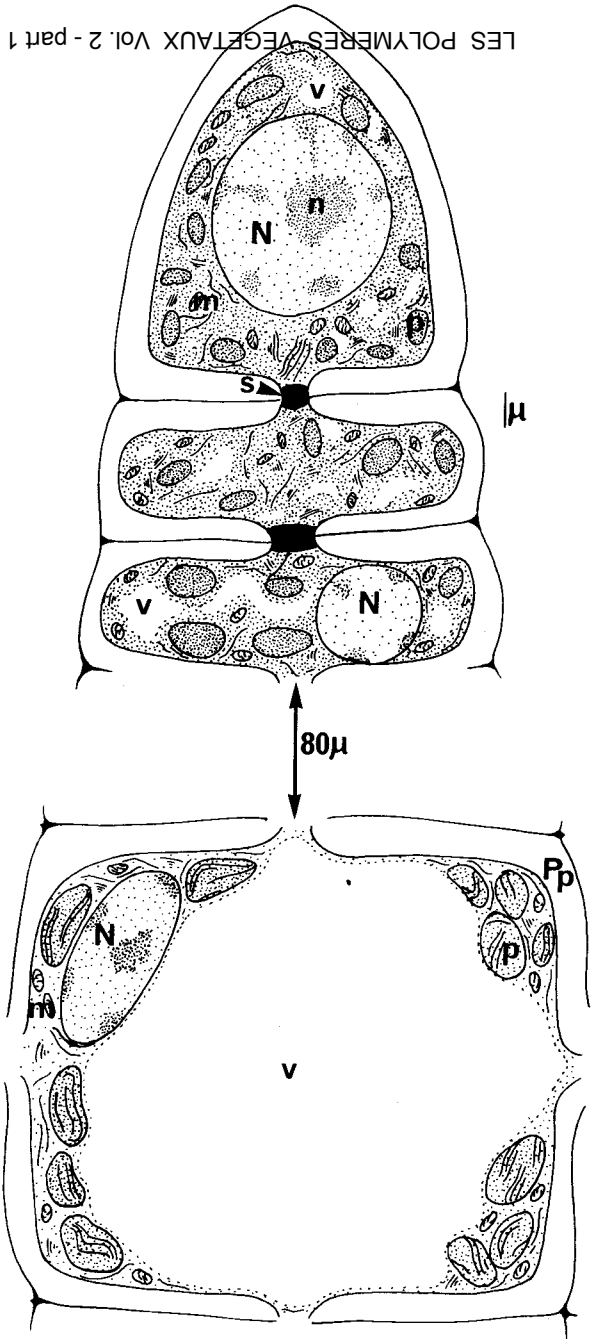


Fig. 1 — Schéma de l'extrémité apicale d'un filament de *Polysiphonia* (Algue rouge). Les cellules supérieures à gros noyau (N) et à cytoplasme dense renferment de très petites vacuoles (v) et des plastes (p) sans lamelles; plus loin, les cellules, de plus grande taille, possèdent une large vacuole et des plastes plus gros pourvus de thylakoïdes. Il y a eu *différenciation* des cellules produites par la division des cellules apicales. Pp : paroi primaire interrompue au niveau de synapses s; n : nucléole; m : mitochondrie. (Schéma effectué d'après des micrographies de C. Lichtlé).

sont peu actives chez les plantes herbacées et n'existent pas chez certaines plantes à fleurs (*par ex.* les Céréales, les Orchidées, les Palmiers).

Nous allons préciser ces données en étudiant comme exemple le développement d'un rameau de Sycomore.

LE POINT VEGETATIF ET LA MISE EN PLACE DES TISSUS PRIMAIRES

Si l'on écarte soigneusement sous une loupe les jeunes feuilles d'un bourgeon de Sycomore au moment où il débourre au printemps, on aperçoit au centre un petit mamelon blanchâtre, le point végétatif. Une coupe longitudinale du bourgeon passant par l'axe médian de l'une des paires de feuilles nous permet d'en préciser la structure (fig. 2 et 3).

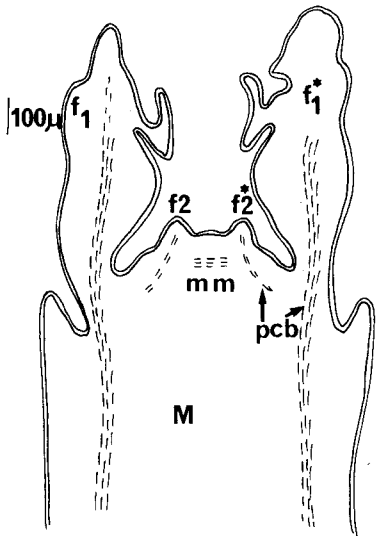


Fig. 2 — Schéma de l'extrémité apicale, ou point végétatif, d'un rameau de Sycomore. De part et d'autre, on voit deux paires de feuilles f_1 et f_2, avec leur procambium (pcb). mm : méristème médullaire ; M : mœlle.

De chaque côté du dôme apical se trouvent les ébauches foliaires successivement formées dont les plus récentes encadrent l'apex. Au-dessus de la dernière paire d'ébauches, les cellules latérales du méristème, de petite taille (5 à 8 nm de diamètre) et disposées en couronne, vont initier la paire de feuilles suivantes : elles constituent l'*anneau initial.* A la base du dôme apical quelques assises de cellules se divisent dans le sens horizontal pour donner naissance à la moelle : elles forment le *méristème médullaire.* La portion du bourgeon comprise entre l'insertion de 2 paires de feuilles successives, c'est-à-dire entre deux nœuds, va s'allonger par division et élongation cellulaires et constitue un *entre-nœud* ([1]) de la future tige. On remarque très tôt dans l'axe de la jeune ébauche des

([1]) Ici le terme entre-nœud désigne l'intervalle entre 2 feuilles successives. Pour les forestiers, il représente la longueur de la pousse annuelle.

cellules allongées (5/5/20 nm) à caractères très méristématiques qui se prolongent dans l'entre-nœud sous-jacent : elles constituent le *procambium.* Sur des coupes transversales, il apparaît formé de cordons séparés par des cellules moins méristématiques.

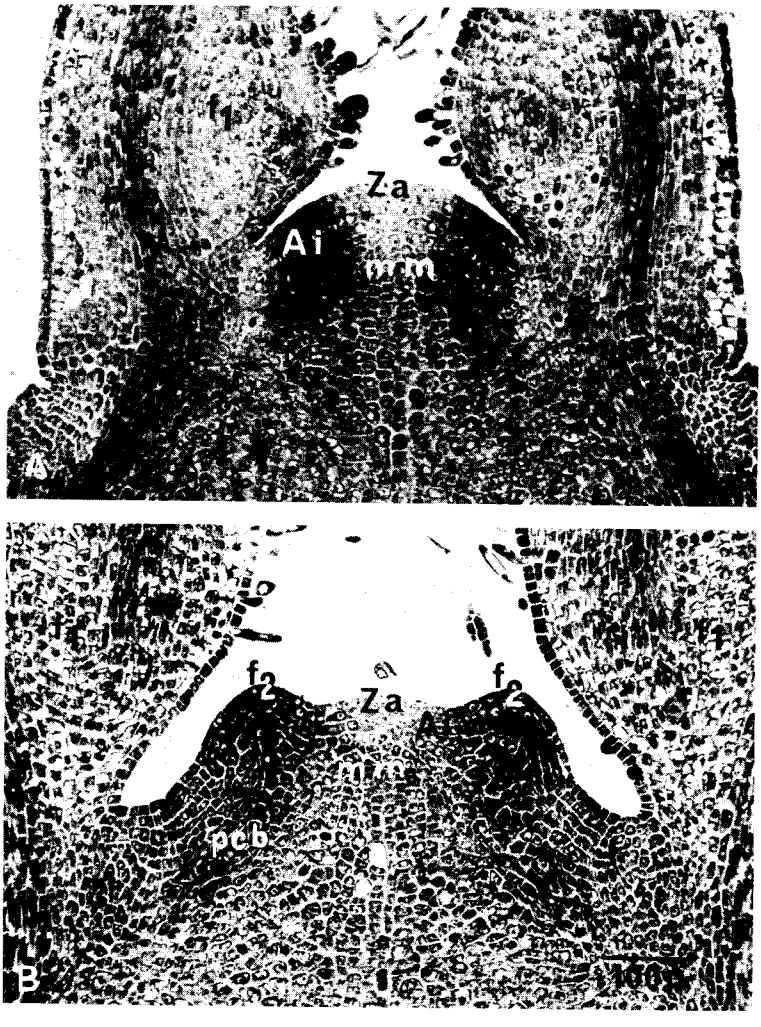


Fig. 3 — Coupes longitudinales de points végétatifs de Sycomore, colorées par la pyronine pour mettre en évidence le RNA. A : l'apex est entouré par la paire de feuilles f_1; Za : zone apicale; Ai : anneau initial; mm : méristème médullaire; pcb : procambium. B : une nouvelle paire de feuilles f_2 vient de se former aux dépens de l'anneau initial (cf. fig. 2).

L'assise superficielle de l'apex se prolonge dans les feuilles et la jeune tige par un *épiderme*; le procambium se différencie progressivement en tissus conducteurs : le *xylème* conduisant la sève brute ascendante et le *phloème* conduisant

la sève élaborée qui contient les produits de la photosynthèse foliaire. Les autres cellules évoluent en *parenchyme.* Dans la feuille, il s'agit en particulier d'un *parenchyme assimilateur* riche en chlorophylle, assurant la nutrition carbonée de la plante par la photosynthèse.

En mai lorsque le rameau de l'année est en pleine élongation, une série de coupes transversales pratiquées à différents niveaux nous montre l'évolution de la tige au cours de sa croissance (fig. 4 à 7). Sous l'épiderme se trouve le *parenchyme cortical;* dans les cellules les plus externes, les parois s'épaississent par apport de cellulose et ainsi contribuent à assurer la rigidité de l'organe : elles forment un tissu de soutien cellulosique appelé *collenchyme.* Au centre de la tige se trouve la moelle constituée de grosses cellules de *parenchyme médullaire* (voir p.15).Entre moelle et écorce, on reconnaît les sections transversales des cordons de procambium séparés par du parenchyme à petites cellules. Sur la face interne de chaque cordon

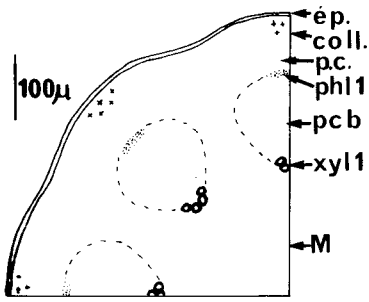


Fig. 4 — Schéma d'une coupe transversale de tige de Sycomore faite juste sous le bourgeon. Peu de tissus différenciés. coll : collenchyme; ép. : épiderme; M : mœlle; pc : parenchyme cortical; pcb : procambium; phl 1 : phloème primaire; xyl 1 : xylème primaire.

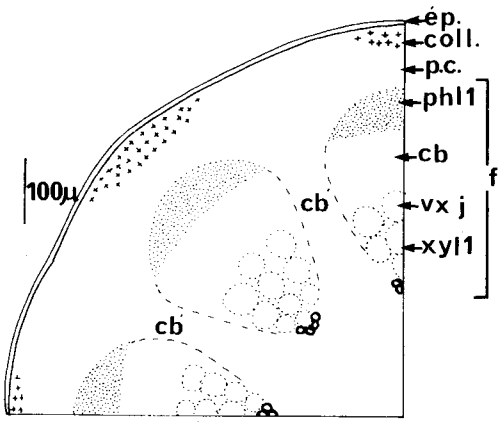


Fig. 5 — Schéma d'une coupe transversale de tige de Sycomore faite dans un entre-nœud en cours d'élongation : le collenchyme et les tissus conducteurs sont plus différenciés que fig. 4. Mêmes légendes que fig. 4. cb et cb' : future zone cambiale; f : faisceau conducteur; vxj : vaisseaux en différenciation.

procambial, se différencient les premiers éléments conducteurs (trachéides puis vaisseaux) du xylème, sur la face externe les premiers éléments du phloème, tandis que dans l'intérieur du cordon les cellules indifférenciées se multiplient très activement. Ces tissus formés directement par différenciation des cellules procambiales sont appelés *phloème et xylème primaires.* En effet, on appelle primaires tous les tissus issus du fonctionnement d'un méristème primaire et l'on parle alors de « structure primaire » pour la plante.

Au cours de la croissance du rameau, le diamètre de la tige augmente à la fois par multiplication (en particulier dans le procambium) et par accroissement en largeur des cellules. Sous l'épiderme, de nouvelles cellules se différencient en

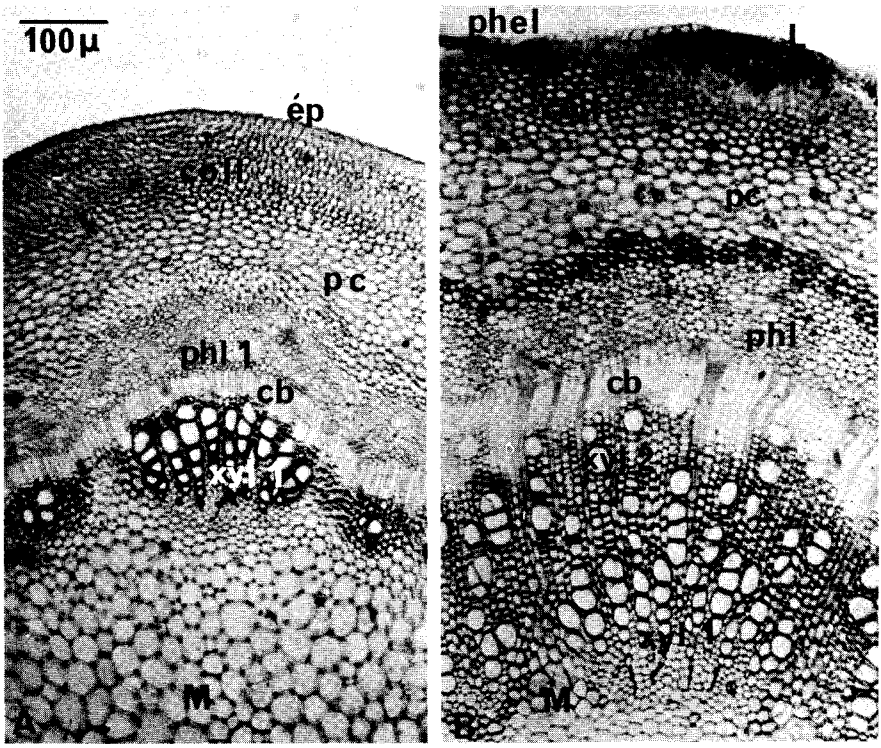


Fig. 6 — Coupes transversales de tige de Sycomore. A : entre-nœud en cours d'élongation (cf. fig. 5); B : entre-nœud ayant achevé son élongation (cf. fig. 7). Mêmes légendes que fig. 5 et 7.

collenchyme. Les cellules procambiales évoluent presque toutes soit en phloème soit en xylème primaire à l'exception d'une zone médiane assez étroite (fig. 5 et 6). La plupart des cellules de cette zone tout en continuant à se diviser, surtout dans un sens tangentiel, s'allongent et atteignent 300 nm environ. Il se constitue ainsi une zone méristématique secondaire ou *cambium.*

LES MERISTEMES SECONDAIRES ET LES TISSUS QUI EN DERIVENT

a) Le cambium libéro-ligneux : formation du xylème et du phloème secondaires

Le cambium, issu du procambium, forme d'abord des arcs méristématiques. Ceux-ci se raccordent bientôt bout à bout grâce à une reprise des divisions dans les petites cellules parenchymateuses séparant les cordons procambiaux. Il se constitue ainsi une zone cambiale, sorte de cylindre creux, qui apparait sur les coupes transversales comme un anneau continu. C'est ce que nous voyons à la base du rameau de Sycomore que nous étudiions au paragraphe précédent (fig. 6 et 7). Dans cet entre-nœud, où la croissance en longueur est achevée, le cambium

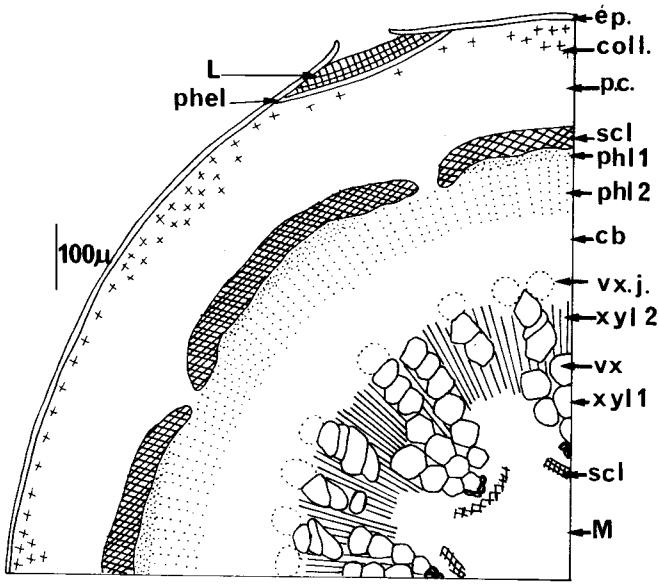


Fig. 7 — Schéma d'une coupe transversale faite dans un entre-nœud de Sycomore ayant achevé sa croissance. Mêmes légendes que fig. 4 et 5. L : liège; phel : phelloderme; phl 2 : phloème secondaire; vx : vaisseaux; xyl 2 : xylème secondaire.

Fig. 8 — Coupe tangentielle de cambium de Sycomore. if : initiale fusiforme; ir : initiale radiale; N : noyau.

est formé de deux sortes de cellules. Les unes, aplaties et allongées (3/15/300 nm) sont effilées aux extrémités d'où leur nom d'*initiales longues* ou *initiales fusiformes.* Les autres, presqu'isodiamétriques (8 à 12 nm dans chaque dimension) donnent naissance à des cellules de parenchyme allongées dans le sens horizontal, formant ainsi des « rayons » : cette deuxième catégorie de cellules cambiales constitue les *initiales courtes* ou *initiales radiales* (fig. 8).

Les cellules cambiales se cloisonnent le plus souvent dans le sens longitudinal tangentiel donnant ainsi naissance à des dérivées qui se différencient vers l'extérieur en *phloème secondaire* ou *liber* et vers l'intérieur en *xylème secondaire* ou *bois.* Ainsi se réalise la « structure secondaire » de la tige. Celle-ci est bien illustrée sur les figures 6 et 7. Le cambium a déjà donné des tissus secondaires, phloème et xylème. Du côté du xylème on voit une large bande de dérivées cambiales en cours de différenciation où l'on reconnait des vaisseaux de large diamètre non encore lignifiés. La lignification des cellules (fibres, sclérenchyme et xylème primaires) abolit l'extensibilité des parois : elle marque donc la fin de l'élongation de l'entre-nœud.

b) Le phellogène et le liège

De place en place, sous l'épiderme, certaines cellules se dédifférencient et reprennent une activité méristématique. Progressivement cette activité gagne toute la zone sous-épidermique. Il se met ainsi en place une deuxième zone méristématique secondaire, le *phellogène.* Celui-ci, homogène, est formé de cellules parallélépipédiques aplaties (5 X 20 X 30 nm approximativement), bien vacuolisées, qui se divisent tangentiellement. Elles produisent surtout des dérivées vers l'extérieur de la tige qui se chargent d'une substance lipidique hydrophobe, la subérine. Ainsi se constitue le *liège,* revêtement protecteur imperméable de la tige adulte, interrompu de place en place par des zones lâches de cellules subérifiées, les lenticelles, permettant les échanges gazeux entre le rameau et le milieu extérieur.

Au fur et à mesure que le cambium libéro-ligneux forme de nouvelles couches de bois, le diamètre de la tige augmente, provoquant un étirement et un écrasement des cellules externes. Ultérieurement un deuxième phellogène apparaitra dans le phloème et formera une nouvelle couche de liège. Tous les tissus situés à l'extérieur de ce liège imperméable ne seront plus alimentés et mourront. L'écorce externe se fendillera ou bien s'exfoliera par plaques ou par rubans (voir p. 20).

II. CARACTERES ET DIFFERENCIATION DES CELLULES MERISTEMATIQUES

Comme une cellule animale, une cellule végétale comporte un *cytoplasme* d'apparence visqueuse sur le vivant, limité par une *membrane plasmique* ou *plasmalemme.* Ce cytoplasme renferme divers organites sièges de certains travaux

cellulaires ainsi qu'un noyau plus ou moins sphérique, porteur de l'information génétique, jouant en quelque sorte un rôle de chef d'orchestre. Trois particularités distinguent les cellules végétales. C'est tout d'abord la présence, parmi leurs organites, de *plastes* entourés d'une membrane double; dans le stroma interne peut se former un système de lamelles doubles, les thylakoïdes, portant la chlorophylle (Bourdu et Giraud, 1978); celle-ci, en captant l'énergie lumineuse, permet la synthèse des sucres et de l'amidon (photosynthèse). Ensuite, le volume des vacuoles est important alors qu'elles restent discrètes dans une cellule animale; limitées par une membrane simple le *tonoplaste,* elles accumulent certains produits du métabolisme (sucres, tanins etc...). Enfin l'existence, autour du plasmalemme, d'une *paroi* rigide confère aux plantes certaines particularités biologiques ainsi qu'une bonne partie de leur intérêt industriel : celluloses, hémi-celluloses, pectines, lignines y sont localisées et les propriétés des parois jouent une part importante dans la qualité des bois ou des fourrages.

ULTRASTRUCTURE DES CELLULES MERISTEMATIQUES PRIMAIRES

Les cellules de l'anneau initial (fig. 9 et 10) ont une paroi mince dont la zone mitoyenne à deux cellules s'appelle la *lamelle moyenne.* Les parois sont ponctuées de petites ouvertures ou *plasmodesmes* qui font communiquer les cellules entre-elles par l'intermédiaire de ponts cytoplasmiques. Le cytoplasme renferme de très nombreux grains denses, les *ribosomes.* Ceux-ci, constitués de protéines et de RNA (acide ribonucléique), peuvent être libres ou groupés en rosettes, les polysomes; ils sont spécialisés dans la synthèse des protéines. Le long de la membrane plasmique, sont disposés des *microtubules* allongés d'environ 3 nm/0,02 nm de diamètre.

Le noyau,de 5 à 7 nm de largeur, occupe un volume important et renferme un (parfois deux) globule très réfringent sur le vivant; ce *nucléole* est très riche en RNA et certaines synthèses protéiques y ont lieu. Outre le (ou les) nucléole on distingue, sur les micrographies électroniques du noyau, des masses fibrillaires de *chromatine :* composée de protéines et de DNA, elle renferme la plupart des informations commandant le fonctionnement de la cellule. Le noyau est limité par une enveloppe double percée de pores. Cette double membrane nucléaire est en liaison avec un ensemble de cavités aplaties formant des nappes ou des tubules communiquant entre eux : ce *réticulum endoplasmique,* relativement peu développé dans une cellule méristématique, constitue une sorte de labyrinthe dans le cytoplasme dont il est séparé par une membrane ponctuée ou non de ribosomes; on parle alors de réticulum rugueux ou de réticulum lisse. Ces ribosomes jouent eux aussi un rôle actif dans la synthèse des protéines. A l'intérieur du réticulum s'accumulent et circulent nombre d'enzymes et de produits du métabolisme cellulaire. Certaines régions de réticulum donnent naissance à l'*appareil de Golgi* formé d'empilements plus ou moins importants de saccules aplatis (dictyosomes); ceux-ci émettent à leur périphérie des vésicules qui circulent dans le cytoplasme et peuvent déverser leur contenu à l'extérieur de la cellule ou bien dans les vacuoles (Prat et coll., 1977). Celles-ci sont très discrètes dans une cellule

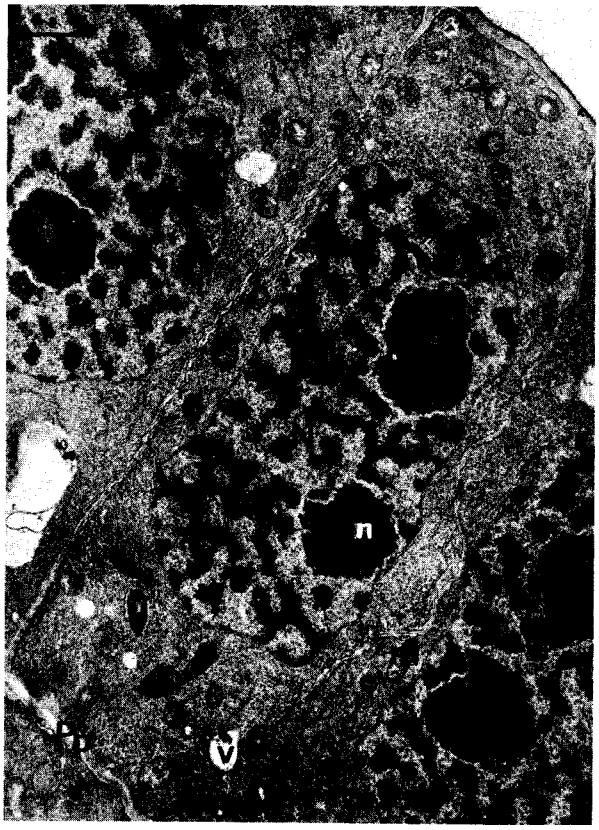


Fig. 9 — Micrographie d'une cellule de l'anneau initial du Blé. ch : chromatine; m : mitochondrie; N : noyau; n : nucléole; p : proplaste; Pp : paroi primaire; v : vacuole; G : appareil de Golgi. (Cliché N. Poux).

méristématique; leur origine est encore controversée mais il semble qu'elles proviennent, en premier lieu, de tubules de réticulum lisse ou de vésicules issues de l'appareil de Golgi (Marty, 1978). D'autres organites tels les peroxysomes, les lysosomes dérivent également du réticulum ou du Golgi. Il existe donc une *continuité* à la fois dans l'espace et dans le temps entre ces divers compartiments cytoplasmiques : réticulum, appareil de Golgi, lysosomes,vacuoles... Ceux-ci apparaissent comme des régions *spécialisées* d'un système membranaire en renouvellement constant; il se crée ainsi un véritable *flux membranaire* dans la cellule dont le point de départ est le réticulum : là se fait la synthèse de nouvelles membranes et, pour cette raison, le réticulum est appelé par certains auteurs le « méristème de la cellule » (Hanke, 1977).

Les mitochondries d'une cellule méristématique sont ovoïdes (0,5 X 1,5 nm environ) et relativement peu structurées; sites de la respiration cellulaire , elles fournissent l'énergie nécessaire à la vie de la cellule. Les plastes sont également petits (1 à 2 nm) et peu différenciés : ils ne comportent que quelques lamelles noyées dans le stroma; on les appelle alors des *proplastes*.

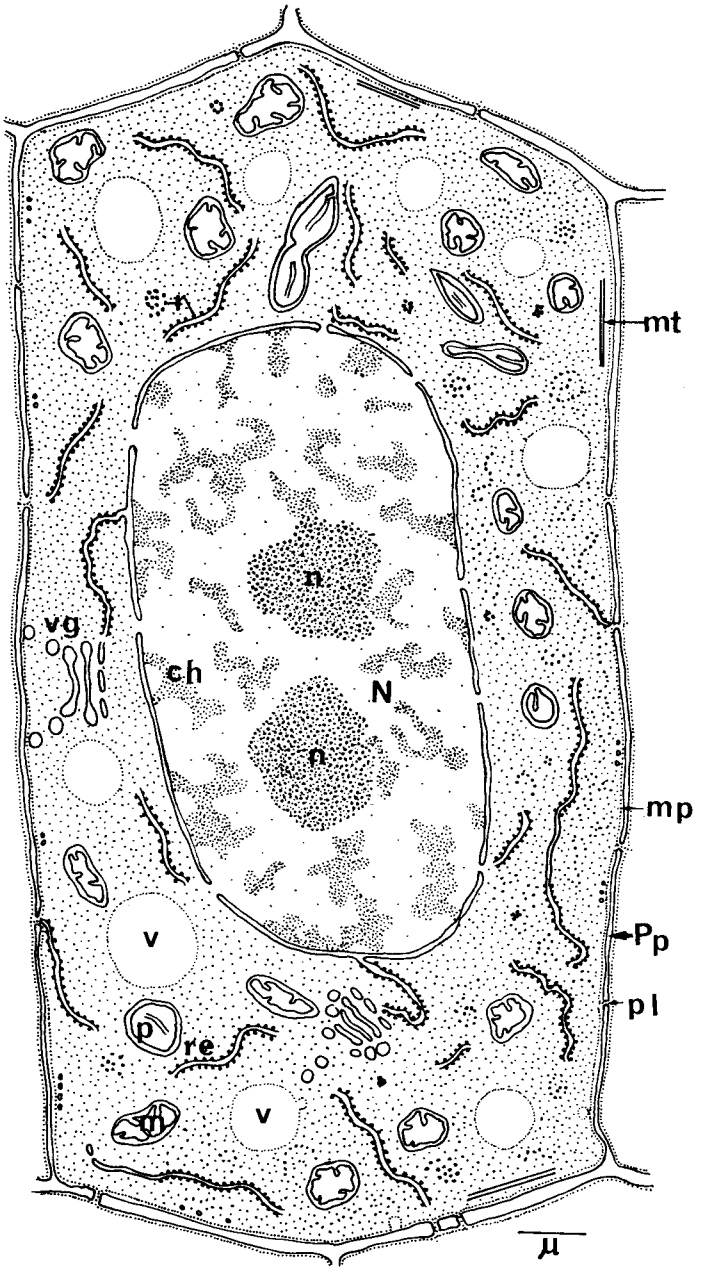


Fig. 10 – Schéma d'une cellule méristématique. Mêmes légendes que fig. 9. mp : membrane plasmique; mt : microtubule; pl : plasmodesme; r : ribosomes; re : reticulum endoplasmique; vg : vésicules golgiennes.

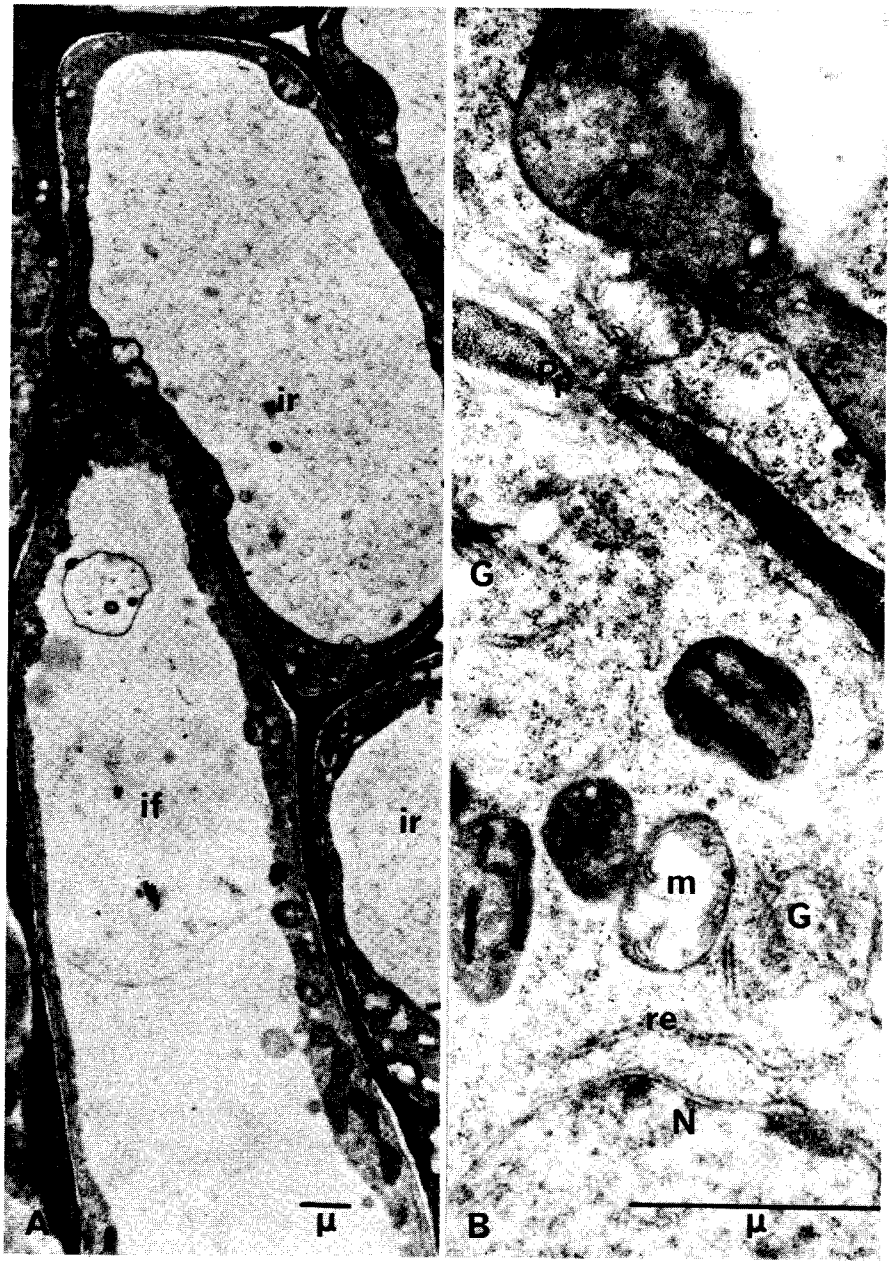


Fig. 11 — Caractères ultrastructuraux des cellules cambiales de Sycomore (coupe tangentielle). A : vue d'ensemble d'une initiale fusiforme (if) et de deux initiales radiales (ir). B : détail; en haut initiale fusiforme; en bas initiale radiale. Mêmes légendes que fig. 9 et 10.

ULTRASTRUCTURE DES CELLULES MERISTEMATIQUES SECONDAIRES

Comme les cellules de l'anneau initial, les cellules cambiales (fig. 8 et 11) sont caractérisées par une paroi mince et un cytoplasme dense, riche en ribosomes. Par contre leur appareil vacuolaire est très développé et refoule le cytoplasme à la périphérie de la cellule. Ces initiales longues possèdent un noyau étiré pourvu de plusieurs nucléoles. Les initiales courtes ont un noyau globuleux à un ou deux nucléoles. Les autres organites cellulaires ressemblent beaucoup à ceux que nous avons décrits au paragraphe précédent. Les plastes cependant peuvent, dans certains cas, posséder des thylakoïdes bien développés et de la chlorophylle. C'est le cas des initiales courtes du Sycomore, alors que les initiales longues ne possèdent que des proplastes.

DIFFERENCIATION D'UNE CELLULE MERISTEMATIQUE

Prenons le cas de l'évolution d'une cellule de l'anneau initial en parenchyme foliaire. La feuille mise en place par le méristème primaire croit d'abord par multiplication cellulaire puis par accroissement du volume des cellules. A la phase de prolifération succède une phase de différenciation marquée par plusieurs modifications concomitantes (fig. 12) :

— *extension puis épaississement des parois* accompagnés d'une importante activité golgienne; les vésicules golgiennes déversent à l'extérieur du plasmalemme les polysaccharides nécessaires à l'accroissement de la paroi; en même temps la membrane de ces vésicules en s'incorporant au plasmalemme augmente sa surface (Roland, ce volume); on appellera ici *paroi primaire* la paroi ainsi élaborée au cours de la croissance cellulaire;

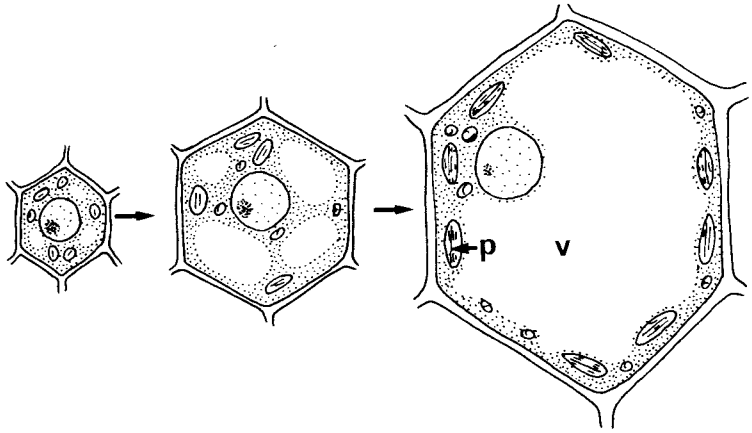


Fig. 12 — Schéma de la différenciation d'une cellule méristématique en cellule différenciée. p : plaste; v : vacuole.

— *augmentation du volume vacuolaire;* les petites vacuoles gonflent par apport de vésicules d'origine golgienne ou réticulaire (Prat et coll., 1977; Marty, 1978), puis fusionnent entre-elles; finalement, la majeure partie du volume de la cellule est occupée par une énorme vacuole tandis que le noyau et le cytoplasme, repoussés à la périphérie, sont étroitement appliqués contre la paroi; cette augmentation du volume vacuolaire résulte à la fois d'un accroissement du tonoplaste par le flux membranaire et d'une entrée d'eau dans une cellule de pression osmotique élevée (Prat et coll., 1977; Roland, ce volume);
— *différenciation des proplastes en chloroplastes;* les proplastes grossissent tandis que s'édifie un système complexe de thylakoïdes dans le stroma et que sont synthétisés pigments et enzymes nécessaires à la photosynthèse (Bourdu et Giraud, 1978).

Ainsi se réalise une cellule de parenchyme chlorophyllien (fig. 13) caractérisée par une grande vacuole et des chloroplastes gros (jusqu'à 300 nm^3), et nombreux. Le cytoplasme renferme relativement moins de ribosomes que dans une cellule méristématique; réticulum et appareil de Golgi sont également peu développés.

D'une façon générale, la différenciation d'une cellule végétale est la résultante de plusieurs processus caractéristiques :

1) un accroissement global du volume cellulaire accompagné d'un enrichissement en matériel membranaire;
2) une vacuolisation souvent très poussée;
3) une synthèse plus ou moins importante de matériel pariétal;
4) un développement préférentiel de certains organites cellulaires : par ex. chloroplastes pour le parenchyme assimilateur, plastes amylifères pour le parenchyme à réserves, appareil de Golgi ou réticulum pour une cellule sécrétrice ...
5) la biosynthèse de protéines et de composés caractéristiques du type de cellule réalisé : nouvelles enzymes, pigments, lignine, produits de sécrétion etc...

III. ULTRASTRUCTURE DE QUELQUES TISSUS VEGETAUX

La spécialisation acquise par certains tissus leur permet d'élaborer en grande quantité des produits ou des cellules que l'homme exploite à son profit : amidon, tanins, essences, latex, fibres, bois... Nous allons illustrer pour quelques cas les caractéristiques ultrastructurales de ces tissus : nous ne reviendrons pas sur les tissus de revêtement (épiderme et liège) que nous avons définis précédemment.

LES PARENCHYMES

On groupe sous ce terme général des tissus à structure cytologique simple. Leurs cellules très vacuolisées, à cytoplasme peu dense sont spécialisées surtout dans l'assimilation (parenchyme chlorophyllien, fig. 13) ou la mise en réserve. Ces réserves peuvent être des lipides apparaissant comme des globules au sein du

Fig. 13 — Cellule de parenchyme chlorophyllien de feuille de Tabac. a : amidon; m : mitochondries; N : noyau; p : plaste; v : vacuole. (Cliché Y. Lemoine).

cytoplasme, des protéines localisées dans le réticulum, la vacuole ou directement dans le cytoplasme; les polysaccharides existent à l'état soluble dans les vacuoles ou bien s'accumulent sous forme d'amidon dans les plastes : on parle alors de plastes amylifères ou amyloplastes. Dans le tubercule de pomme de terre par exemple, les amyloplastes sont énormes, dépassant 20 nm de diamètre, distendus par un gros grain d'amidon; la double membrane plastidale étirée à l'extrême est à peine reconnaissable et il n'existe plus ni stroma, ni thylakoïde.

On trouve des parenchymes dans les feuilles, l'écorce, la moelle ainsi que dans les tissus conducteurs.

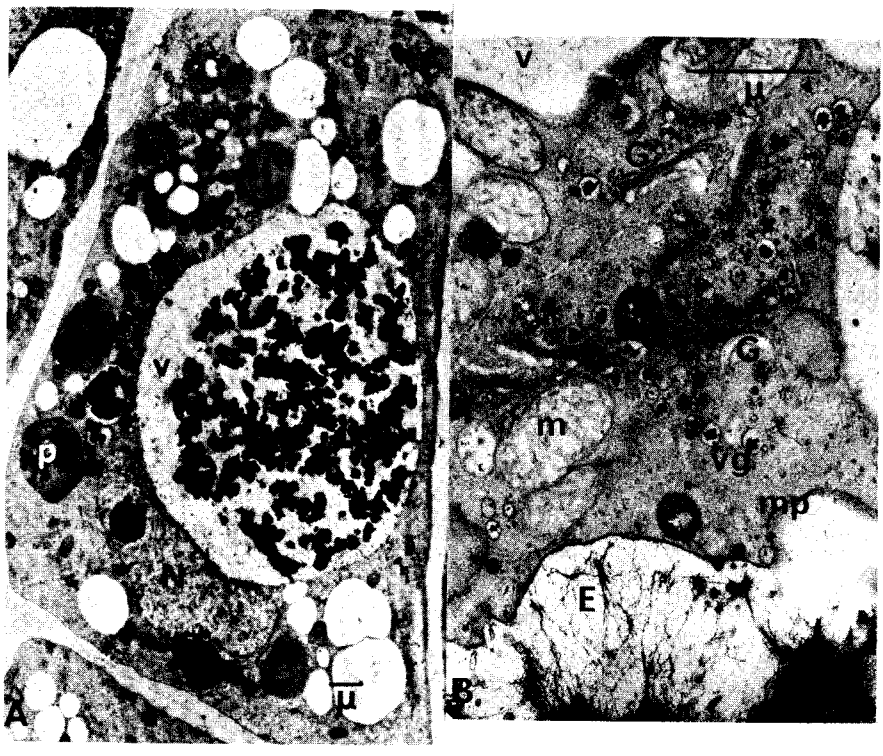


Fig. 14 — Cellules sécrétrices. A : cellule à tanins de Pommier; ceux-ci apparaissent sous forme de précipités denses dans la vacuole v. B : cellule d'Oeillet sécrétant des polysaccharides; ceux-ci, contrastés par la réaction PATAg (cf Roland, chapitre suivant), apparaissent noirs sur la micrographie. E : espace entre la paroi et la membrane plasmique mp. Autres légendes : cf. 9 et 10.

TISSUS SECRETEURS

Certaines cellules élaborent en grande quantité des produits qui peuvent être sécrétés à l'extérieur de la cellule (nectar, résine) ou bien stockés à l'intérieur, souvent dans la vacuole (tanins, latex). Ces cellules peuvent être soit isolées dans le parenchyme (cellules à tanins, fig. 14 A), sur l'épiderme (poils sécréteurs), soit réunies en un réseau complexe (cellules formant du latex ou laticifères, chez le Pavot, l'Hévea), soit groupées autour d'une cavité où elles déversent leur sécrétat (poches à essence de l'écorce d'orange; canaux à résine du Pin *par ex.*). Les produits de sécrétion polysaccharidiques (nectars, mucilages) sont d'origine golgienne (fig. 14 B); dans le réticulum sont élaborés ou transitent les sécrétions terpéniques (essences, résines) ou polyphénoliques. Ainsi une cellule sécrétrice est-elle presque toujours caractérisée par un important développement de l'appareil de Golgi ou du réticulum durant la phase de sécrétion.

TISSUS DE SOUTIEN

Ils sont caractérisés par des parois épaisses et résistantes. Lorsque cette paroi demeure cellulosique, on parle de *collenchyme*; lorsqu'elle est imprégnée de lignine, il s'agit de *sclérenchyme*. Les cellules de soutien peuvent être plus ou moins allongées dans le sens de l'axe de l'organe. Lorsqu'elles sont très longues par rapport à leur diamètre, elles sont appelées *fibres*.

a) Le collenchyme

Nous avons vu (p. 5) que les premières cellules de collenchyme apparaissaient précocement sous l'épiderme de la tige de Sycomore : c'est en effet un tissu qui se différencie pendant la croissance. Les parois primaires s'épaississent considérablement tandis que s'allonge la cellule grâce à une production intense de polysaccharides par l'appareil de Golgi. Dans le collenchyme différencié, les parois sont constituées de très nombreux feuillets concentriques de fibrilles cellulosiques alternativement perpendiculaires et parallèles à l'axe de la cellule. Ces parois demeurent extensibles et permettent l'élongation de l'organe. La cellule reste vivante et peut renfermer des chloroplastes (fig. 15).

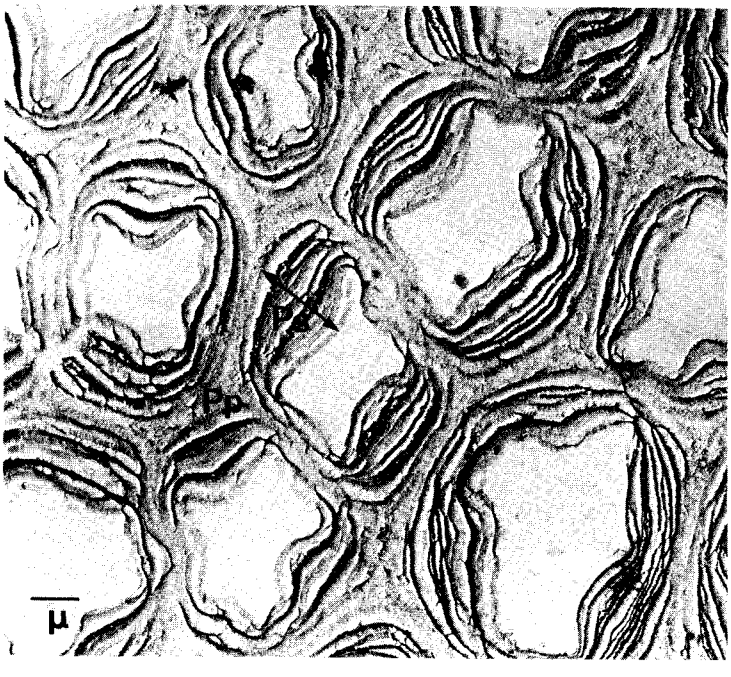


Fig. 15 — Collenchyme d'un pétiole de Carotte; coupe transversale examinée au microscope électronique après ombrage. Noter l'épaisseur de la paroi secondaire (Ps) formée de plusieurs couches. Pp : paroi primaire. (Cliché J.C. Roland).

b) Le sclérenchyme

On regroupe sous ce nom des cellules de formes assez diverses et caractérisées par une paroi très dure ($\sigma\kappa\lambda\epsilon\rho os$ = dur). Lorsque la croissance cellulaire est achevée, il s'ajoute à la paroi primaire une nouvelle couche pariétale constituée de strates de fibrilles cellulosiques très serrées : c'est la paroi secondaire. Ultérieurement, l'ensemble se lignifie et le contenu cellulaire dégénère plus ou moins vite. Le sclérenchyme peut être polyédrique comme celui qui forme la paroi de la noisette, le noyau des cerises ou le chaume des Céréales; il peut aussi constituer de longues fibres (fig. 16) : 5 centimètres chez le Lin, 22 chez la Ramie.

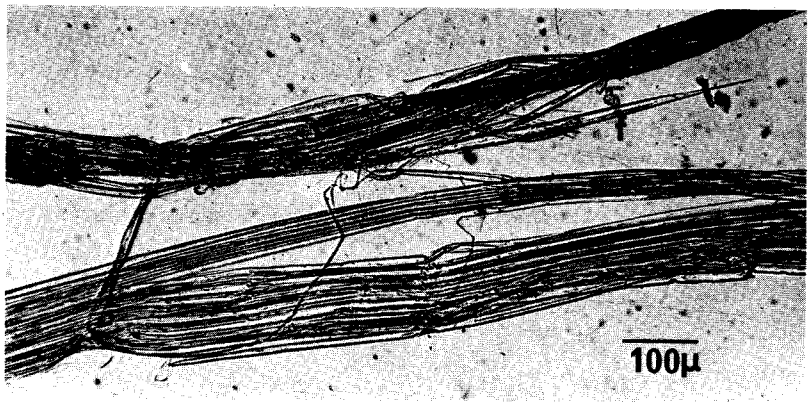


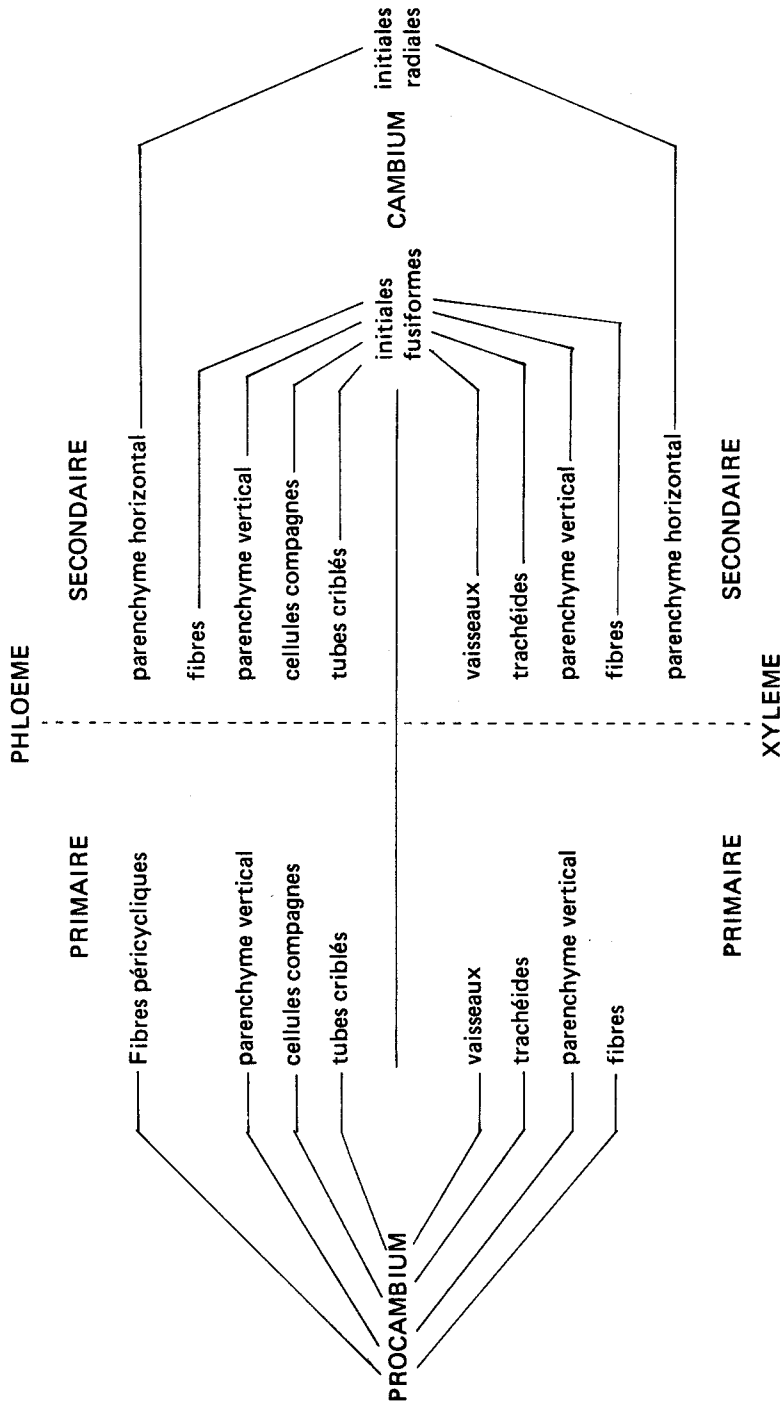
Fig. 16 — Faisceau de fibres (f) de céleri, plus ou moins dilacéré.

LES TISSUS CONDUCTEURS

Xylème et phloème sont des tissus complexes, c'est-à-dire formés par des ensembles de cellules à caractères et à rôles particuliers. On y distingue des cellules conductrices proprement dites : les tubes criblés dans le phloème, les trachéides (fermées à leurs extrémités) et les vaisseaux (ouverts à leurs extrémités) dans le xylème. Il s'y adjoint des parenchymes ayant souvent un rôle de réserve : parenchyme vertical aux cellules étirées dans l'axe de l'organe, parenchyme horizontal allongé perpendiculairement. Enfin des fibres renforcent la résistance de ces tissus (tableau I). Les parois des cellules phloémiennes demeurent cellulosiques sauf celles des fibres. Dans le xylème, fibres, trachéides et vaisseaux sont toujours lignifiés, les cellules parenchymateuses peuvent rester cellulosiques chez les plantes herbacées. Il se développe en général dans toutes ces cellules une paroi secondaire. De place en place, celle-ci ne se dépose pas : seule la paroi primaire cellulosique sépare les deux cellules adjacentes; on appelle ponctuation ces zones déprimées particulières. Elles renferment de nombreux plasmodesmes lorsqu'elles sont situées entre deux cellules vivantes (fig. 17 page 20).

TABLEAU I

Origine des divers types cellulaires des tissus conducteurs.



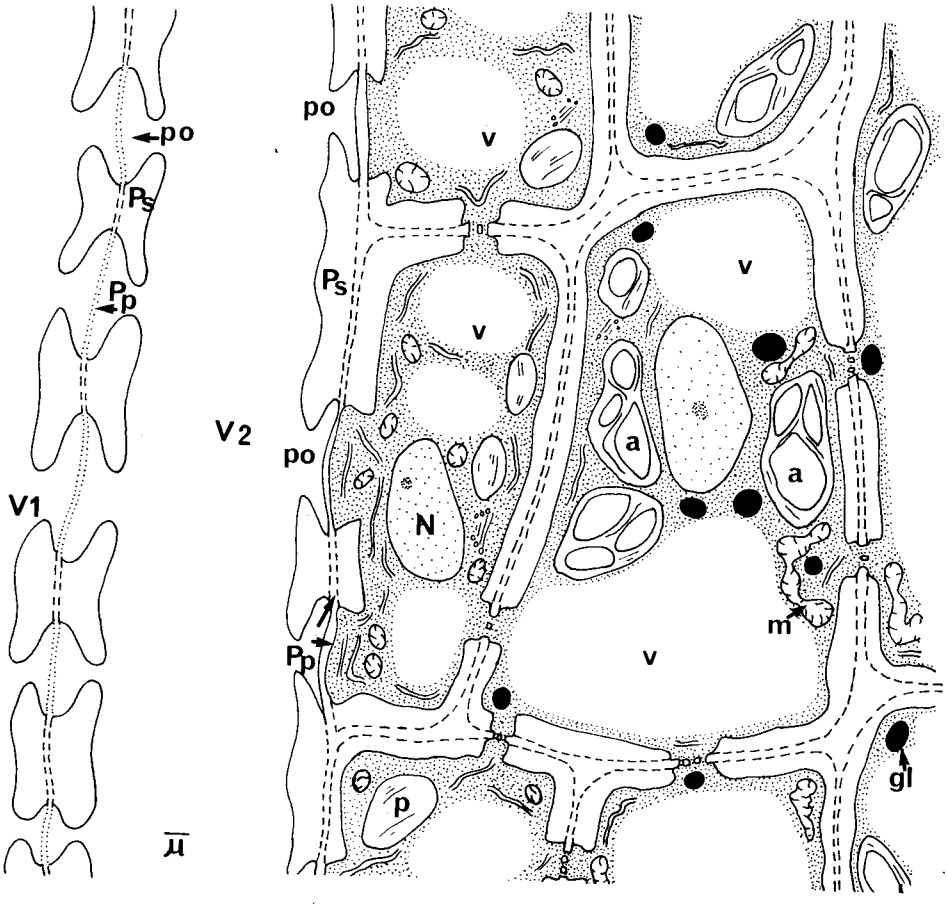
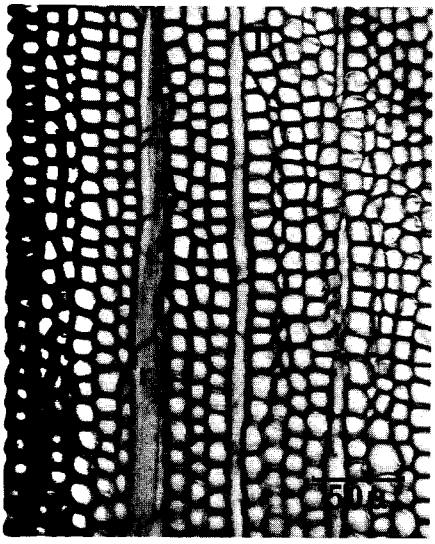


Fig. 17 — Schéma d'un fragment de coupe longitudinale de bois montrant deux vaisseaux (V_1 et V_2) et plusieurs cellules de parenchyme. gl : globule lipidique; po : ponctuation; Pp : paroi primaire; Ps : paroi secondaire. Autres légendes cf fig. 9 et 10.

Les tubes criblés sont des cellules vivantes mais dépourvues de noyau; chez les plantes pérennantes ils vivent rarement plus d'une saison sauf chez la Vigne par exemple. Les vaisseaux et les trachéides meurent à la fin de leur différenciation et restent rarement fonctionnels plus d'une année. Les fibres peuvent également dégénérer à leur maturité ou bien demeurer vivantes et servir de cellules à réserves pendant un ou deux ans. Les parenchymes restent vivants plusieurs années; ils accumulent à l'automne des réserves (amidon, lipides, protéines) utilisées au printemps lors du débourrage des bourgeons, avant la reprise de la photosynthèse. Dans un arbre ou un arbuste, les parties les plus âgées du phloème sont écrasées et exfoliées (p. 8); le bois récent contenant de nombreuses cellules vivantes constitue l'aubier, le bois plus ancien où toutes les cellules sont mortes est le bois de cœur.

Chez les Conifères la structure du bois est relativement simple car il ne comprend que des trachéides, des rayons de parenchyme horizontal et, le cas échéant, les cellules sécrétrices bordant les canaux à résine : c'est un *bois homoxylé* (fig. 18 A) caractérisé par une certaine homogénéité des cellules. Chez les plantes à fleurs au contraire, le bois est très hétérogène puisqu'il est constitué de vaisseaux, de trachéides, de fibres, de parenchyme horizontal et vertical : c'est un *bois hétéroxylé* (fig. 18 B).



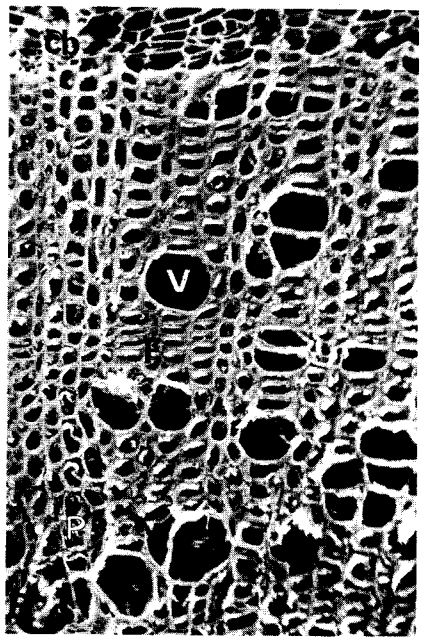


Fig. 18 — Aspect en coupe transversale de bois différents. A : bois homoxylé de Pin à crochets; r : rayon de parenchyme horizontal; T : trachéide. B : bois hétéroxylé de Sureau avec de gros vaisseaux V, des fibres F et des cellules de parenchyme P de plus faible diamètre; cb : cambium. (Cliché J.C. Roland obtenu par microscopie à balayage).

IV. UN EXEMPLE DE DIFFERENCIATION : BIOGENESE DES PAROIS LIGNIFIEES

L'importance du matériau bois a provoqué bon nombre d'études concernant l'architecture des parois lignifiées. Actuellement, l'organisation de la matrice polysaccharidique commence à être connue comme Roland l'explique dans ce livre mais les relations spatiales entre lignine et polysaccharides restent encore mal comprises. Un moyen d'approche de ce problème est de suivre conjointement, grâce aux techniques récentes de cytochimie ultrastructurale, la mise en place des divers constituants pariétaux au cours de la différenciation des cellules ligneuses.

CARACTERES ULTRASTRUCTURAUX DES PAROIS LIGNIFIEES

L'analyse biochimique des parois lignifiées montre une composition globale qui est d'environ 50 % de cellulose, 30 % de lignine, 10 % d'hémicelluloses, plus des pectines. Mais ces différentes substances ne sont pas réparties de façon uniforme, comme en témoignent les tableaux II et III. On constate que la teneur en pectines, en hémicelluloses et, d'une façon générale, le matériel matriciel isotrope diminuent depuis la lamelle moyenne jusque dans la paroi secondaire alors que c'est l'inverse pour la cellulose et toutes les substances fibrillaires anisotropes. Analyse chimique, fluorescence, spectrophotométrie ultraviolette montrent que la lignine est également beaucoup plus abondante dans la lamelle moyenne et la paroi primaire : dans les trachéides d'*Epicea* par exemple, on y trouve près de 70 % de la teneur totale en lignine (voir Frey-Wyssling, 1976; Preston, 1974). C'est ce que confirment les observations en microscopie électronique (fig. 19).

La structure de la paroi secondaire qui résulte de la texture parallèle des microfibrilles d'un même feuillet varie suivant les cellules. Elle est simple dans les vaisseaux, sauf exception, tandis qu'elle révèle dans les fibres et les trachéides plusieurs couches classiquement appellées S_1, S_2, S_3 qui peuvent elles mêmes être subdivisées (cf. Roland dans ce livre). Cellulose et lignine constitueraient deux matrices s'interpénètrant où la lignine serait plus concentrée suivant des lignes radiales ou des lamelles concentriques (Nečessany et coll., 1965; voir Preston, 1974). Comme la délignification ne modifie pas le diagramme de diffraction aux rayons X de la cellulose, il semble bien que la lignine soit déposée à l'extérieur et non à l'intérieur de la microfibrille de cellulose (voir Preston, 1974). La question se pose toutefois de savoir si elle enrobe chaque microfibrille ou s'il existe des couches alternées de cellulose et de lignine.

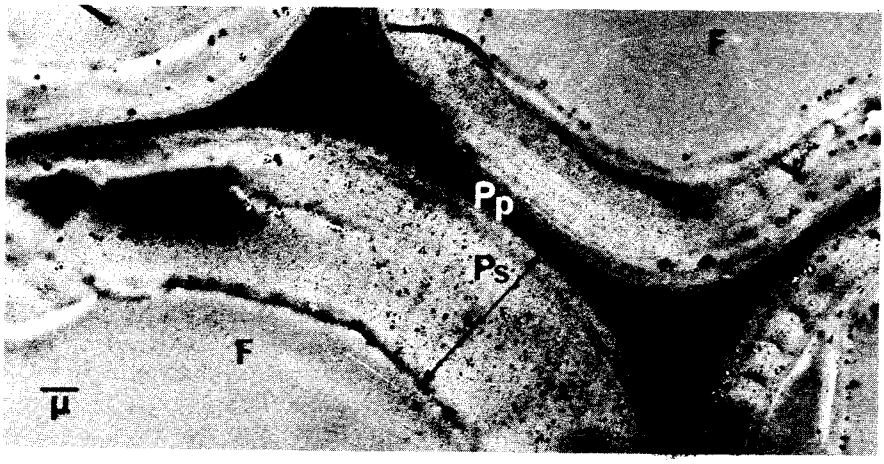


Fig. 19 — Coupe transversale de fibres (F) d'Oeillet vues au microscope électronique. La lignine réagit avec le réactif de Coppick et Fowler en donnant des précipités d'argent : ceux-ci sont beaucoup plus abondants dans la paroi primaire (Pp) que dans la paroi secondaire (Ps). (Cliché Y. Czaninski).

TABLEAU II

Variation de la composition de la paroi cellulaire au cours de la différenciation d'une cellule cambiale de Sycomore en fibre-trachéide.
(d'après D.H. Northcote, Symp. Soc. Exp. Biol., 17, 157-174).

	Cellule cambiale (mμg)	Fibre trachéide (mμg)
Substances pectiques	2,3	5,8
Cellulose	5,6	62,8
Hémicellulose	6,9	49,5
Lignine	–	39,7
Poids total de la paroi/1 cellule	15,3	160,0

TABLEAU III

Pourcentage de polysaccharides dans les différentes couches de la paroi d'une fibre
(d'après Preston, 1974).

Polysaccharides	Paroi primaire	Paroi secondaire		
	%	S_1 %	S_2 partie externe %	$S_2 + S_3$ partie interne %
Bouleau				
Galactane	16,9	1,2	0,7	0,0
Cellulose	41,4	49,8	48,0	60,0
Glucomannane	3,1	2,8	2,1	5,1
Arabinane	13,4	1,9	1,5	0,0
Glucuronoxylane	25,2	44,1	47,7	35,1
Epicéa				
Galactane	20,1	5,2	1,6	3,2
Cellulose	35,2	61,5	66,5	47,5
Glucomannane	7,7	16,9	24,6	27,2
Arabinane	29,4	0,6	0,0	2,4
Arabinoglucuronoxylane	7,3	15,7	7,4	19,4

La cytochimie ultrastructurale révèle des différences entre paroi primaire et paroi secondaire (Czaninski, 1979) qui réflètent peut-être la diversité d'organisation du complexe lignine-polysaccharides. Ces derniers sont faciles à mettre en évidence par les réactifs appropriés dans les parois primaires qu'elles soient lignifiées ou non; entre deux vaisseaux une hydrolyse partielle a lieu dans la

paroi des ponctuations où ne subsistent que les pectines acides méthylées (fig. 20). Par contre, dans les parois secondaires lignifiées, une réaction nulle ou très faible est obtenue avec le PATAg, ce qui indique que les radicaux vic-glycols ne sont pratiquement plus accessibles : ceci peut être dû au degré de cristallisation des polysaccharides, à une trop grande compaction des fibrilles ou bien à un masquage des vic-glycols par diverses substances; dans cette paroi secondaire, la lignine semble constituer des strates parallèles de périodicité voisine de 10 nm, ce qui est la largeur d'une fibrille élémentaire de cellulose (Czaninski, 1979; Frey-Wyssling, 1976). La disposition de la lignine ne semble pas aussi régulière dans la paroi primaire.

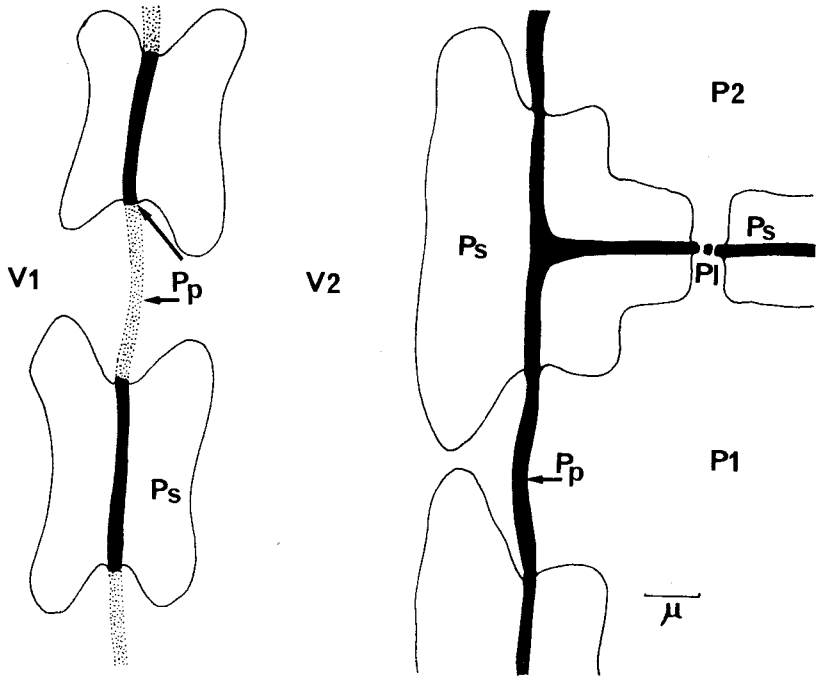


Fig. 20 — Schéma montrant la structure des parois entre vaisseaux (V_1, V_2) entre vaisseaux et cellules de parenchyme, ou entre cellules de parenchyme (P_1, P_2). Après le réactif PATAg, la paroi primaire (Pp) est bien constrastée sauf au niveau des ponctuations entre 2 vaisseaux; la paroi secondaire (Ps) n'est pratiquement pas contrastée (comparer à la figure 17).

ELABORATION ET LIGNIFICATION DE LA PAROI AU COURS DE LA DIFFERENCIATION D'UNE CELLULE LIGNEUSE

Prenons comme exemple un vaisseau où la structure de la paroi secondaire est relativement simple. Les différentes phases de la différenciation de cette cellule à partir d'une cellule procambiale ou d'une initiale fusiforme sont caractérisées par (fig. 21) :

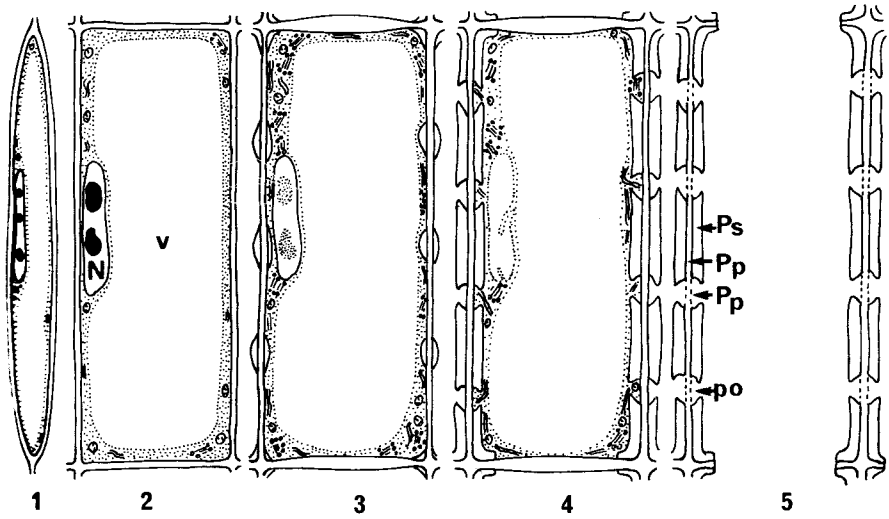


Fig. 21 — Schéma de la différenciation d'un vaisseau à partir d'une initiale fusiforme du cambium. 1 : cellule initiale; 2 : accroissement du volume cellulaire et nucléaire; 3 : prolifération golgienne; début de la formation de la paroi secondaire; début de dégénérescence nucléaire; 4 : les épaississements secondaires sont en cours de lignification; la dégénérescence nucléaire s'achève; 5 : vaisseau complétement différencié; le cytoplasme a été totalement hydrolysé. Pp : paroi primaire; Ps : paroi secondaire; po : ponctuation; N : noyau; v : vacuole.

— une importante augmentation du volume cellulaire,
— un accroissement du volume nucléaire suivi d'une dégénérescence du noyau,
— l'élaboration d'une paroi secondaire discontinue au niveau des ponctuations,
— la lignification des parois primaires et secondaires,
— la dégénérescence du cytoplasme et l'hydrolyse totale des parois transversales.

A la fin de la phase d'accroissement cellulaire, débute une période d'intense activité golgienne au cours de laquelle le contenu polysaccharidique des vésicules est incorporé à la paroi (fig. 22). Les épaississements secondaires ne sont cependant pas mis en place de façon quelconque : ils constituent des dessins caractéristiques (annelés, spiralés, rayés, ponctués) qui varient suivant l'âge de l'entrenœud et l'espèce. Les zones privilégiées où se font les dépôts sont marquées par l'abondance des microtubules (Hepler et Newcomb, 1964; Hepler et Foskett, 1971, Wooding et Northcote, 1964; cf. Roland, ce volume); la destruction de ceux-ci, par la colchicine par exemple, entraine une élaboration anarchique de la paroi secondaire (Hepler et Foskett, 1971; Brower et Hepler, 1976). Au moment de l'édification des ornementations secondaires, débute l'incrustation par la lignine de la lamelle moyenne puis de la paroi primaire. Elle gagne ensuite le reste de la paroi. Les précipités d'argent de la réaction de Coppick et Fowler (cf. Czaninski, 1979) caractérisant la lignine sont d'abord légers et diffus; ils deviennent abondants le long de la paroi primaire puis s'étendent progressivement à toute l'ornementation secondaire, montrant une disposition en couches parallèles lorsque l'angle des coupes est favorable. Au fur et à mesure que se dépose la

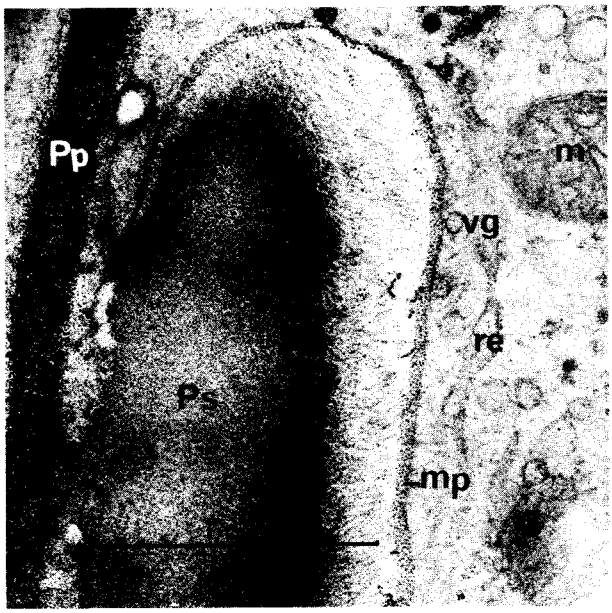


Fig. 22 — Micrographie électronique d'un vaisseau de Sycomore en cours de différenciation (fin du stade 3 de la fig. 21). Les polysaccharides sont contrastés par le PATAg. Pp : paroi primaire; Ps : paroi secondaire. Cette dernière se constitue grâce à l'apport de matériel par les vésicules golgiennes, vg, qui viennent s'ouvrir au niveau de la membrane plasmique mp. La partie basale de l'épaississement secondaire, en cours de lignification, est moins contrastée que la partie interne en cours d'édification. G : appareil de Golgi; m : mitochondrie; re : réticulum endoplasmique.

lignine la réaction PATAg, caractéristique des groupements vic-glycols, s'atténue puis s'annule presque complètement (fig. 23). Pour l'instant, nous ne pouvons dire s'il y a là une relation de cause à effet (Catesson et Czaninski, résultats non publiés).

La lignification n'est donc pas simultanée du dépôt des polysaccharides, mais le suit plus ou moins rapidement. C'est encore plus net pour les trachéides que pour les vaisseaux; dans les premières, chaque couche pariétale, S_1, S_2, S_3, est édifiée bien avant que ne commence la lignification : la couche S_3 peut être achevée avant que S_2 ne soit lignifiée (voir Preston, 1974).

La réaction de Coppick et Fowler conserve mal les ultrastructures cytoplasmiques et ne peut donc être utilisée pour rechercher les précurseurs de la lignine ni pour identifier les organites responsables des diverses phases de sa biosynthèse (voir Monties, ce volume). Des expériences assez anciennes (Pickett-Heaps, 1968) ont localisé des précurseurs marqués (phénylalanine, acide cinnamique) à la fois dans le réticulum et l'appareil de Golgi avant de montrer leur incorporation dans la paroi. Des travaux biochimiques plus récents ont reconnu la présence des enzymes de la biosynthèse des composés phénoliques dans la fraction microsomale du cytoplasme, essentiellement composée du réticulum et de l'appareil de

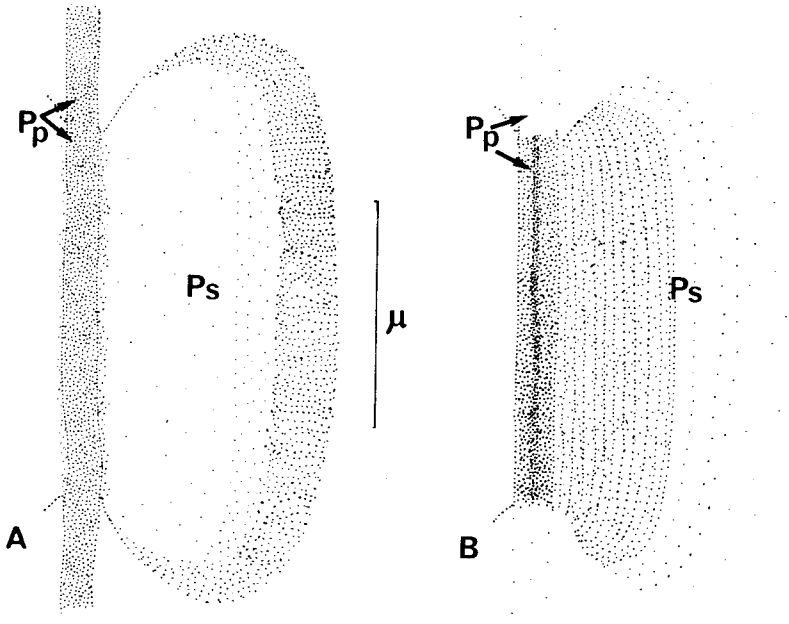


Fig. 23 — Schéma permettant de comparer les réactions obtenues avec le réactif PATAg pour les polysaccharides (A) et avec celui de la lignine (B) lors de l'édification de la paroi secondaire des vaisseaux. Le stade correspond à celui de la figure 22. Dans les deux cas la paroi primaire (Pp) est bien marquée tandis que, dans la paroi secondaire (Ps), seule la frange interne, non encore lignifiée, donne une réaction intense avec le PATAg.

Golgi (Alibert et coll., 1977; Czichi et Kindl, 1977). Tout récemment, ces enzymes ont été localisées en abondance sur la fraction « réticulum » (Herdt et Wierman, 1978). Il semble donc que les premières étapes de la biosynthèse des polyphénols aient lieu au niveau du réticulum mais il n'existe pas encore d'argument définitif suggérant que leur transit vers la paroi se fasse plutôt par la voie réticulaire que par la voie golgienne. Etant donné l'imprécision relative des techniques utilisées jusqu'ici pour trancher cette question, une autre approche pourrait être l'étude de la localisation infrastructurale des diverses enzymes impliquées dans la biosynthèse de la lignine. Parmi ces enzymes, les seules à pouvoir être facilement localisées par des techniques cytoenzymologiques sont les peroxydases. Elles agissent à la fin de la biosynthèse en assurant la polymérisation oxydative des acides cinnamiques (voir Monties, ce volume). En microscopie à la lumière (fig. 24), il est facile de localiser dans les parois en cours de lignification des peroxydases réagissant avec les fonctions syringiles (Catesson et coll., 1978). La transposition à l'échelle ultrastructurale ne permet pas d'utiliser des substrats aussi spécifiques : dans les parois primaires, il est peu aisé de distinguer les isozymes intervenant dans la lignification parmi toutes les peroxydases qui y sont particulièrement abondantes; dans les parois secondaires en fin d'élaboration il n'existe qu'une activité peroxydasique transitoire vraisemblablement liée à la biosynthèse de la lignine.

*

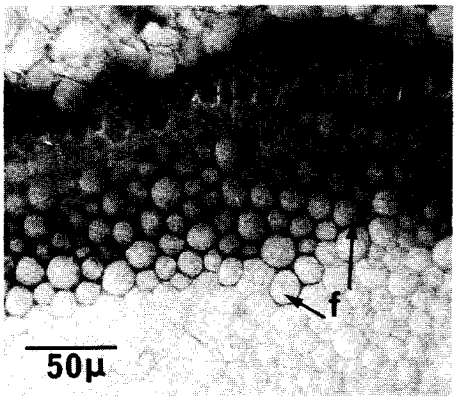


Fig. 24 — Coupe transversale d'une tige d'Oeillet en croissance. Mise en évidence de peroxydases agissant sur le radical syringyl (oxydation de la syringaldazine en présence d'H_2O_2) dans les fibres en cours de différenciation (f). F : fibres déjà différenciées.

L'élaboration de la paroi secondaire et sa lignification illustrent bien l'un des caractères de la différenciation cellulaire : certaines voies de biosynthèse disparaissent, celle des pectines dans le cas du xylème par exemple, tandis que d'autres, spécifiques, se mettent en place, telle ici la production des enzymes du métabolisme des phénylpropanes. L'induction d'une nouvelle voie métabolique spécialisée exprime des potentialités cellulaires jusque là réprimées dont la manifestation est contrôlée par un certain équilibre des régulateurs de croissance.

Les tentatives actuelles d'analyser les diverses étapes de cette différenciation à l'aide de techniques très diverses (biochimiques, biophysiques, cytochimiques, ultrastructurales, etc...) constituent une approche intéressante pour essayer de comprendre l'architecture moléculaire des parois lignifiées, les facteurs qui la contrôle et apprécier ultérieurement ce qui détermine les qualités des bois.

V. CONCLUSION

La différenciation est un processus conduisant à une modification stable et, en principe, irréversible de la structure et du métabolisme d'une cellule en vue d'accomplir une fonction particulière. Cependant, chez les végétaux, la différenciation n'est pas toujours acquise définitivement et nombre de cellules peuvent faire retour à un état méristématique : ce phénomène de dédifférenciation est à la base, entre autres, de la multiplication végétative et du bouturage des plantes. Par contre les cellules conductrices de la sève, et le bois de façon plus générale, sont de bons exemples de différenciation irréversible.

Les diverses étapes de la différenciation sont soumises au contrôle génétique de la cellule et sont modulées par l'action des régulateurs de croissance produits par la plante. Elles sont également influencées par l'environnement : par exemple, la lumière, la sécheresse favorisent le développement des tissus conducteurs et la lignification.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ouvrages généraux

BACH D., MASCRE M. et DEYSSON G. (1967) – *Cours de Botanique générale,* T. II : Organisation et classification des plantes vasculaires, Sedes éd., 340 pages.

BUVAT R. (1969) – *La cellule végétale,* Hachette éd., 255 pages.

DURAND M. et FAVARD P. (1967) – *La cellule,* Herman éd., 223 pages.

ESAU K. (1965) – *Plant anatomy,* J. Wiley et Sons, N.Y., 767 pages.

FAHN A. (1969) – *Plant anatomy,* Pergamon Press, Oxford, 534 pages.

ROLAND J.C. et ROLAND F. (1977) – *Atlas de biologie végétale,* Masson éd., 107 pages.

ROLAND J.C., SZOLLOSI A. et SZOLLOSI D. (1974) – *Atlas de biologie cellulaire,* Masson éd., 115 pages.

2. Références

ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET A.M. (1977) – *Physiologie végétale,* **15,** 279-301.

BOURDU R. et GIRAUD G. (1978) – In : *Photosynthèse et production végétale,* C. Costes éd., Gauthier-Villars, p. 2-32.

BROWER D.L. and HEPLER P.K. (1976) – *Protoplasma,* **87,** 91-112.

CATESSON A.M., CZANINSKI Y. et MONTIES B. (1978) – *C.R. Acad. Sc.,* **286,** D, 1787-1790.

CZANINSKI Y. (1978) – *C.R. Acad. Sc.,* **286,** D, 957-959.

CZANINSKI Y. (1979) – *Biologie cellulaire,* **35,** 97-102.

CZICHI U. and KINDL H. (1977) – *Planta,* **134,** 133-143.

FREY-WYSSLING A. (1976) – *The plant cell wall,* Gebrüder Borntraeger, 294 pages.

HANKE D. (1977) – In : *The molecular biology of plant cells,* H. Smith ed., 182-207.

HEPLER P.K. and FOSKET D.E. (1971) – *Protoplasma,* **72,** 213-236.

HEPLER P.K. and NEWCOMB E.H. (1964) – *J. Cell Biol.,* **20,** 529-533.

HERDT E. und WIERMAN R. (1978). *Protoplasma,* **96,** 283-292.

MARTY F. (1978) – *Proc. Nat. Acad. Sc. US.,* **75,** 852-856.

NECESSANY V., JURASEK L., SOPKO R. and BOBAK M. (1965) – *Nature,* **206,** 639.

PICKETT-HEAPS J.D. (1968) – *Protoplasma,* **65,** 181-205.

PRAT R., VIAN B., REIS D. et ROLAND J.C. (1977) – *Biologie Cellulaire,* **28,** 269-280.

PRESTON R.D. (1974) – *The physical biology of plant cell walls,* Chapman and Hall ed., 491 pages.

WOODING F.B.P. and NORTHCOTE D.H. (1964) – *J. Cell Biol.,* **23,** 327-337.

clic here for
the next

J.C. ROLAND

Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales

On oppose classiquement les « cellules nues » des animaux, dont le cytoplasme est seulement limité par une membrane, la membrane cytoplasmique ou *plasmalemme,* aux « cellules revêtues » des plantes et des bactéries qui secrètent autour de leur plasmalemme une *paroi* rigide et résistante.

Des observations récentes modifient sensiblement les connaissances sur le rôle et la structure de la surface des cellules des deux règnes du monde vivant. Dans les cellules animales, les études cytochimiques, biochimiques, immunologiques ont montré que le plasmalemme est en effet revêtu sur son versant externe d'un « manteau » (le cell-coat des auteurs anglosaxons, également appelé *glycocalyx*). Ce revêtement est de nature glucidique et glycoprotéique. Il joue un rôle d'intermédiaire actif, recevant des informations extérieures qui sont ensuite transmises au cytoplasme. Il est très apparent en microscopie électronique dans les cellules animales assurant des échanges intenses. Certaines possèdent des émergences fibrillaires polysaccharidiques longues et structurées (Protistes, cellules intestinales, tissu conjonctif, etc).

Chez les plantes, la paroi est une formation quasi constante; elle leur confère des propriétés mécaniques particulières. Très rares sont les cellules qui en sont dépourvues (gamètes et spores nageuses des Cryptogames, plasmode de Myxomycètes...).

La paroi forme, entre le milieu et le contenu protoplasmique,un système tampon, voire un écran, qui intervient de multiples façons dans la vie des tissus et des organes. Elle correspond à un véritable « milieu intérieur » pour la plante. C'est dans ce compartiment que le cytoplasme puise les diverses substances nécessaires à son métabolisme et rejette les composés — sécrétions et déchets — qu'elle élabore. Perméable à l'eau et aux métabolites, la paroi s'oppose à la pression osmotique interne et assure la turgescence et le maintien de l'organisme. Les cellules jeunes qui sortent de l'état méristématique, sont en outre capables de s'accroître de façon considérable et rapide; elles se trouvent donc logées dans une enveloppe à la fois résistante et extensible, ce qui implique une organisation et des mécanismes régulateurs très précis. Ultérieurement, lorsque la croissance a cessé, des modifications structurales et chimiques apparaissent qui contribuent en général de façon essentielle à donner la spécificité fonctionnelle de chaque tissu. Pour sa plus grande part la paroi est de nature polysaccharidique.

I. LES NIVEAUX PRINCIPAUX DES PAROIS

Le microscope photonique a permis de distinguer plusieurs régions dans la paroi (fig. 1 et 2). La *lamelle moyenne* est la formation la plus périphérique. Dans les tissus, elle est commune aux cellules contigües et forme un *ciment* constitué de polysaccharides acides, les pectines. Ainsi, les cellules sont entourées par une enveloppe hydrophile polyanionique. Par ses propriétés physicochimiques, la lamelle moyenne conditionne la cohésion intercellulaire. Cette dernière est en général forte (méristème, tissus conducteurs, tissus de soutien, épiderme...); parfois les pectines se dissocient et les cellules se trouvent isolées les unes des autres. Ce phénomène qui résulte de l'activité d'enzymes pectinolytiques secrétées par le cytoplasme intervient à des moments très précis et déterminants dans la vie des cellules (tissus sporifères, lenticelles, coiffe des racines, tissus d'abscission permettant la chute des feuilles, etc).

L'observation des cultures *in vitro* montre que les propriétés de la lamelle moyenne sont génétiquement fixées (« cultures friables » dont les cellules se

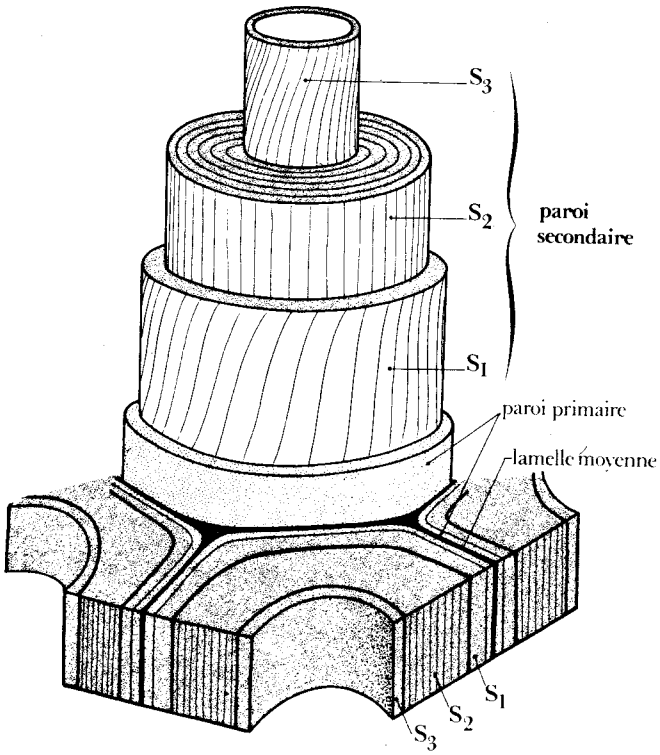


Fig. 1 — Vue perspective d'une paroi disséquée montrant les différents niveaux.

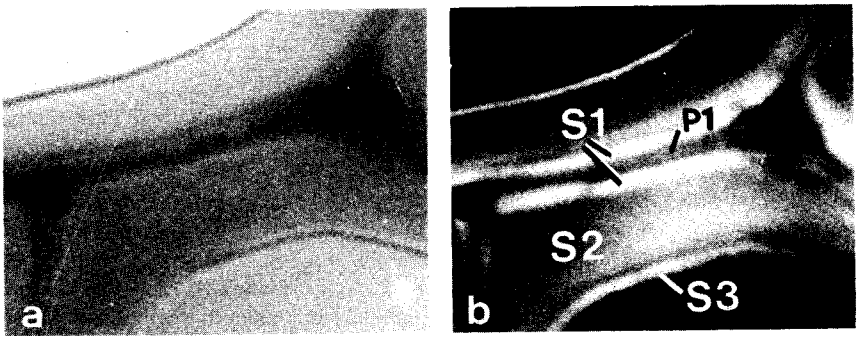


Fig. 2 — Strates S_1, S_2 et S_3 d'une paroi secondaire. Trachéide du bois de pin (x 1 500).
a) Coupe transversale en lumière naturelle.
b) *Idem* en lumière polarisée.
P_1 : paroi primaire et lamelle mitoyenne.

séparent facilement) et qu'elles sont modifiées par certains facteurs externes (une agitation mécanique des cultures de tissus en milieu liquide permet d'obtenir des suspensions de cellules isolées). La cohésion intercellulaire est sous la dépendance d'hormones; ainsi l'acide abscissique peut activer la séparation des cellules par clivage des lamelles pectiques. Il est possible expérimentalement de séparer, puis de réassocier les cellules par l'intermédiaire de leur lamelle moyenne (Leppart et Colvin 1971).

Les niveaux plus internes de paroi sont renforcés par une charpente cellulosique. Ces territoires pariétaux apparaissent comme autant de coques concentriques et individuelles pour chaque cellule dans lesquelles on distingue deux phases de composés polysaccharidiques (voir Frey-Wyssling 1976; Preston, 1974; Roelofsen, 1959) : une phase amorphe et continue formant la matrice de la paroi et une phase cristalline et discontinue : la cellulose. Celle-ci apparaît chez les plantes supérieures sous forme de microfibrilles élémentaires de longueur indéfinie et de diamètre compris en général entre 30 et 40 Å (Mühlethaler, 1960). Ces unités ont tendance à se fascier au cours des traitements de préparation pour la microscopie électronique et elles apparaissent alors sous forme de faisceaux de microfibrilles dont le diamètre se situe vers 200 à 300 Å.

On distingue la *paroi primaire* la première formée des niveaux cellulosiques. Elle est très hydrophile et riche en hémicelluloses. L'eau peut représenter jusqu'à 90 % de son poids. La cellulose représente un faible pourcentage des polysaccharides et la charpente fibrillaire y est relativement lâche. L'étude cristallographique montre que l'agencement des chaînes glucosidiques est, à ce niveau, relativement peu régulier à l'intérieur des microfibrilles de cellulose (Chanzy et coll. 1978). La paroi primaire est la seule enveloppe fibrillaire des cellules jeunes et en croissance. Sa propriété caractéristique est donc la *plasticité.*

Lorsque la croissance cesse, des assises nouvelles sont élaborées qui constituent la *paroi secondaire,* inextensible. Celle-ci est variable d'un tissu à l'autre; d'une façon générale elle est peu hydratée (20 % ou moins d'eau). La charpente fibrillaire y est toujours très compacte. La cellulose y est hautement cristalline.

II. DISPOSITION DES POLYSACCHARIDES

Nous envisagerons successivement les parois secondaires plus robustes et faciles à mettre en évidence, puis les parois primaires plus fragiles.

L'ORGANISATION DES PAROIS SECONDAIRES

Grâce à la compacité de la charpente cellulosique, les parois secondaires supportent sans déformation importante les traitements nécessaires pour l'observation aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique. Elles sont fortement biréfringentes, ce qui permet une étude au microscope polarisant. Elles sont constituées de strates concentriques faites de microfibrilles de cellulose serrées et disposées parallèlement entre elles. L'orientation des fibrilles par rapport à l'axe de la cellule est variable d'une strate à l'autre, et spécifique. Ceci produit des inégalités dans le rétablissement de la lumière polarisée et conduit à distinguer classiquement trois régions qui sont particulièrement nettes dans les trachéides et les fibres du bois : S_1 (externe), S_2 (médiane), S_3 (interne). S_1 et S_3 sont

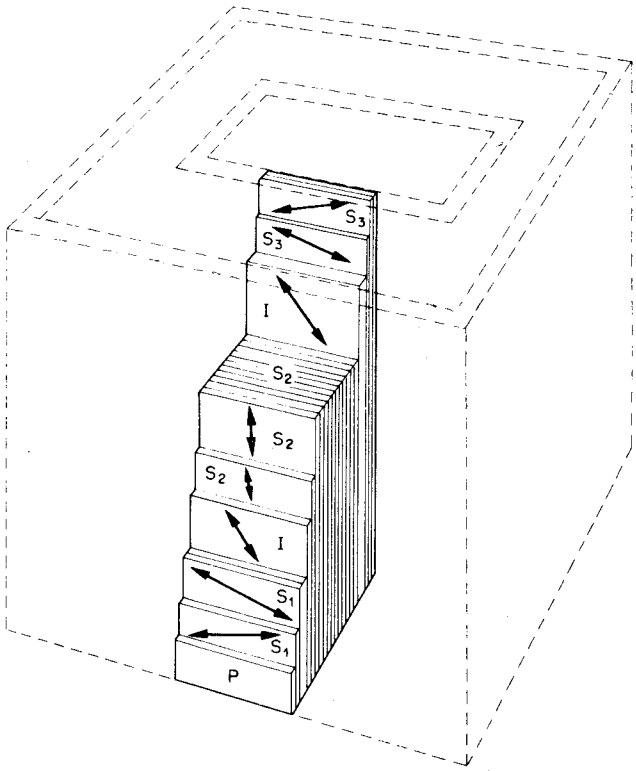


Fig. 3 — Orientation des fibrilles de cellulose dans les strates d'une paroi secondaire. Trachéide du bois de conifère. Les couches intermédiaires I et S_2 sont absentes dans certaines espèces. (d'après R.D. Preston, 1974).

constituées de fibrilles inclinées par rapport à l'axe cellulaire. S_2 qui est la partie la plus épaisse est formée d'un nombre variable d'assises dans lesquelles l'orientation de la cellulose est plus redressée par rapport à l'axe cellulaire. Des orientations intermédiaires existent entre les strates (fig. 3). Dans certaines espèces, S_3 manque (Preston, 1974).

L'organisation des parois secondaires apparaît toujours très précise et spécifique. Les fibres du bois et les fibres textiles ont fait l'objet d'études détaillées, car leurs propriétés mécaniques dépendent directement de l'agencement de leurs parois secondaires. Celui-ci résulte d'une régulation très précise où interviennent facteurs internes et externes. C'est un exemple bien typique qui montre une interaction étroite entre l'activité génétique propre à chaque cellule et l'environnement. Ainsi, le *bois de réaction* qui se développe dans les organes sous tension présente des parois dont la texture est modifiée par rapport au témoin. Dans ces parois sont élaborées des couches particulières épaisses, les « couches gélatineuses », G, qui, suivant les cas, s'ajoutent ou se substituent aux strates S_2 et S_3 (fig. 4) (Wardrop, 1964). Un autre cas est fourni par le coton qui forme une paroi subdivisée en strates concentriques dans les conditions naturelles et une paroi non stratifiée en lumière continu (Anderson et Moore, 1937).

Signalons également que certaines parois secondaires ont une architecture fibrillaire non constituée de cellulose. Le cas est fréquent chez les algues et les champignons où des fibrilles de xylane, de mannane, de chitine forment l'armature résistante. Il se rencontre aussi chez les plantes supérieures, en particulier dans les cellules qui stockent dans la paroi des *polysaccharides de réserve.* La fig. 5 montre des parois épaissies du tissu de réserve, l'albumen, d'une graine de jacinthe des bois (Endymion). Ces parois sont constituées par des dépôts massifs de glucomannanes qui seront digérés par l'embryon au moment de la germination de la graine (Goldberg, 1970).

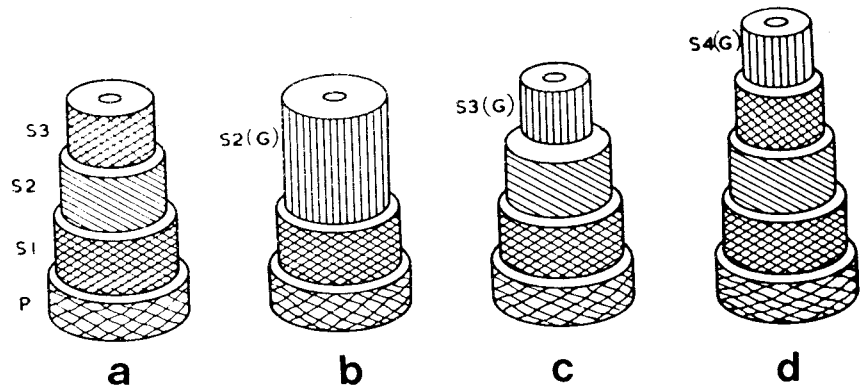


Fig. 4 — Modification de la texture des parois dans les fibres du bois de réaction.
a) Structure habituelle (témoin).
b) Modification de S_2.
c) Modification de S_3.
d) Elaboration d'une strate supplémentaire.
G : couche « gélatineuse ». P : paroi primaire.
(d'après A.B. Wardrop, 1964)

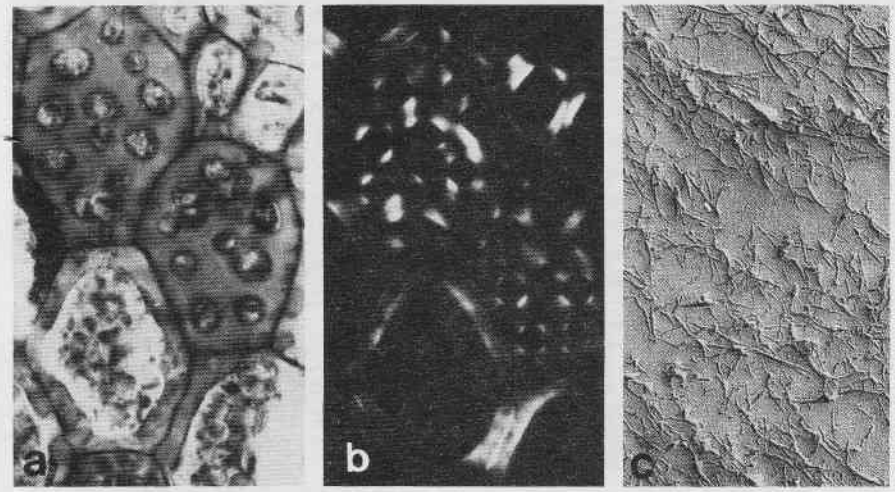


Fig. 5 — Paroi constituée par l'accumulation de polysaccharides de réserves. Albumen de la graine de jacinthe des bois (Endymion). La paroi secondaire est ici constituée par des glucomannanes qui seront digérés lors de la germination.
a) Coupe de graine mûre. Lumière naturelle. (x 800).
b) Idem en lumière polarisée. On distingue un phénomène de croix noire autour de chaque ponctuation.
c) Fibrilles de la paroi secondaire (x 25 000).

L'ORGANISATION DES PAROIS PRIMAIRES

L'organisation des parois primaires a donné lieu à des controverses qui résultent en grande partie de leur fragilité. Il est difficile en effet de réaliser de bonnes préparations sans perturber l'édifice ténu qui les constitue. Lorsqu'on soumet ces parois à un ombrage sans précautions spéciales, les microfibrilles de cellulose apparaissent sans ordre particulier; elles forment une sorte de feutrage aux mailles plus ou moins larges. Classiquement, on tend à définir les parois primaires comme celles qui ont une « structure dispersée ». Les observations les plus récentes conduisent à penser que cet état dispersé résulte en grande partie des méthodes de préparation ou qu'il n'existe que dans une partie de la paroi en croissance (voir Roland et Vian, 1979). Lorsqu'on procède à des mises en évidence beaucoup plus douces comme le permet la cytochimie, on constate que ces parois ont une organisation bien définie et forment des édifices tridimensionnellement ordonnés (fig. 6).

Schématiquement, les parois en croissance apparaissent comme des sortes de contreplaqués formés de strates successives typiquement croisées (fig. 7). La croissance implique un relâchement de certaines liaisons interfibrillaires et un glissement sous l'influence de tensions dues à la turgescence interne. Le plus souvent, la croissance est orientée, c'est-à-dire que certaines unités glissent les unes contre les autres dans certaines strates alors que d'autres résistent.

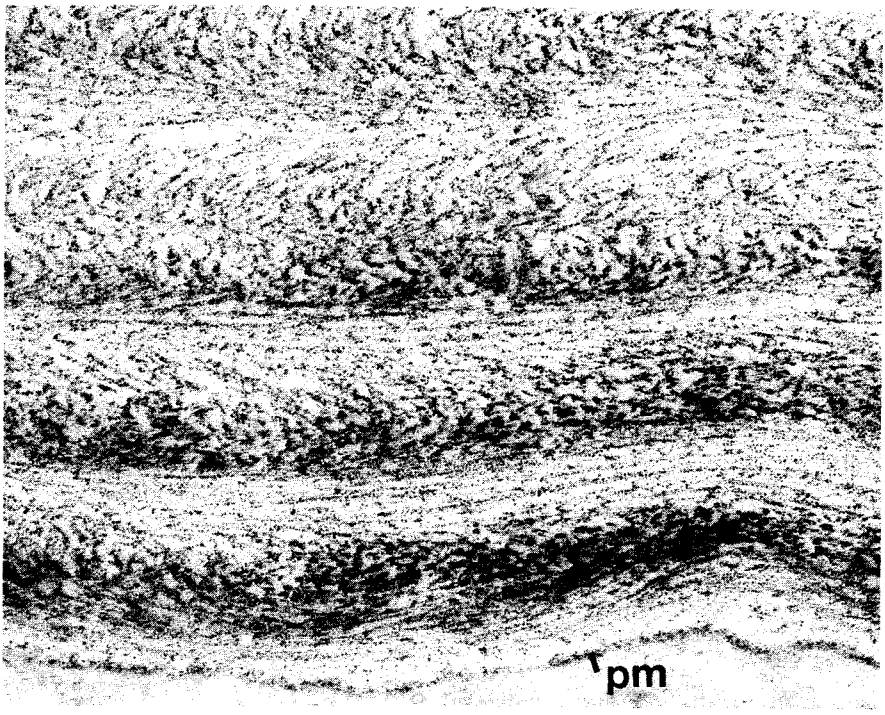


Fig. 6 — Disposition des polysaccharides dans une paroi en croissance: Epiderme de l'hypocotyle de soja. Coupe transversale à l'axe d'élongation. La disposition stratifiée est bien visible. Elle est due à l'alternance de polysaccharides disposés transversalement et longitudinalement. pm : plasmalemme.

Entre les strates croisées existent des lamelles intermédiaires dans lesquelles l'orientation des polysaccharides change progressivement et qui donnent un aspect en « arceaux » aux coupes minces de parois (fig. 8). Cette disposition torsadée est surtout visible lorsque les coupes sont obliques par rapport à l'axe cellulaire. Ce serait une erreur de penser que de telles figures indiquent une réelle courbure des chaînes polysaccharidiques : elles indiquent en fait l'existence de plans de polysaccharides dont l'inclinaison est intermédiaire entre deux strates croisées (voir fig. 11). De tels édifices sont particulièrement bien visibles dans les épidermes, certains parenchymes corticaux, les collenchymes, etc.

Les travaux des biochimistes (Albersheim, 1975) ont montré que les polysaccharides étaient unis en un réseau fermé par des liaisons covalentes et, semble-t-il par places par des liaisons hydrogène, notamment entre la cellulose et les chaînes d'hémicelluloses. C'est donc une enveloppe parfaitement définie qui entoure complètement la cellule en croissance. Dans ce réseau s'intercalent des chaînes peptidiques riches en hydroxyproline, liées également de façon covalente à des chaînes d'arabinanes et de galactanes. Cette partie peptidique constitue l'extensine (Lamport, 1970). Quantitativement réduite (elle représente quelques % du poids sec des parois primaires) elle pourrait avoir un rôle structural et fonc-

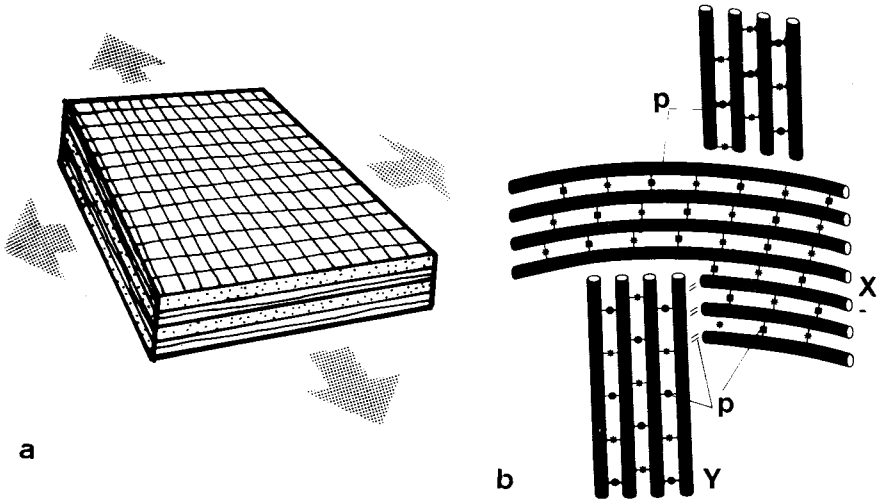
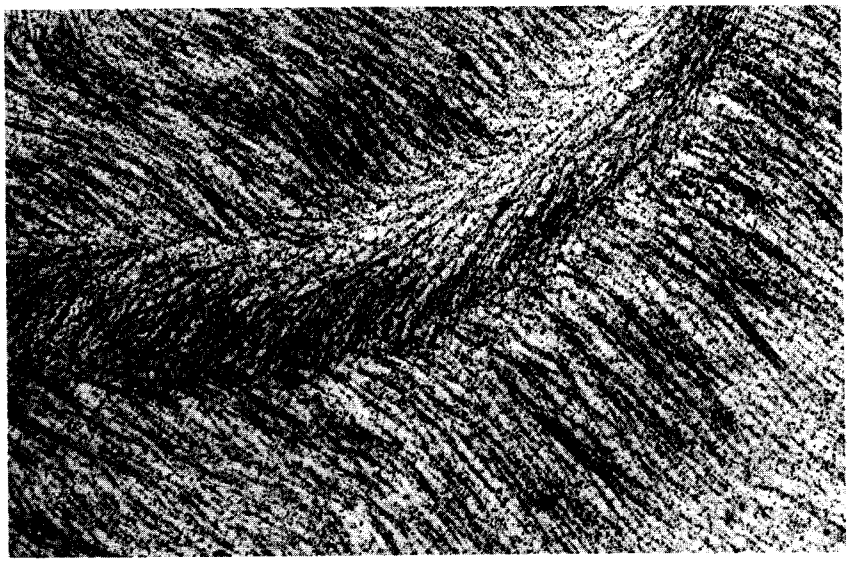


Fig. 7 — Disposition croisée des strates successives dans une paroi analogue à celle de la figure 6.
a) Texture croisée semblable à un contreplaqué. L'ensemble est flexible et résiste dans les deux directions du panneau.
b) Détail des fibrilles dans les strates orthogonales X et Y.
p : liaisons interfibrillaires dont la rupture différencielle permet un glissement et une croissance orientée.

tionnel important mais encore mal démontré. En toute rigueur, l'édifice macromoléculaire caractérisant la paroi primaire est donc une *glycoprotéine.* Dans cet édifice sont incorporés des complexes enzymatiques variés tels que des peroxydases, phosphatases, invertases (voir Chrispeels, 1976; Lamport, 1970) susceptibles de modifier l'environnement cellulaire et les substances qui transitent dans le compartiment paroi.

Ainsi, d'une façon très générale, les polysaccharides sont typiquement ordonnés dans les parois et les chaînes sont disposées selon des hélices dont le pas est plus ou moins surbaissé par rapport à l'axe cellulaire. Dans les tissus des plantes supérieures, il est très difficile de suivre l'agencement sur tout le pourtour de la cellule et, notamment, à ses extrémités. Les algues unicellulaires se prêtent mieux aux reconstitutions tridimensionnelles entières. Les résultats obtenus sur *Glaucocystis* par exemple montrent une charpente fibrillaire convolutée très caractéristique (fig. 9). Les fibrilles ne se terminent pas aux extrémités des cellules mais décrivent des boucles qui contournent des points, ou « centres de rotation », situés à égale distance des pôles (Willison et Brown, 1978 a et b).

Un problème qui mérite d'être souligné est que, malgré de nombreuses recherches, on ne voit que très exceptionnellement au sein des parois des *terminaisons libres* de fibrilles. Le nombre des fibrilles par cellule ou par strate pariétale reste très controversé. Certains auteurs considèrent même qu'un petit nombre de fibrilles, voir qu'une seule fibrille, (Maclachlan, 1976) entoure la cellule en étant disposée un peu comme une bobine de fil ou un écheveau de laine. Au moment de la croissance, ces ou cette fibrille très longue serait rompue par place sous



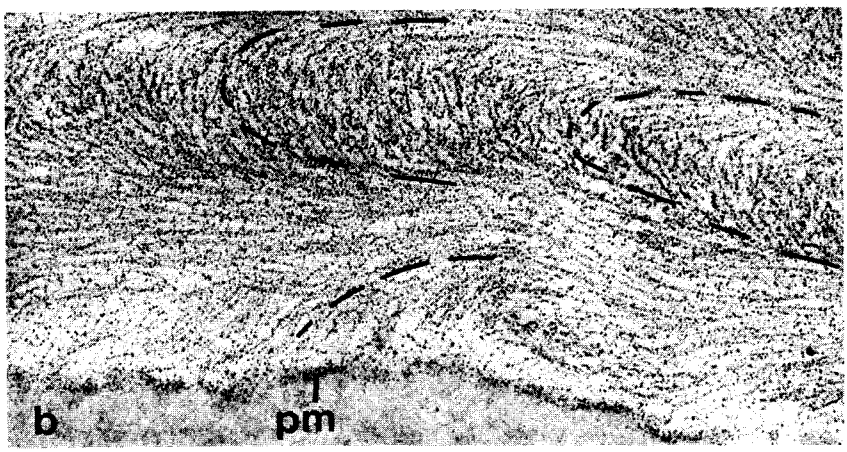


Fig. 8 — Parois sectionnées obliquement par rapport à l'axe de croissance.
La disposition des polysaccharides apparaît plus ou moins croisée et torsadée (figures « en arceaux »).

l'influence de cellulases et « réparée » ultérieurement par intercalation de maillons glucosidiques supplémentaires résultant de l'activité de glucanes-synthétases. On constate en effet que la croissance met en jeu à la fois des activités glucane-synthétiques et glucanasiques.

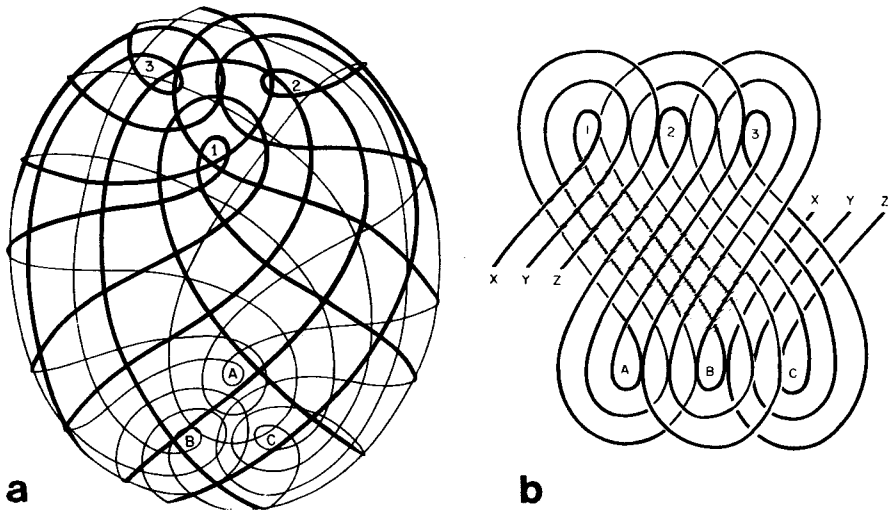


Fig. 9 — Disposition des microfibrilles de cellulose dans la paroi de *Glaucosystis,* algue verte unicellulaire.
a) Vue schématique d'ensemble, la cellule étant supposée transparente.
b) Détail des trois centres de rotation des fibrilles à un pôle cellulaire.
(d'après J.H.M. Willison et R.M. Brown, 1978 a et b).

III. POSITIONNEMENT DES POLYSACCHARIDES

Un arrangement si spécifique et défini des polysaccharides dans les parois traduit une remarquable capacité morphogénétique de la cellule végétale.

Les parois n'ayant pas l'équipement enzymatique suffisant pour fabriquer leurs propres constituants, il est nécessaire que des unités préformées leur soit fournies. Cet approvisionnement résulte d'un flux sécrétoire dont l'appareil de Golgi et le plasmalemme sont les éléments principaux. A leur niveau sont polymérisées les chaînes osidiques qui sont déversées et s'accumulent dans le périplasme. Dans cette région se produit le positionnement des unités et leur incorporation à la paroi (fig. 10 et 11).

Si l'on prend l'exemple des microfibrilles de cellulose, leur mise en place suppose trois étapes :

1) *une étape de polymérisation* et d'allongement des chaînes par liaisons osidiques. Elle fait intervenir du glucose activé sous forme de nucléotides-sucres (uridine-diphosphoglucose ou guanosine-diphosphoglucose). Les enzymes de synthèse — glucane-synthétases — paraissent incorporés au plasmalemme (fig. 12);
2) *une étape d'association* des chaînes du glucoses, essentiellement par liaisons hydrogène, en édifices géométriques de type cristallin. C'est la « *fibrillogénèse* »

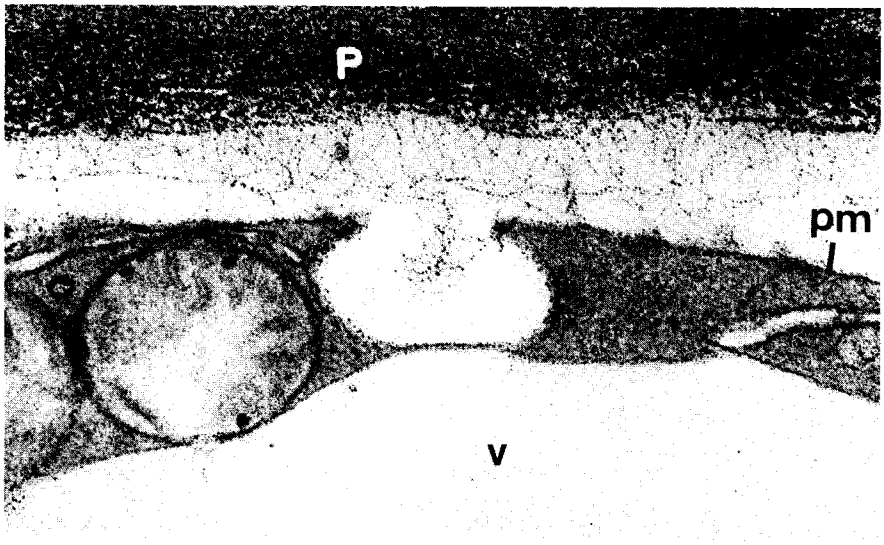


Fig. 10 — Sécrétion de polysaccharides, orientation dans le périplasme et incorporation à la paroi P. Cambium de chêne. pm : plasmalemme; v : vacuole.

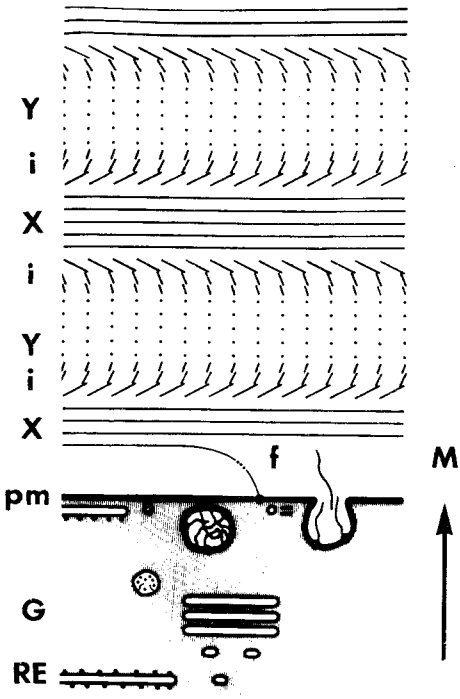
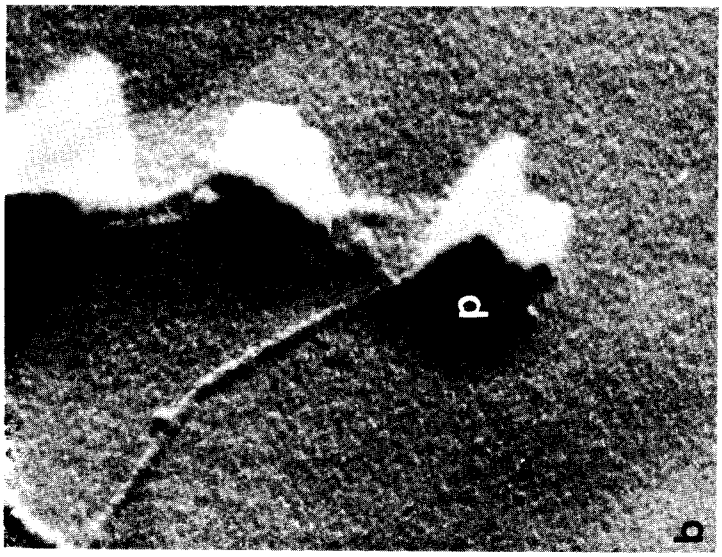


Fig. 11 — Ensemble des évènements impliqués par la mise en place des polysaccharides dans une paroi (par exemple paroi épidermique; cf. figures 6 et 8).
Dans le cytoplasme un flux de membranes (flèche) aboutit à la sécrétion de précurseurs polysaccharidiques. Un certain nombre de facteurs morphogénétiques M (autoassemblage, contrôle membranaire...) les ordonnent et les positionnent en une paroi tridimensionnellement définie.
G : appareil de Golgi (dictyosome); RE : reticulum endoplasmique; pm : plasmallemme; f : fibrille polysaccharidique.
X, Y : strates croisées de polysaccharides pariétaux; i : strates intermédiaires donnant un aspect torsadé, « en arceaux » aux sections.



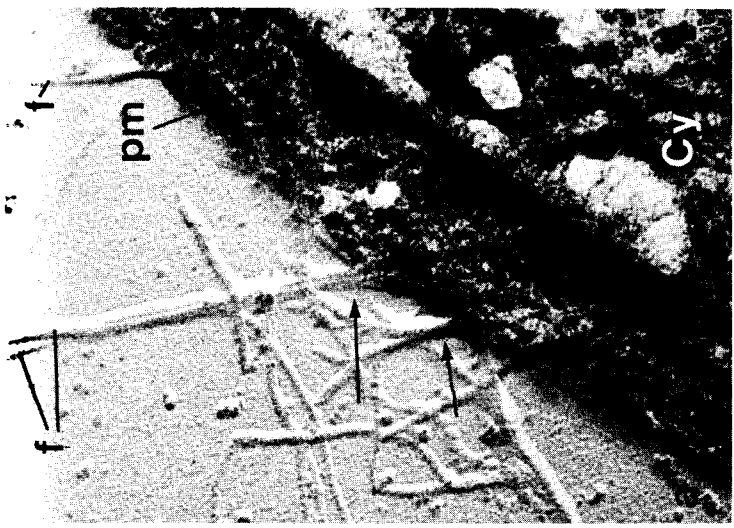


Fig. 12 — Formation des fibrilles de cellulose. Tige de sureau.
a) Emergence de fibrilles, f, sur le plasmalemme, pm. (x 100 000).
b) Particules, p, (complexe enzymatique ?) restant associées à l'extrémité d'une fibrille lorsque le plasmalemme est dissocié (x 200 000).

proprement dite. Elle suppose des conditions physicochimiques particulières qui, chez les plantes supérieures, sont celles du périplasme des cellules turgescentes. L'accroissement des microfibrilles est terminal et ne se fait pas, dans les conditions biologiques, par association de chaînes de glucoses préformées indépendantes. Cette fibrillogénèse suit immédiatement la polymérisation;
3) *une étape de positionnement et l'orientation* des nouvelles fibrilles selon des angles définis et changeant au cours du temps.

Si les étapes de synthèse sont maintenant bien connues grâce à de nombreux travaux biochimiques (voir Loewus, 1973), la façon dont la cellule réalise le positionnement et exerce son activité morphogénétique reste assez mystérieuse. Dans l'état actuel des connaissances, il semble que au moins deux types d'activité interviennent : des phénomènes membranaires et des phénomènes d'autoassemblage. : applied to fibrous composite, the 'self-assembling' concept was extended to 'macromolecular systems'

PHENOMENES MEMBRANAIRES

Les synthétases incorporées au plasmalemme peuvent contribuer de plusieurs façons à la réalisation d'une texture tridimensionnellement définie. Mühlethaler (1969) a proposé un modèle où les enzymes sont groupées en complexes dont l'agencement conduit à une polymérisation et une fibrillogénèse simultanée (fig. 13 a). Pour Preston (1974) l'ordonnance de système glucane-synthétasique produit des fibrilles positionnées simultanément dans les trois directions de l'espace (fig. 13 b). Par ailleurs, il est bien acquis maintenant que les membranes comme le plasmalemme sont des édifices fluides dans lesquels les particules et

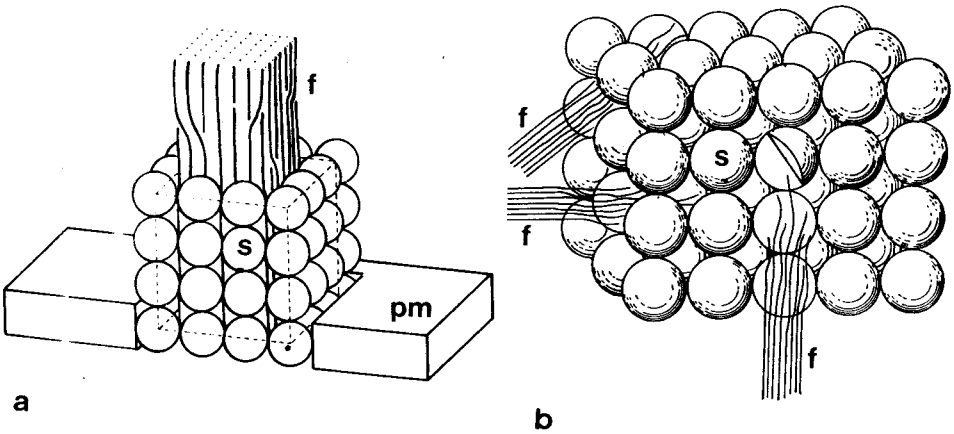


Fig. 13 — Fibrillogénèse. Modèles de systèmes synthétasiques.
a) Système ordonné et incorporé au plasmalemme, pm. (d'après K. Mühlethaler, 1969).
b) Orientation simultanée des fibrilles, f, dans trois directions de l'espace (d'après R.D. Preston, 1974).
f : fibrille; s : glucane-synthétase.

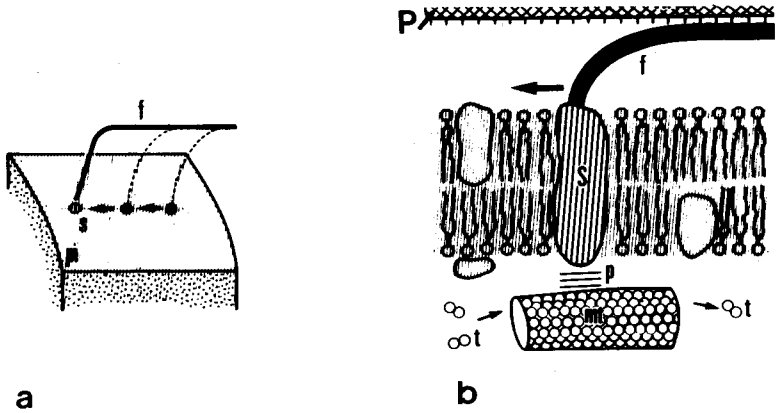


Fig. 14 — Déplacement intramembranaire de systèmes synthétasiques.
a) Déplacement dans le plasmalemme, pl, positionnant la fibrille, f.
b) Détail. Le mouvement pourrait être guidé par des microtubules, mt, cytoplasmiques en assemblage et désassemblage permanent *via* des protéines contractiles, p.
p : paroi; s : glucane-synthétase; t : tubuline.

notamment les enzymes et systèmes synthétasiques peuvent se déplacer. Ce déplacement peut être une des cause de l'orientation des sécrétions (fig. 14 a). Le plasmalemme est sous-tendu par une sorte de cytosquelette constitué de microtubules, particulièrement visibles sur les coupes rasantes de la surface cellulaire (fig. 15 a). Certains de ces microtubules sont reliés au plasmalemme par un pont de matériel dense (fig. 15 b). Au moins dans un certain nombre de cas de cellules élaborant des parois secondaires très définies comme les trachéides, de nombreux auteurs ont été frappés par le fait que l'orientation des microtubules préfigure celle des fibrilles dans la paroi (voir Newcomb, 1969). Les microtubules sont des formations labiles en assemblage et en désassemblage permanent à partir de sous-unités de protéine globulaire, la tubuline. Il s'agit donc d'un cytosquelette mouvant, constamment en état d'allongement dans des directions définies et de renouvellement. Des expériences menées en utilisant des drogues comme la colchicine, qui empêchent l'assemblage des microtubules à partir de la tubuline, montrent qu'il s'en suit une perturbation dans la texture de la paroi.

Ces données, complétées par des traitements de stabilisation et déstabilisation membranaires, conduisent à penser que des complexes synthétasiques tels que les cellulose-synthétases localisées dans le plasmalemme sont dirigés par des systèmes protéiques cytoplasmiques tels que les microtubules par l'intermédiaire de protéines contractiles (fig. 14 b).

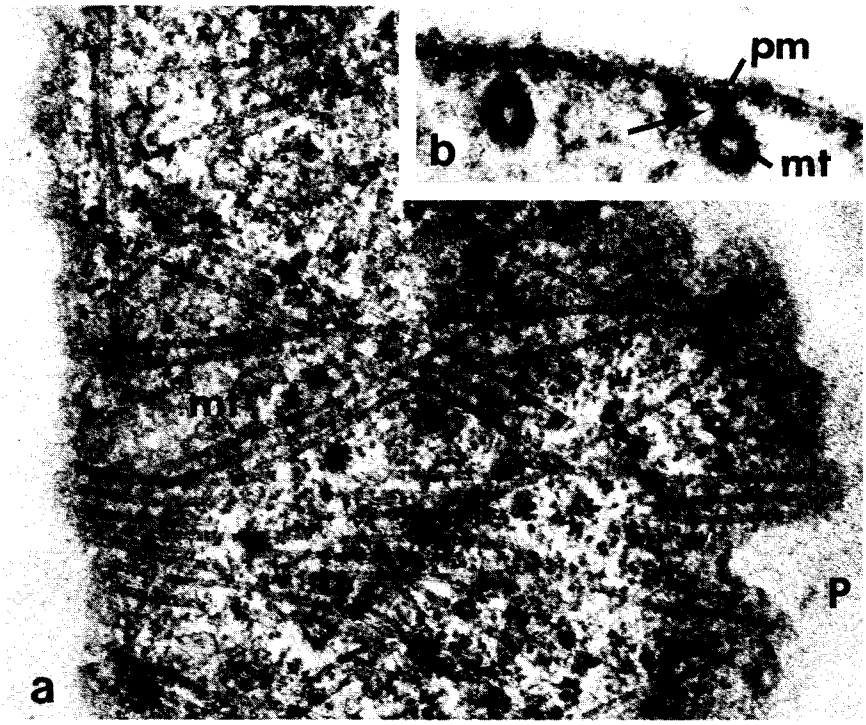


Fig. 15 — Cytosquelette de microtubules sous-tendant le plasmalemme. Hypocotyle de soja.
a) Coupe rasante au plasmalemme (ce dernier serait situé dans le plan de la page).
b) Coupe transversale au plasmalemme, pm.
mt : microtubule; la flèche indique un pont de matériel dense unissant plasmalemme et microtubule.

PHENOMENES D'AUTOASSEMBLAGE

La possibilité de construction d'ensembles macromoléculaires hautement définis par autoassemblage, c'est-à-dire de façon spontanée et pouvant se réaliser en conditions acellulaires, a surtout été démontrée dans le cas des protéines. L'association des capsides de virus en est un bon exemple (voir Bouck et Brown, 1976). Dans le cas des polysaccharides, et notamment des polysaccharides de paroi, la question est beaucoup moins avancée. et moins encore évidemment pour les lignines en 1980 (voir l'introduction du livre: p. XIII et suivantes)

Comme pour les autres types de macromolécules organiques, on définit pour les polysaccharides des structures primaires, secondaires, tertiaires ou d'ordre plus élevé. La structure primaire correspond à la séquence des sucres dans les chaînes osidiques (nature des sucres, ordre d'enchaînement, modes de liaison, etc). La structure secondaire est définie par l'arrangement qu'adoptent les chaînes osidiques dans l'espace : hélices, rubans, etc. (voir Rees et Welsh, 1977). La structure tertiaire correspond à la façon dont les chaînes s'unissent ou s'agrègent entre

elles et construisent des édifices stables. Une des propriétés très caractéristiques des polysaccharides est de former des *gels,* c'est-à-dire des vastes réseaux moléculaires de texture particulière entre les mailles desquels se logent d'autres molécules et le solvant. En solution, les chaînes polysaccharidiques sont libres. Lorsqu'il y a gélification, les molécules établissent entre elles des liaisons diverses (hydrogène, salines...) et prennent une conformation nouvelle (fig. 16). Le nombre de ces liaisons détermine la stabilité du gel. A la limite, lorsque les liaisons se multiplient – cas des polysaccharides fibreux – le solvant se trouve évacué et il se forme un *gel compact.* Une des propriété les plus notables d'un gel est que sa composition s'approche de celle d'un état liquide pur tout en ressemblant à un solide (Rees, 1969). Un gel d'agar par exemple peut contenir 99,9 % d'eau et

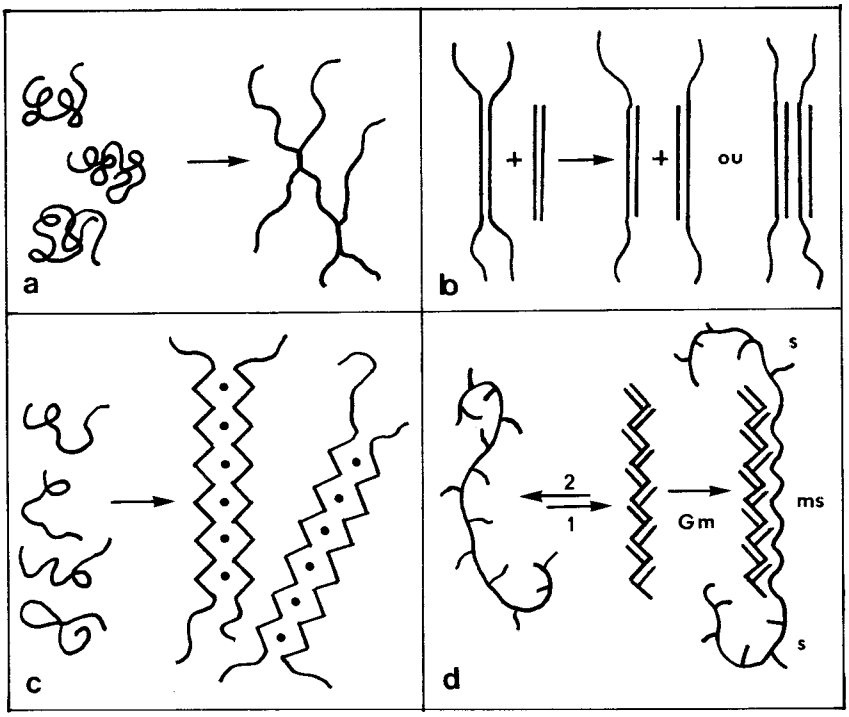


Fig. 16 – Gélification de polysaccharides.
a) Passage d'une solution de polysaccharides à un gel.
b) Incorporation de nouveaux segments à un réseau (formation de dimères ou d'agrégation; *ex* : gel de carragheenanes).
c) Association de séquences de polyuronates par chélation du calcium Ca^{++} (points noirs). Formation d'un réseau moléculaire en « boïte à œufs » (*ex* : alginates, pectines).
d) Formation d'un gel mixte. Par refroidissement :
1) des molécules de xanthane en solution prennent une configuration hélicoïdale régulière (qui se redisperse en chauffant).
2) en présence d'une solution de galactomannanes, Gm, une gélification se produit par association entre les xanthanes et les chaînes de mannoses non substituées (ms). s : région substituée par des branches latérales de galactose (modifié de D.A. Rees 1969 et D.A. Rees et E.J. Welsh, 1977).

pourtant reste capable de garder une forme définie et stable. Ainsi une très petite quantité de chaînes osidiques peut modifier complètement une grande masse de solvant. Les « superstructures » polysaccharidiques sont donc sensiblement différentes de celles des autres types macromoléculaires tels que les protéines ou les acides nucléiques.

En établissant entre elles des interconnections, les chaînes polysaccharidiques construisent des réseaux définis dans les trois dimensions de l'espace. Les régions d'interconnection ou « zones de jonction » peuvent intéresser deux chaînes ou plus. Elles produisent soit des gels homogènes, formés d'un seul type moléculaire, soit des gels hétérogènes, constitués par l'association de plusieurs polysaccharides. Certains ions ont un rôle déterminant dans l'établissement des

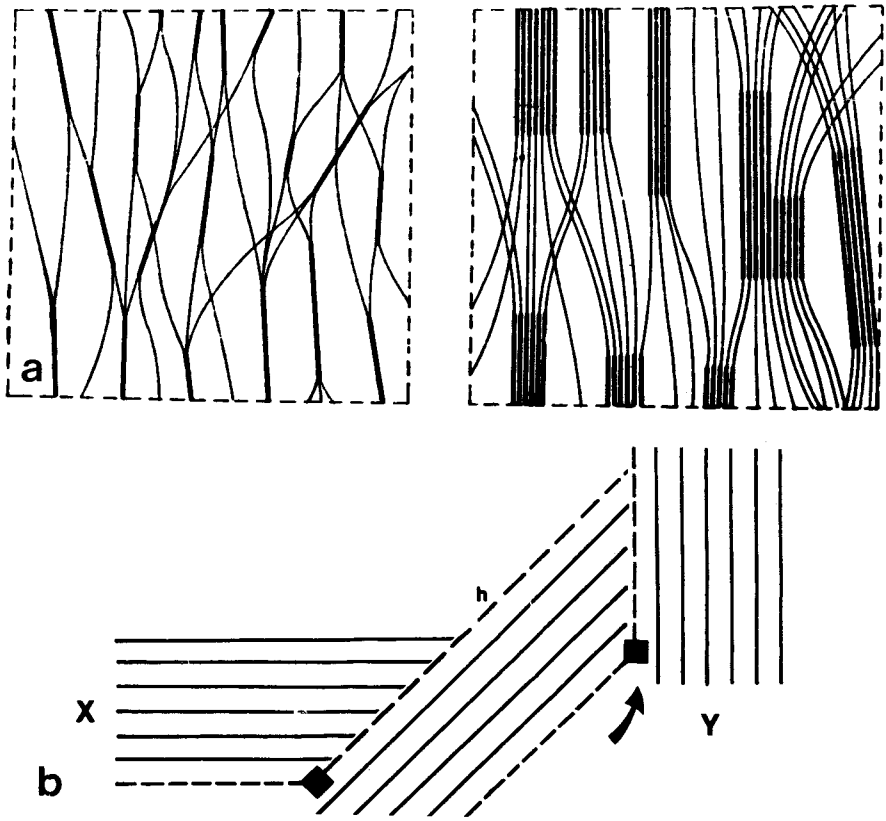


Fig. 17 — Ordonnance des gels de polysaccharides.
a) Formation de domaines parallèles réguliers par rapprochement de segments homologues (d'après A. Frey-Wyssling, 1953).
b) Rotation de plans au niveau de chaînes osidiques hétérogènes.
Les carrés noirs représentent l'intercalation d'un sucre particulier (*par ex.* du rhamnose dans une chaîne de pectines). Il en résulte une rupture dans l'alignement et une torsion des segments suivants (d'après D. Reis 1978 a et b).

liaisons interchaînes. C'est le cas du calcium. Par chélation, il s'établit des ponts qui se répètent régulièrement et conduisent à des ensembles dont la forme est semblable à celle d'une « boîte à œufs » (fig. 16).

Comme l'avait postulé Frey-Wyssling dès 1953, des domaines réguliers se forment dans les polysaccharides par rapprochement latéral des chaînes (fig. 17 a). Le phénomène est favorisé par l'existence de longues séquences répétitives dans les chaînes.

Le phénomène de gélification et d'assemblage peut être provoqué par de simples modifications physicochimiques du milieu (pH, concentration ionique, température...). Il est éventuellement favorisé par des activités enzymatiques qui modifient des fonctions intervenant dans les jonctions. Ainsi, l'estérification et la désestérification des pectines sous l'action de pectine-estérases changent les propriétés de gélification et la cohésion (on admet que ce phénomène intervient pour faciliter ou freiner la croissance).

Des assemblages typiques ont été obtenus *in vitro* à partir de sous-unités de parois bactériennes (voir la revue de Sleytr, 1978) et de parois de Chlamydomonas (Catt et coll., 1978). Selon Quatrano et Stevens (1976), la mise en place de la paroi du zygote de Fucus est initiée par autoassemblage des alginates dont l'excrétion est déclanchée par la fécondation. Ces polysaccharides, au contact de l'eau de mer, seraient pontés par du calcium en un gel péricellulaire.

Chez les plantes supérieures, les dispositions torsadées des parois (aspect en arceaux) évoquent les arrangements cholestériques décrits par Bouligand (1972). Il semble que les polysaccharides déversés dans le cytoplasme puissent passer par des états particuliers de « cristaux liquides » ou états mésomorphes (voir Bouligand 1972, 1974) au cours desquels ils s'agencent en couches successives dont les sous-unités sont orientées selon un angle changeant d'une strate à l'autre. Parmi les facteurs produisant un changement d'orientation dans des plans successifs, D. Reis (1978 b) suggère que l'hétérogénéité chimique de certaines hémicelluloses provoque des torsions des chaînes et des rotations dans l'assemblage (fig. 17 b).

Des observations récentes effectuées *in vitro* (Reis 1978 a et b) montrent que certaines fractions hémicellulosiques donnent, suivant les conditions, des gels dispersés homogènes ou des gels hétérostructurés (fig. 18). Dans ces derniers se rassemblent des nodules ou agrégats de chaînes polysaccharidiques qui sont biréfringents au microscope polarisant et dont la texture en microscopie électronique rappelle celle des arrangements observés dans la paroi *in vivo*. Ces données conduisent à penser que des phénomènes d'autoassemblage interviennent dans le périplasme. L'ordonnance est modulée par la paroi qui agit comme un moule ou « patron » (« template » des auteurs anglosaxons). Dans le périplasme, des liaisons s'établissent entre les unités polysaccharidiques sécrétées qui assurent la rigidification.

L'édifice constitué par les polysaccharides de paroi correspondrait ainsi à un *état mésomorphe consolidé*. Il résulterait, au moins en partie, de processus d'assemblages se produisant spontanément à l'extérieur du cytoplasme selon la nature chimique et la concentration des polysaccharides. La nature et la concen-

tration dépendant de l'activité et de l'intensité de fonctionnement des synthétases dans les compartiments cytoplasmiques (dérivés golgiens, plasmalemme), c'est donc en amont du flux sécrétoire que seraient déterminées les futures capacités d'assemblage des polymères.

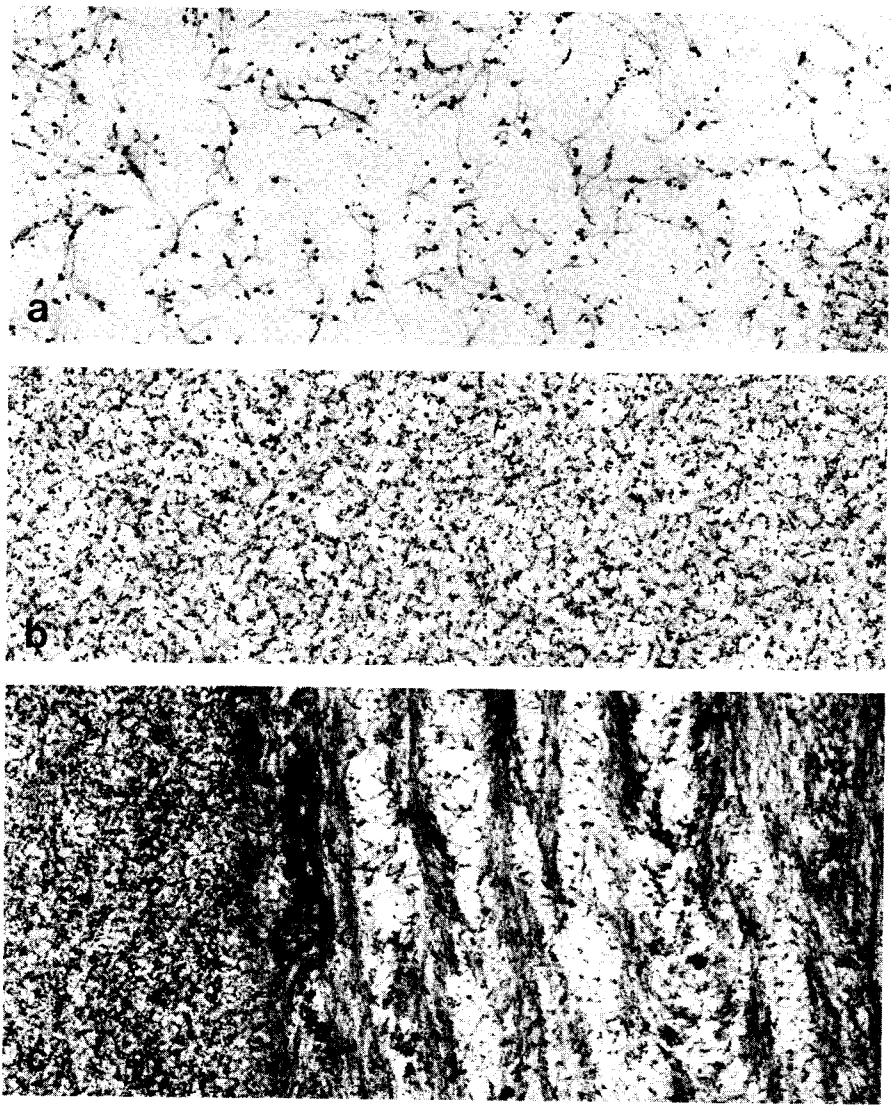


Fig. 18 — Aspect de gels obtenu *in vitro* à partir d'hémicelluloses de paroi. (fraction alcalino-soluble des parois de l'hypocotyle de soja). x 14 000.
a et b) gels homogènes plus ou moins dispersés.
c) ségrégation dans le gel de domaines montrant une ébauche d'ordonnance spontanée (d'après D. Reis, 1978 b).

Ainsi l'organisation tridimensionnelle des polysaccharides de paroi apparaît comme un processus hautement défini résultant de phénomènes complexes membranaires ou spontanés agissant vraisemblablement en coopération dans les conditions naturelles.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERSHEIM P. (1975) — *Scientific Amer.*, 232, **4**, 81-95.

ANDERSON D.B. et MOORE J.H. (1937) — *Amer. J. Bot.*, **24**, 503-507.

BOUCK G.B. et BROWN D.L. (1976) — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 71-94.

BOULIGAND Y. (1972) — *Tissue and Cell.*, **4**, 189-217.

BOULIGAND Y. (1974) — *J. Physique*, **35**, 215-236.

CATT J.W., HILLS G.J. et ROBERTS K. (1978) — *Planta*, **138**, 91-98.

CHANZY H., IMADA K. et VUONG R. (1978) — *Protoplasma*, **94**, 299-306.

CHRISPEEL M.J. (1976) — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 19-38.

FREY-WYSSLING A. (1953) — *Submicroscopic morphology of protoplasm*, Elsevier, Amsterdam.

FREY-WYSSLING A. (1976) — *The plant cell wall*, Gebrüder Borntraeger, Berlin.

GOLDBERG R. (1970) — Nature et rôle des composés à mannose des semences de quelques Liliacées. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Paris.

LAMPORT D.T.A. (1970) — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 235-270.

LEPPART G.G. et COLVIN J.R. (1971) — *J. Cell Biol.*, **50**, 237-246.

LOEWUS F. (1973) — *Biogenesis of plant cell wall polysaccharides*, Academic Press, New York.

MACLACHLAN G.A. (1976) — *Applied Polymer Symposium*, **28**, 645-658.

MUHLETHALER K. (1960) — *Beih. Z. Schweig Forstverein.*, **30**, 55-64.

MUHLETHALER K. (1969) — *J. Polymer Sci. : Part C*, **28**, 305-316.

NEWCOMB E.H. (1969) — *Annual Rev. of Plant Physiol.*, **20**, 253-288.

PRESTON R.D. (1974) — *The physical biology of plant cell walls*, Chapman & Hall.

QUATRANO R.S. et STEVENS P.T. (1976) — *Plant Physiol.*, **58**, 224-231.

REES D.A. (1969) — *Adv. Carbohyd. Chemistry and Biochemistry*, **24**, 267-332.

REES D.A. et WELSH E.J. (1977) — *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **16**, 214-224.

REIS D. (1978 a) — *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **19**, 3, p. 163-193.

REIS D. (1978 b) — Contribution à l'étude des parois en croissance. Caractères cytochimiques et modalités d'assemblage des polysaccharides neutres de l'hypocotyle du *Phaseolus aureus* (Roxb.). *Thèse de Doctorat d'Etat*, Paris.

ROELOFSEN P.A. (1959) — *The plant cell wall*, Gebrüder Borntraeger, Berlin.

ROLAND J.C. et VIAN B. (1979) — *Int. Rev. Cytol.*, **61**, 129-166.

SLEYTR U.B. (1978) — *Int. Rev. Cytol.*, **53**, 1-64.

WARDROP A.B. (1964) — in *The formation of wood in forest trees*, Academic Press, New-York, p. 405-456.

WILLISON J.H.M. et BROWN R.M. (1978 a) — *Planta*, **141**, 51-58.

WILLISON J.H.M. et BROWN R.M. (1978 b) — *J. Cell Biol.*, **77**, 103-119.

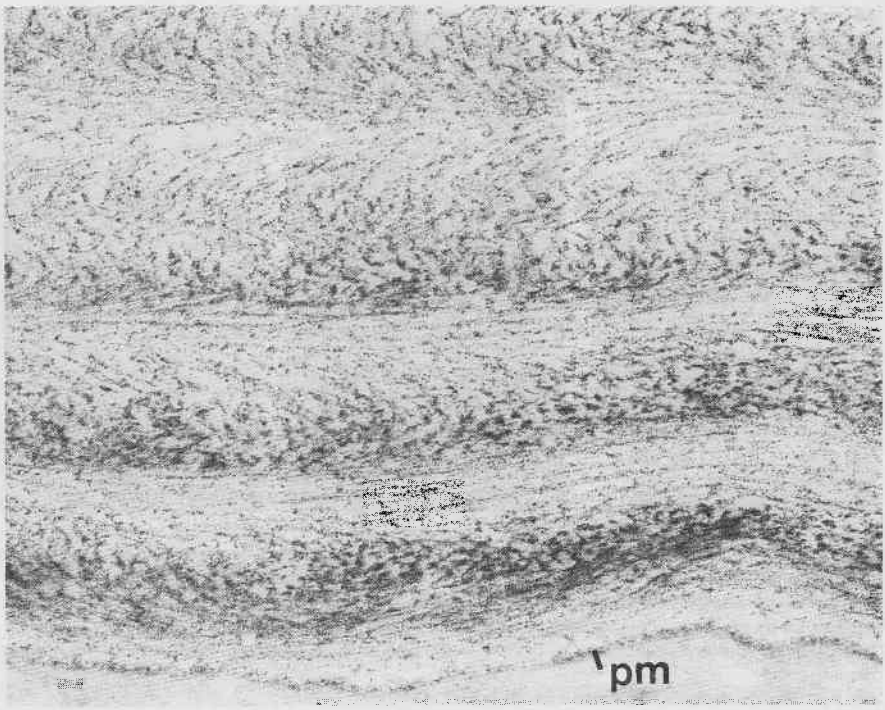


Fig. 6 — Disposition des polysaccharides dans une paroi en croissance: Epiderme de l'hypocotyle de soja. Coupe transversale à l'axe d'élongation. La disposition stratifiée est bien visible. Elle est due à l'alternance de polysaccharides disposés transversalement et longitudinalement. pm : plasmalemme.

Entre les strates croisées existent des lamelles intermédiaires dans lesquelles l'orientation des polysaccharides change progressivement et qui donnent un aspect en « arceaux » aux coupes minces de parois (fig. 8). Cette disposition torsadée est surtout visible lorsque les coupes sont obliques par rapport à l'axe cellulaire. Ce serait une erreur de penser que de telles figures indiquent une réelle courbure des chaînes polysaccharidiques : elles indiquent en fait l'existence de plans de polysaccharides dont l'inclinaison est intermédiaire entre deux strates croisées (voir fig. 11). De tels édifices sont particulièrement bien visibles dans les épidermes, certains parenchymes corticaux, les collenchymes, etc.

Les travaux des biochimistes (Albersheim, 1975) ont montré que les polysaccharides étaient unis en un réseau fermé par des liaisons covalentes et, semble-t-il par places par des liaisons hydrogène, notamment entre la cellulose et les chaînes d'hémicelluloses. C'est donc une enveloppe parfaitement définie qui entoure complètement la cellule en croissance. Dans ce réseau s'intercalent des chaînes peptidiques riches en hydroxyproline, liées également de façon covalente à des chaînes d'arabinanes et de galactanes. Cette partie peptidique constitue l'extensine (Lamport, 1970). Quantitativement réduite (elle représente quelques % du poids sec des parois primaires) elle pourrait avoir un rôle structural et fonc-

clic here for
the next

B. MONTIES

Les lignines

INTRODUCTION

L'existence de la lignine a certainement été rapportée pour la première fois en 1819, par Braconnot, professeur à l'Université de Nancy. Soumettant des tissus ligneux à l'action d'acides concentrés, il démontra, que le bois est hétérogène et qu'il n'est qu'en partie solubilisé par ce traitement. Le résidu insoluble fut par la suite appelé lignine. Ce n'est cependant qu'en 1838 que Payen caractérisa la lignine en tant qu'entité chimique par sa composition centésimale : il montra que la fraction des bois qui résiste aux acides est relativement plus riche en carbone et plus pauvre en oxygène que la partie polyosidique qui est hydrolysée.

Dès la fin du XIXème siècle, alors que l'on ignorait encore tout de la structure chimique de la lignine, ses propriétés étaient suffisamment connues pour que, par exemple, la définition donnée par un troisième chimiste français, Frémy en 1883, puisse être considérée même actuellement comme valable. Frémy désignait la lignine sous le terme de vasculose; il définissait donc ainsi la lignine : « c'est la substance qui forme la partie principale des vaisseaux. Elle accompagne presque toujours les corps cellulosiques, elle lie entre elles les fibres et les cellules; ses caractères chimiques sont nets... : elle est insoluble dans le réactif amoniaco-cuivrique, même après action des acides, elle résiste pendant longtemps à l'acide sulfurique concentré; elle est rapidement attaquée par le chlore, par les hypochlorites et par les oxydants tels que l'acide azotique, l'acide chromique et le permanganate de potasse. La vasculose produit sous ces différentes influences des acides résineux solubles dans les alcalis et peut être ainsi séparée des corps cellulosiques ».

Dès cette époque les chimistes disposaient donc d'une image fonctionnelle exacte de la lignine; par la suite, le terme de vasculose fut abandonné parce que Frémy l'avait défini dans le cadre d'une théorie très générale selon laquelle « chaque tissu présente une composition chimique et des propriétés spéciales qui dépendent du rôle physiologique qu'il est appelé à jouer dans la végétation ». Frémy désignait donc par vasculose la matière qui forme les vaisseaux; il n'admettait pas son existence ailleurs, dans le tissu ligneux par exemple. Il s'opposait en cela à Payen, autre chimiste français, qui affirmait que le bois était formé par de la cellulose plus ou moins imprégnée d'incrustations organiques; la « matière incrustante » n'était autre que la lignine. Ainsi dès le début du siècle était posée une double question : celle de la nature de la lignine et celle de ses relations avec les autres constituants des parois cellulaires.

Actuellement, on peut considérer comme connue la nature de la lignine : c'est une macromolécule formée par polymérisation oxydative de monomères de la série du phénylpropane; elle est étroitement associée (incrustation) aux polyosides pariétaux. Il convient cependant de reconnaître que les modalités de liaisons entre les monomères commencent tout juste à être connues et que l'on ignore encore beaucoup, si ce n'est tout, sur les liaisons entre les lignines et les polyosides, liaisons qui sont responsables de l'incrustation de ces derniers.

La lenteur du progrès des connaissances sur la lignine a été attribuée au fait que la résolution de problèmes techniques particuliers a conduit souvent à des vues partielles et apparemment contradictoires. A ce propos, Péarl parlait encore en 1967 du « nébuleux concept de lignine ». En conséquence, la présente revue vise à regrouper des données concernant la chimie et la biochimie de la lignine; en aucune façon elle ne saurait être exhaustive. La quasi impossibilité pour une seule personne de dominer les divers aspects de la lignine a été nettement soulignée par Sarkanen et Ludwig dans la préface de leur ouvrage « Lignins » en 1971. La justesse de cette remarque est confirmée par l'augmentation en fonction du temps du nombre des auteurs des monographies qui sont citées en référence le plus souvent. Au premier ouvrage de F. Brauns « *The chemistry of lignin* » qui date de 1952 a succédé un supplément par F. et Dorothy Brauns. En 1968 vint l'ouvrage de Freudenberg et Neish qui traitait pour la première fois de biosynthèse puis vint enfin le « Lignins » cité plus haut qui réunit 19 co-auteurs.

Compte tenu de ces références, nous nous limiterons ici à regrouper successivement les données récentes concernant l'analyse structurale des lignines, la synthèse de polymères modèles, l'existence d'une variabilité des lignines et enfin la biosynthèse et sa régulation.

Avant d'aborder ces points, quelques remarques préliminaires.

— La première concerne le pluriel affecté à « la lignine » dans le titre de l'ouvrage de Sarkanen et Ludwig. Ce choix du pluriel vise à rendre compte de la mise en évidence depuis quelques années de plusieurs types de lignine. La notion d'hétérogénéité des lignines est importante à prendre en compte autant lors des études de biosynthèse que lors des essais de dégradation chimique ou de biodégradation (Kirk et al. 1975). C'est la raison pour laquelle lignines est, ici aussi, écrit au pluriel. Dans cette revue nous avons choisi d'illustrer, tout particulièrement, l'existence d'une hétérogénéité des lignines.

— La seconde remarque concerne la traduction d'expressions allemandes ou anglaises très caractéristiques (voir par exemple le tableau III) : la traduction française du texte précède alors les termes originaux. La nomenclature chimique officielle a été suivie le plus possible avec l'exception de la notation α, β, γ usuelle du maillon propane (tableau I). Enfin « polyosides » ou « polyholosides » ont été employés pour traduire le terme « polysaccharides »; il en a été de même pour méthylénequinone (fig. 3) traduisant « quinonemethide ».

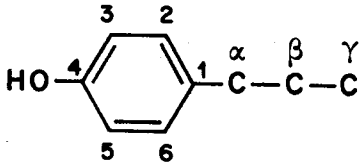
I. STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES LIGNINES

Il est actuellement admis que les lignines sont des polymères tri-dimensionnels provenant de la copolymérisation de trois alcools phénylpropénoïques : alcool coumarylique (hydroxy-1-benzène-propenylol-4), alcool coniférylique (méthoxy-2-hydroxy-1-benzène-propenylol-4) et alcool sinapylique (diméthoxy-2,6-hydroxy-1-benzène-propenylol-4). Dans le tableau I la structure de ces alcools hydroxycinnamiques est mise en relation avec celle d'autres dérivés apparentés cités par la suite.

TABLEAU I

Structure et nomenclature courantes des unités phénylpropane et des alcools, aldéhydes, acides benzoïques et phénylpropenoïques

Notation *usuelle* α β γ
Notation *Freudenberg* γ β α



Nom du cycle	Hydroxy-benzoyl (H)	gaiacyl (G)	syringyl (S)
Substitution du cycle	4 hydroxy-	3 méthoxy- 4 hydroxy-	3 méthoxy- 4 hydroxy- 5 méthoxy-
acide en C_7 (1)	p-hydroxy-benzoïque	vanillique	syringique
aldhéhyde en C_7 (1)	hydroxybenzaldéhyde (B)	vanilline (V)	syringaldehyde (S)
alcool en C_9 (1)	coumarylique	coniférylique	sinapylique
acide en C_9 (1)	p-coumarique (PC)	férulique (FE)	sinapique (SI)

(1) Lors du compte des carbones des unités H, G et S les carbones des méthoxyles sont négligés : les séries C_9 dites hydroxycinnamiques correspondant à l'*acide cinnamique* ou benzylpropène carboxylique, les séries en C_7 sont dites benzoyl par référence à l'*acide benzoïque* ou *benzylcarboxylique.*

La structure phénylpropanoïque des monomères de lignine n'a pu être démontrée qu'après la mise au point de méthodes de dégradation suffisamment douces, qui dépolymérisent le réseau tridimensionnel du polymère sans dégrader ni les noyaux aromatiques ni le maillon propane. Jusqu'en 1940 environ, quelques auteurs ont contesté non seulement la structure phénylpropane des unités monomères (lignin building units) mais l'existence même du polymère *in situ* : ils supposaient que la lignine extraite se formait à la suite de réactions induites par l'extraction. Depuis, les analyses par microscopie ultraviolette ont permis de démontrer la préexistence du caractère aromatique de la lignine *in situ*. Il est incontestable cependant que, du fait des opérations d'extraction, les lignines isolées (lignines d'extraction) sont différentes des lignines *in situ* (protolignines). Afin de préciser ces points fondamentaux, il est nécessaire de décrire brièvement quelques méthodes de dégradation utilisées par la suite pour caractériser les lignines.

METHODES DE DEGRADATION DES LIGNINES

Parmi les nombreuses méthodes décrites et discutées dans les ouvrages cités plus haut nous n'envisagerons ici que l'oxydation par le nitrobenzène, l'acidolyse dans le dioxanne, la double oxydation par le permanganate puis l'eau oxygénée et enfin la dégradation par l'acide thioacétique.

a) Oxydation par le nitrobenzène

Introduite vers 1940 par l'équipe de Freudenberg, cette méthode a été jusqu'à ces dernières années la plus utilisée, de toutes les diverses techniques de caractérisation des lignines. Le nitrobenzène provoque une rupture oxydative entre les carbones α et β du maillon propane des monomères (tab. I). Il en résulte la formation d'unités en C_7 (tab. I) : aldéhydes benzoïques (p-hydroxybenzaldéhyde, vanilline, syringaldéhyde) et des trois acides benzoïques homologues (tab. I). Parmi les produits obtenus les aldéhydes en C_7 sont quantitativement les plus importants : il sont utilisés pour distinguer divers types de lignines (page 143). Bien que très utile, cette méthode fournit cependant des informations limitées sur la structure des lignines parce que certaines liaisons intermonomères sont résistantes à ce type d'oxydation. C'est le cas, par exemple, des liaisons C - C de type diphényle qui peuvent s'établir entre deux carbones non substitués des cycles aromatiques de monomères. C'est aussi le cas des liaisons C-O-C, de type aryl-aryl-éther, qui s'établissent entre les fonctions phénoliques portées par le carbone 4 de chacun des alcools et l'un des carbones 2', 5' ou 4' du cycle aromatique d'un autre monomère ([1]). En conséquence, cette méthode ne fournit pas d'information directe sur ces unités condensées (condensed units) par liaisons C-C ou C-O-C. De plus, des composés autres que les lignines, tels les groupes tyrosine des protéines et les acides hydroxycinnamiques comme l'acide férulique

([1]) Selon la nomenclature de Ludwig et Sarkanen (1971) une liaison de ce type entre carbone C_4 et C_5, est notée liaison (4-O-5).

et sinapique, sont aussi oxydés en aldéhydes homologues en C_7 (tab. I). Pour ces deux raisons, et malgré son apparente simplicité, cette méthode ne semble pas devoir être utilisée seule pour caractériser les lignines.

b) Acidolyse dans le dioxanne

Contrairement à la méthode d'oxydation par le nitrobenzène, l'acidolyse dans le dioxanne ne dégrade pas l'unité C_9 phénylpropane caractéristique des monomères de lignine. Lors de l'acidolyse (Lundquist, 1976) les lignines sont dégradées sous reflux par l'acide chlorhydrique 0,2 N dans un mélange dioxanne-eau (9-1 : vol). Il en résulte la formation de produits en C_9 homologues des trois alcools monomères ainsi que des traces des trois aldéhydes et acides en C_7 formés par oxydation du maillon C_3, comme par le nitrobenzène. Au total, on a identifié 5 types principaux de produits d'acidolyse différents par le mode de substitution de leurs maillons propane soit au total 15 produits d'acidolyse. Ces composés sont aisément séparés par chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse (fig. 1). Deux types de produits d'acidolyse sont quantitativement impor-

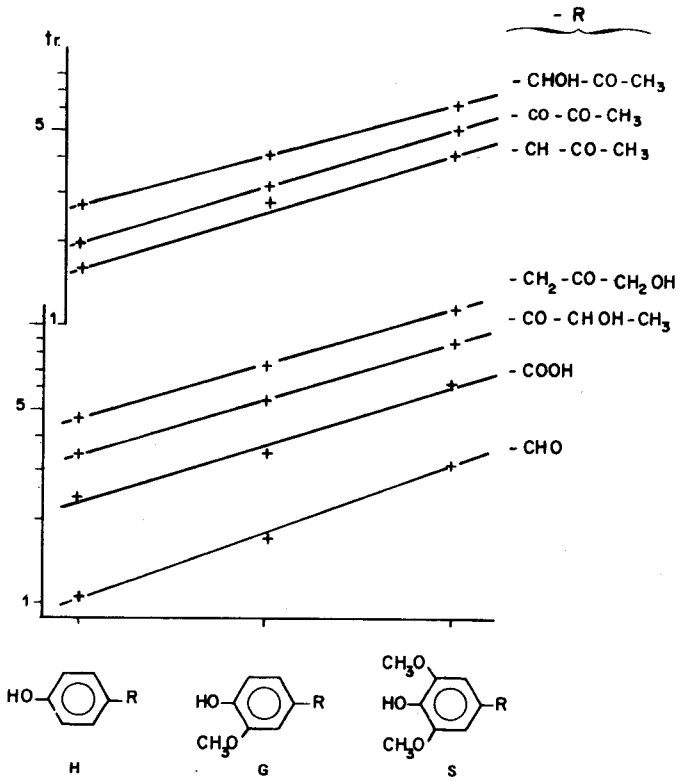


Fig. 1 — Relation entre la structure de la chaîne latérale (R) des trois types de produits d'acidolyse (H.G.S) et leur temps de rétention (t_r) après séparation sous forme de silyléther par chromatographie en phase gazeuse sur silicones.

tants: les β—oxy-propanols et les β-hydroxy-α-propanones caractérisés respectivement par les structures $CH_2 - CO - CH_2OH$ et $CO - CHOH - CH_3$ du maillon propane (fig. 1). Avec les α, β-propanediones ($CO - CO - CH_3$), ces deux groupes de composés sont souvent utilisés pour démontrer l'incorporation *in toto* du squelette en C_9 de précurseurs biosynthétiques des lignines, par exemple la phénylalanine ou des acides hydroxycinnamiques. En effet, l'analyse du mécanisme des réactions d'acidolyse a permis de montrer que la formation des produits de type oxy-propanol, -propanones et -propanediones est caractéristique des liaisons éther qui se forment sur les carbones α et β lors de la polymérisation. La formation de ces alkyl-aryl-éther résulte d'attaques nucléophiles de ces carbones (fig. 3 A), elles sont rendues possibles par le réarrangement de la double liaison $\alpha\beta$ qui résulte lui-même de l'oxydation des monomères (voir page 135).

L'existence de ces produits de dégradation peut donc être considérée comme une preuve du fait qu'il y a eu formation puis réaction de la double liaison α , β , donc formation de lignine par polymérisation d'alcools phényl-propenoïques. C'est la raison pour laquelle la méthode d'acidolyse est actuellement utilisée autant pour démontrer l'existence des lignines, que pour les caractériser grâce aux proportions relatives des trois types de produits d'acidolyse (fig. 1). Cependant, comme la méthode d'oxydation par le nitrobenzène, l'acidolyse ne permet de caractériser que la fraction de lignine formée d'unités monomères non condensées. De plus, étant plus spécifique des liaisons alkyl-éther, les rendements d'acidolyse sont toujours inférieurs à ceux d'oxydation par le nitrobenzène. Malgré cela, l'acidolyse présente sur cette dernière méthode l'avantage de fournir des produits ([1]) dont le squelette en C_9 est caractéristique des précurseurs.

c) Double oxydation par le permanganate puis l'eau oxygénée

Contrairement aux deux méthodes précédentes, la double oxydation permet de caractériser à la fois les unités monomères condensées et non condensées. Pour empêcher la rupture oxydative des cycles aromatiques les fonctions phénoliques sont bloquées par méthylation avant chaque oxydation. Lors de l'oxydation par le permanganate, les maillons propanes sont rompus au niveau des carbones β et γ . La seconde oxydation par l'eau oxygénée, achève la dégradation des chaînes latérales; il en résulte la formation d'acides phénoliques à squelette en C_7 et en C_{14} provenant respectivement des unités non condensées et des unités condensées à structure aryl-aryl-éther ou biphénile (fig. 2). Seules les unités possédant des hydroxyles phénoliques libres, donc méthylables, fournissent des acides phénoliques lors de la double oxydation, c'est la raison pour laquelle cette méthode est utilisée avant et après dégradation alcaline contrôlée des lignines (Erickson et al. 1973). Les lignines peuvent alors être caractérisées par les proportions relatives des différents acides formés par double oxydation ainsi que par les variations de ces rapports après prétraitement alcalin. Evidemment, ces prétraitements ont pour effet d'augmenter le rendement en acides phénoliques. Le rendement total

([1]) Ces produits d'acidolyse sont souvent désignés sous le nom de « cétones de Hibbert » qui les caractérisa aux environs de 1940.

est cependant en général inférieur à 50 % de la lignine dégradée. Comme les rendements individuels de formation des différents acides ne sont pas connus, la méthode par double oxydation, bien que très utile, ne permet pas de caractériser les lignines en totalité.

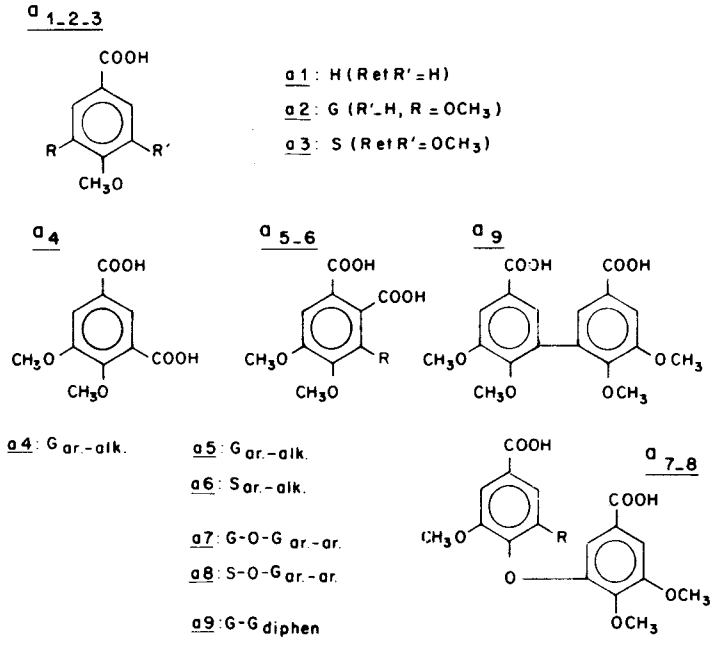


Fig. 2 — Structure des esters méthyliques d'acides phénoliques analysés après double oxydation des lignines. Les cycles des unités non condensées H (a_1), G (a_2) et S (a_3) sont substitués selon les modes définis dans le tableau 1. Les six principaux acides correspondant à des unités condensées des séries G et S sont : les esters a_4, a_5 et a_6 qui proviennent des liaisons aryl-alkyl-éther (ar-alk) alors que a_6 et a_7 correspondent au aryl-aryl-éther (ar-ar). L'ester a_8 provient des structures diphényl (diphen) qui ne peuvent être formées à partir des monomères. Dans la série Syringyl : R =OCH_3.

d) Dégradation par l'acide thioacétique

Comme la précédente, la méthode de dégradation par l'acide thioacétique permet de caractériser à la fois les unités condensées et non condensées qui fournissent dans ces conditions des monomères et des oligomères à squelette phénylpropane. L'acide thioacétique provoque l'hydrolyse des liaisons éther-benzyliques par thioacétolyse. Il en résulte la formation de S-benzylthioacétates qui se réarrangent en entraînant la rupture des liaisons β-alkyl-éther et donc la dépolymérisation des lignines (Nimz, 1974). Finalement, après élimination du soufre, on obtient une vingtaine d'oligomères dont le squelette phénylpropane correspond à celui des trois alcools monomères. Ces produits d'acétolyse sont ensuite fractionnés en mono-, di-, tri-, tétramères et il reste alors une fraction

d'oligomères ayant une masse moléculaire supérieure à 2 000 (tab. II). Comme la méthode d'acidolyse, la thioacétolyse permet donc d'analyser les unités non condensées sources de monomères. Sur ce point, elle aussi est préférable à l'oxydation par le nitrobenzène puisqu'elle conserve le maillon propane. Comme la méthode de double oxydation, la thioacétolyse permet l'analyse des unités condensées qui fournissent des dimères de type diphényle et aryl-aryl-éther. De plus, elle permet aussi la mise en évidence d'unités condensées par les maillons propanes. Ces dernières sont caractérisées par l'existence de liaisons covalentes C-C entre deux carbones quelconques du maillon propane de chacun des monomères. La présence de ce type de liaisons C-C a été rapportée entre deux carbones β (liaison β - β) ([1]) et entre carbones α, β ou β, γ (liaisons α - β ou α - γ) ([1]). Pour le moment, on admet que seules existent dans la protolignine des liaisons β - β, les deux autres types seraient formés au cours de l'analyse. Ces dernières observations confirment la nécessité du contrôle des opérations d'extraction en vue des études structurales. Quoi qu'il en soit, la caractérisation par thioacétolyse présente par rapport aux autres méthodes un avantage considérable : son rendement en produits de dégradation analysables est très élevé (tab. II). Donc, même si cette méthode,comme les précédentes, donne une image partiellement déformée de la protolignine, elle présente, sur ces dernières, l'avantage de donner une image plus complète. En conséquence, comme il est possible de déduire à partir des proportions relatives des différents oligomères la fréquence des liaisons intermonomères, la thioacétolyse permet presqu'à elle seule de formuler une description complète de la protolignine. Dans le tableau II sont présentés les rendements en oligomères ainsi que les fréquences des liaisons intermonomères de la lignine du Hêtre calculées par Nimz (1974); les résultats concernant la lignine d'Epicea, donnés pour comparaison, ont été obtenus par d'autres méthodes discutées par Adler (1977).

Nous reviendrons par la suite sur les différences entre ces lignines et sur la notion de variabilité. Il suffit de remarquer ici que les données du tableau II permettent de construire, en fonction de la fréquence des liaisons, des formules développées des lignines de ces plantes. Faisant suite à la première tentative faite, en 1969, par Freudenberg, pour écrire la formule développée de la lignine d'Epicea, Nimz a donc établi, au moyen des données du tableau II, la formule correspondant à la lignine du Hêtre. Ces deux formules, souvent reproduites depuis, présentent le désavantage d'être difficiles à lire à cause du nombre élevé de monomères nécessaires pour faire figurer les liaisons les moins fréquentes dans les proportions exactes. C'est ainsi, par exemple, que le schéma proposé par Nimz ne comporte pas moins de 25 monomères; il correspond à la formule $C_{259}\ H_{281}\ O_{95}$. Comme l'a fait remarquer Faix (1976), ces formules ne permettent pas de comparer de façon sûre et rapide des lignines différentes en fonction, par exemple, de leur composition monomérique ou de liaisons intermonomériques particulières. Dans cette perspective, la représentation sous forme de tableau utilisée par Lai et Sarkanen dans le « Lignins » semble préférable. En particulier Faix a proposé une représentation au moyen de graphes triangulaires

([1]) Selon la nomemclature de Ludwig et Sarkanen (1971) de telles liaisons sont notées (β-β) ou (α-β) par la suite.

TABLEAU II

Comparaison des structures des lignines de Hêtre et d'Epicea d'après les rendements de thioacetolyse obtenus par NIMZ (1974) et la fréquence des liaisons; autres données (1) d'après Adler (1977).

	Hêtre (Fagus Sylvatica)	Epicea (Picea excelsa)
Rendement thioacetolyse (% masse totale)		
Oligomère (fraction non résolue)	9 (PM >2 000)	23 (PM >25 000)
Lignols (tetra-)	(5,3)	(11,8)
(tri-)	(10,9)	(15,5)
(di-)	(25,0)	(20,6)
(mono-)	(49,7)	(29,4)
Totaux	91	77
Fréquence des liaisons		
Unités non condensées	65	48 à 55 (1)
β aryl-ether (β 0 4)	(37)	(48) (1)
α aryl ether (α 0 4)	(28)	(6 à 8) (1)
Unités condensés		
β-1	15	7 (1)
β-5	6	9 à 12 (1)
β-β	5	3,5 à 4 (1)
5-5	2	2 à 10 (1)

dans lesquels figurent non seulement les liaisons intermonomères mais encore le nombre et les proportions relatives des groupes fonctionnels (1) et même le degré de polymérisation (fig. 3).

En conséquence, comme Adler (1977) ou Shakakibara (1977) nous avons renoncé à représenter les lignines au moyen des encombrants schémas traditionnels. Par la suite, nous avons seulement décrit la variabilité des lignines en fonction de la fréquence des monomères et des liaisons entre monomères d'une part et entre monomères et autres molécules d'autre part. Pour ce faire, il est indispensable d'expliquer préalablement la structure des produits de faible degré de polymérisation obtenus soit par synthèse *in vitro* de polymères modèles,soit par dégradation des lignines. Ces produits sont appelés « lignols » d'après Freudenberg, on distingue donc des mono-, di-,...,oligo-lignols selon le nombre des unités monomères qui les constituent.

(1) Pour des raisons analogues, ERHAN a proposé de représenter les protéines grâce à des tableaux à 3 dimensions (1980, Int. J. Bio. Med. Computing, 14, 77).

Avant de présenter les résultats concernant la structure de ces lignols, nous envisagerons quelques propriété physico-chimiques des lignines et tout particulièrement les propriétés macromoléculaires.

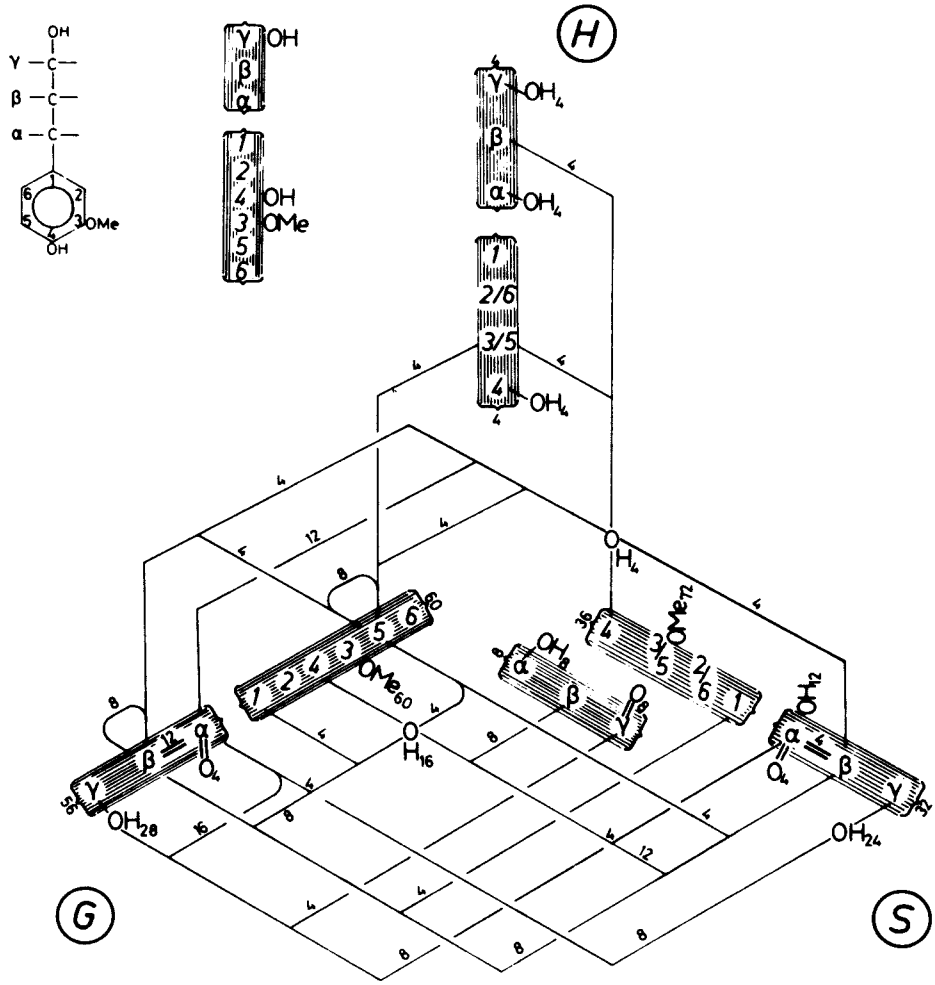


Fig. 3 — Représentation d'un polymère de type lignine contenant 100 monomères à l'aide d'un graphe triangulaire de Faix. Chaque monomère est représenté par la série des chiffres et lettres correspondant aux neuf atomes de carbone selon la notation « usuelle » (fig. 1). En haut à gauche est représenté un maillon gaiacyl et son graphe de Faix; les hydroxyles (OH) et méthoxyles (OMe) sont figurés au côté des numéros des atomes. Pour donner des informations sur l'ensemble du polymère, les monomères H, G, S sont reportés, sur les diagonales d'un triangle équilatéral, dans un cartouche ombré placé entre parenthèse : les numéros, au côté des parenthèses indiquant le nombre des motifs (noyaux, chaînes latérales attachées ou déplacées). Les liaisons interatomiques sont indiquées par des lignes courbes ou brisées; elles peuvent inclure des atomes d'oxygène (O). Seuls les hydrogènes des hydroxyles sont indiqués. Les indices, affectés à chaque symbole, correspondent dans tous les cas, au nombre total des fonctions symbolisées.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES LIGNINES

Compte tenu du caractère polyfonctionnel des trois alcools hydroxycinnamiques précurseurs des lignines, il est de plus en plus généralement admis que la protolignine est un polymère « tridimensionnel en réseau » qui s'étend entre les cellules en incrustant les parois. Il en résulte que le « polymère lignine » est réactif et insoluble. Il est réactif parce qu'il contient encore, par exemple, des fonctions phénoliques, hydroxyles et éthers. Il est strictement insoluble dans les solvants dans la mesure où il forme un réseau infini (infinite network); de façon générale, l'insolubilité des polymères en réseaux (network polymers) s'explique par l'interconnexion de chaînes oligomériques au moyen d'un nombre de liaisons, en général, faible. L'étape ultime de la polymérisation est la « gélification » au cours de laquelle il se forme une macromolécule infinie (infinite macromolecule) dont le degré de polymérisation n'est limité que par le volume disponible (Flory, 1975). L'un des arguments les plus solides en faveur de l'existence de lignine en réseau infini est que l'insolubilité caractéristique de la protolignine s'accompagne d'une solubilité tout à fait normale des lignines d'extraction (Goring, 1971). Il est donc tout à fait vraisemblable que toutes les opérations d'extraction, même les plus douces, modifient les propriétés physico-chimiques des lignines. Le mécanisme de ces réactions de solubilisation est d'autant plus délicat à analyser qu'il a été constaté que les cinétiques d'extraction des lignines en milieux alcalins ou acides sont polyphasiques et que les différentes couches des parois cellulaires ne sont pas délignifiées à la même vitesse. Tenant compte de ces résultats D.A.I. Goring a proposé et discuté, dans l'ouvrage Lignins cité plus haut, une très intéressante théorie de structure en multi-réseau (multi-network) de la protolignine. Selon ce modèle, le réseau des lignines serait constitué par, au moins, deux gels qui se dégraderaient et se formeraient indépendamment. Les énormes différences de polydispersité des lignines d'extraction, allant de 10^3 à 10^5 et 10^6, s'expliquent selon ce modèle par les mécanismes classiques de dégradation des gels (Flory, 1975) : il y aurait formation d'un sol de faible masse moléculaire puis dégradation du gel par fragments de masse croissante. Un tel modèle conduit à supposer l'existence d'une hétérogénéité des masses moléculaires des lignines présentées dans les différents types de tissus; à cette hétérogénéité correspondrait des différences de réactivité et donc de fréquence de liaisons envisagée plus haut. Comme ce type de variabilité n'a pu être observé par analyse des tissus, on est conduit à supposer l'existence d'une hétérogénéité des lignines non plus au niveau tissulaire mais au niveau des cellules elles-mêmes et des diverses « zones » que constituent les parois secondaires, primaires et les différentes parties de la lamelle moyenne. Les observations, faites principalement par Goring et ses collaborateurs par microdensitométrie dans l'ultraviolet, autant lors de la lignification (biosynthèse) que lors de délignifications alcalines (cuissons papetières) semblent bien indiquer l'existence d'une hétérogénéité chimique des lignines au niveau subcellulaire. On ne dispose cependant pas pour le moment de données comparables, à ce niveau, sur la dispersion des masses moléculaires. Quoi qu'il en soit, on doit souligner que les variations de polydispersité des lignines ne s'accompagnent pas de variations importantes des propriétés physicochimiques telles que les absorptions dans

l'ultraviolet (UV) et l'infrarouge (IR), l'indice de réfraction, la viscosité intrinsèque, la forme des agrégats vus en microscopie électronique. On peut donc affirmer que, quel que soit le mode d'isolement les lignines d'extraction solubles ont malgré leur grande polydispersité des propriétés physicochimiques voisines. Cette conclusion n'est pas valable pour les lignines d'extraction insolubles qui sont obtenues après solubilisation des polyosides des parois à l'aide par exemple d'acide sulfurique (lignine de Klason) ou de periodate (lignine de Purve). C'est ainsi que, les courbes de variation du module d'élasticité de ces lignines insolubles en fonction de l'humidité relative, sont significativement différentes de celles de la lignine extractible par le dioxanne chlorhydrique (lignine au dioxanne). Cette dernière est le type des lignines d'extraction solubles. A *posteriori,* ce résultat est peu surprenant mais il est important à souligner ici parce que la lignine au dioxanne est souvent considérée, après comparaison avec les lignines de bois moulus (milled wood lignin ou MWL), comme représentative de la protolignine.

Parmi les diverses propriétés physicochimiques des lignines, seule la composition centésimale sera envisagée par la suite ([1]). Choisie en 1838 par Payen pour caractériser la lignine, elle a conduit Freudenberg, vers 1960, à la découverte des déhydropolymères (DHP) de l'alcool coniférylique (tab. III). A la suite de Freudenberg nous utiliserons donc cette propriété pour définir de façon opérationnelle les lignines ou les DHP et pour décrire ensuite les intermonomères les plus fréquemment rencontrés.

TABLEAU III

Protocole de formation et structure théorique des deux types extrêmes de dehydropolymères modèles des lignines : nomenclatures de Freudenberg ([1]) et Sarkanen ([2])

Protocole	à la verse (Zulauf) ([1])	à la goutte (Zutropf) ([1])
Apport de monomère	rapidement, d'un coup	lentement, goutte à goutte
Teneur initiale du milieu en radicaux	forte	faible
Mode de polymérisation	dimère à dimère puis dimère à polymère	monomère à dimère puis monomère à polymère
Type de polymère	en bloc (bulk polymer) ([2])	en ligne (endwise polymer) ([2])
Fréquence des liaisons ([2])	β-5 > β-β # β-0-4	β-0-4 > β-1 > β-5

([1]) Les variations des différentes propriétés physicochimiques ont fait l'objet d'analyses détaillées dans les ouvrages de Brauns et de Ludwig et Sarkanen.

II. SYNTHESE IN VITRO DE POLYMERES MODELES DES LIGNINES

L'analyse centésimale comparée de lignines a conduit Freudenberg à définir comme lignine toute substance résultant de la polymérisation déhydrogénative des trois alcools hydroxycinnamiques.

Dans le cas de l'alcool coniférylique, la réaction de polymérisation équivaut, au niveau de chaque monomère, à la perte de 2 atomes d'hydrogène et à la fixation de 0,4 molécule d'eau. Choisissant pour oxydant le peroxyde d'hydrogène, la stoechiométrie de polymérisation se traduit par :

$$C_9\,H_9\,O_2\,[OCH_3] + H_2O_2 \equiv C_9\,H_7\,O_2\,[H_2O]_{0,4}\,[OCH_3] + 1{,}6\,H_2O$$

(alcool coniférylique) (déhydropolymère)

Généralisant cette formule à un quelconque mélange de trois alcools monomères décrit par $C_9\,H_{(10-m)}\,O_2\,OCH_3\,{}_m$ on peut, d'après Freudenberg, considérer *a priori* comme lignine toute substante de composition centésimale :

$$C_9\,H_{(8-m)}\,O_2\,[H_2O]_n\,[OCH_3]_m \text{ avec } n < 1 \text{ et } m < 1{,}5$$

Cette définition permet de décrire la lignine de façon statistique, au niveau atomique, en fonction d'une part de leur teneur en méthoxyle et du nombre d'atomes d'hydrogène perdu par polymérisation. Si la formule centésimale trouvée pour une lignine d'extraction est $C_9\,H_x\,O_2\,[H_2O]_y\,[OCH_3]_z$ on calcule, en comparant la teneur x en hydrogène de la lignine avec celle $(10 - z)$ du mélange des alcools monomères décrits plus haut, que la perte P en hydrogène est donnée par $P = (10 - z) - x$.

Comparant 10 lignines MWL isolées de plantes différentes, allant du Hêtre et du Pin au Lycopode et aux mousses en passant par la Luzerne et le Taxodophylon de lignites, Freudenberg a trouvé une valeur moyenne $P = 1{,}94$ avec un écart-type de 0,18. Grâce à ce type d'analyse, il a pu distinguer par exemple, la lignine du Gui (*Viscum album*) poussé sur conifère et de Gui poussé sur angiosperme; cette conclusion a été confirmée depuis par étude RMN du ^{13}C. Par contre, grâce à cette dernière méthode, il n'a pas été possible de confirmer la présence de lignine chez les mousses (*Sphagnum sp*) alors que l'analyse centésimale exprimée d'après Freudenberg ainsi que l'isolement de « lignine de Klason » semblaient en indiquer l'existence. Donc, exception faite pour certains cas particuliers, il est justifié de définir les lignines comme le résultat de la polymérisation déhydrogénative des alcools coniféryliques. La valeur opérationnelle de cette définition analytique a été confirmée à partir de 1945 environ par Freudenberg et ses collaborateurs. Reprenant des résultats publiés en 1908 par Cousin et Herissey, qui avaient décrit la dimérisation d'eugénol (allyl-4-gaiacol) en présence de laccase, Freudenberg a montré que l'on peut synthétiser des polymères de type lignine par oxydation d'alcool coniférylique. Utilisant des préparations enzymatiques du type peroxydase et de l'eau oxygénée comme oxydant, Freudenberg a établi que la structure des polymères formés dépend des conditions de réaction

et en particulier de la vitesse d'apport des substrats. L'existence de différences structurales entre les DHP ainsi formés a été confirmée par RMN ^{13}C par Nimz. Par la suite, Sarkanen a approfondi l'analyse théorique du mécanisme de réaction de polymérisation : il a suggéré l'existence de deux types extrêmes de DHP polymérisés en « bloc » ou en « ligne ». L'ensemble des données du tableau III résume les possibilités de variation de fréquences des liaisons intermonomères. Grâce aux méthodes de dégradation progressive décrites plus haut, il a été possible de constater l'existence de ce type de variations entre des DHP synthétisés de façon différente. Pour préparer ces différents polymères les auteurs ont, principalement, fait appel soit à la synthèse organique de DHP (réactions en solutions et en présence d'enzymes et de substrats bien définis) soit à la biosynthèse *in vitro* (réactions en phase hétérogène en présence de tissus végétaux ou d'extraits de parois cellulaires contenant éventuellement des systèmes oxydasiques de polymérisation). Avant de présenter séparément ces deux groupes de résultats, il convient maintenant de décrire la formation des liaisons intermonomères qui sont à l'origine de différences entre DHP et semble-t-il aussi entre lignines.

NATURE ET FORMATION DES LIAISONS INTERMONOMERES

La comparaison de la structure des produits de polymérisation peu condensés, tels que les di- et les trilignols a conduit Freudenberg à supposer que la formation des DHP et des lignines débute par un processus radicalaire. En présence d'oxydant, la fonction phénolique des alcools hydroxycinnamiques forme un radical libre phénoxyle. Du fait de la conjugaison de leur double liaison, $\alpha\beta$ avec le noyau phénolique, il en résulte la formation du radical stabilisé par résonance dont les principales formes mésomères sont présentées sur la figure 4. L'existence de ces formes a été justifiée *a priori* par le calcul mais elle a été supposée tout d'abord *a posteriori* pour expliquer la structure des produits de condensation en particulier des dilignols représentés sur la figure 4. Tenant compte de la résonance du radical phénoxyl (Ra) de l'alcool coniférylique on peut prévoir l'existence de trois autres radicaux méthylénequinone (« quinone methide radicals ») qui ont des structures quinonoïdes de type *para* (Rb) et *ortho* (Rc et Rd). Ces radicaux présentent des durées moyennes de vie relativement longue; en conséquence on ne peut considérer que les DHP et les lignines soient formés par polymérisation radicalaire classique du type polystyrène. En fait, les radicaux libres de type monolignols et, à un degré moindre les oligo-lignols, sont inhibiteurs des polymérisations radicalaires. Une fois formés, ces radicaux peuvent donner lieu à des réactions de réarrangement ou de condensation qui aboutissent à la formation de dimères et de polymères. Les différents types de liaisons intermonomères rencontrées dans les dimères se retrouvent dans les polymères; c'est en fonction de la fréquence de ces liaisons que sont décrites les structures des DHP et des lignines. Il est bien établi que ce mode de description n'a qu'une signification statistique; des revues détaillées de ce sujet ayant été faites en 1968 par Freudenberg et Neish et surtout par Harkin (1967), nous nous limiterons ici à la description des liaisons constitutives des dimères.

Le dilignol A (fig. 4) est formé par condensation des radicaux Rb et Ra, il en résulte une liaison relativement fragile de type alkyl-aryl-éther sur le carbone β. Le dilignol ainsi obtenu possède donc une structure p-méthylène quinone non aromatique; il peut donc donner lieu à réaction secondaire, attaque nucléophyle du carbone α par RO^- (fig. 3),avec d'autres composés hydroxyles (phénols, alcools, eau). Dans le cas d'une réaction avec l'eau, il en résulte la formation de gaïacyl-glycérol-β-coniféryl-éther (fig. 4A avec R = H). C'est ce type de liaison qui, en moyenne, se forme avec la fréquence la plus élevée autant dans des DHP (tab. III) que dans les lignines (tab. II). De plus, les réactions nucléophyles au niveau du C_α seraient responsables de la formation d'hétéropolymères (complexes lignine-polyosides, estérification du « cœur » des lignines : voir page 147).

Le dilignol B (fig. 4) est formé par condensation des radicaux Rb et Rc, il en résulte la formation d'une liaison très solide de type C_β-C'_5. De ce fait, contrairement au dilignol A, le dilignol B fait partie des unités condensées. Comme le dilignol A cependant, sa formation fait intervenir le réarrangement d'une méthylénequinone; il en résulte la formation de l'hétérocycle coumarane. La structure phénylcoumarane est très fréquente à la fois dans les DHP et les lignines. Le dilignol B ou alcool déhydrodiconiférylique est le premier des dilignols à avoir été caractérisé.

Comme le dilignol B, le dilignol C fait partie des unités condensées; la liaison β-β très solide résulte de la condensation de deux radicaux Rb. Comme dans les cas précédents la formation du dilignol C ou pinorésinol résulte du réarrangement intramoléculaire de p-méthylénequinone. La structure résinol est aussi très fréquente dans les DHP et les lignines.

Comme les précédents, les dilignols D et E font partie des unités condensées mais leur formation est relativement moins fréquente. Le dilignol E, à liaison aryl-aryl-éther 4-0-5 n'est pas détecté en général parmi les dimères isolés lors de la synthèse de DHP. De même, le dimère D, caractérisé par la liaison 5-5 diphényle est formé en quantité relativement importante seulement lors de la polymérisation de monomères ayant des maillons propanes saturés. Ces maillons peuvent appartenir soit à des monomères choisis pour la synthèse de DHP, soit à des unités plus ou moins polymérisées telles que les unités gaïacyl-glycérol, phénylcoumarane ou résinol des dilignols A, B et C. L'existence de ces liaisons dans les lignines et les DHP n'a pu être démontrée qu'après dégradations par double oxydation ou par thioacétolyse. Combinées aux méthodes d'oxydation par le nitrobenzène et d'acidolyse, ces méthodes ont permis de constater que les fréquences des liaisons intermonomères du type A à E de la figure 4 peuvent varier. Avant de décrire ces variations, il convient de souligner que la revue des types de liaison faite ici est très simplifiée. Il est certain, par exemple, qu'en plus de 5 types de condensation présentés sur la figure 4 il peut exister des condensations Rb + Rd ou Ra + Rd qui aboutissent à des liaisons en C_1 avec élimination d'un fragment de monomère. Pour le moment, trois types de condensation (Ra + Ra, Rd + Rd et Rc et Rd) semble ne pas exister. De plus, la formation de méthylénequinones, autres que Ra à Rd, est aussi possible, autant à partir des trois alcools monomères (fig. 1), qu'à partir de leurs produits de réarrangement, comme les aldéhydes et acides hydroxycinnamiques correspondants (fig. 1), ainsi que de leurs

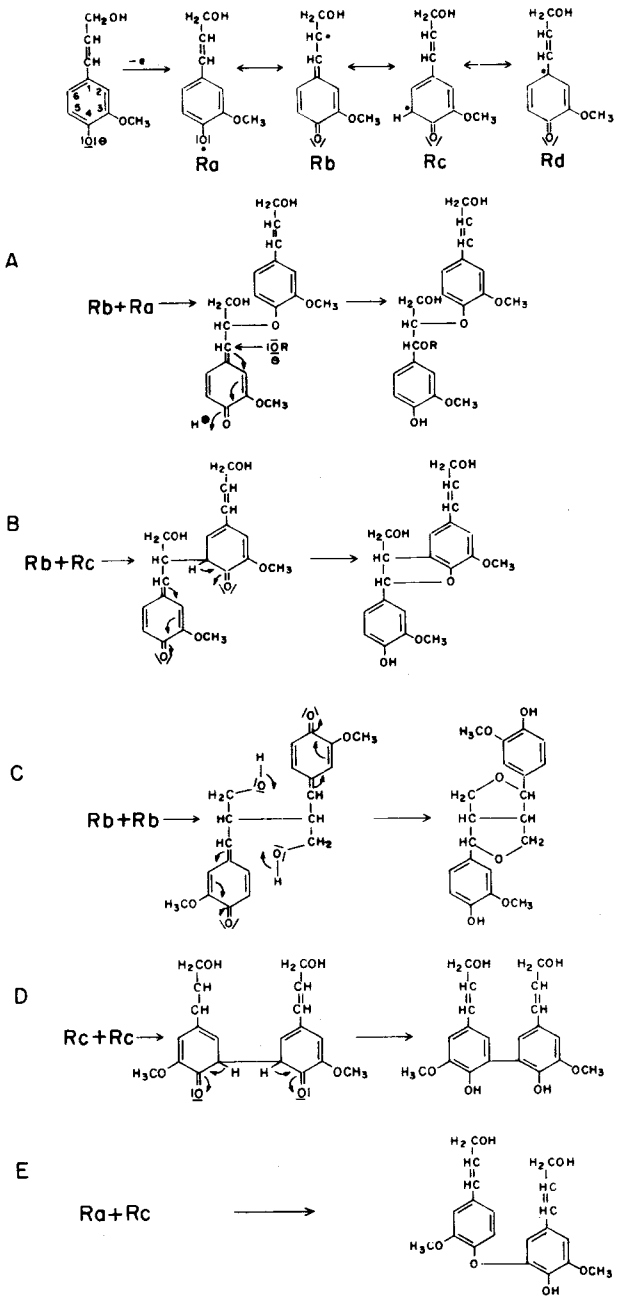


Fig. 4 — Structure et mode de condensation des radicaux mésomères phenoxy et méthylènequinone formés par oxydation radicalaire des alcools hydroxycinnamiques. Les fréquences des réactions de dimérisation dépend à la fois d'effets stériques et électroniques dans les trois séries H, G, S :(voir tableau IV).

homologues insaturés présents dans les di- et oligomères. Enfin certaines liaisons intermonomères peuvent se former ou se réarranger même en milieu faiblement acide. Au total, compte tenu de la diversité des types de liaisons intermonomères possibles et des mécanismes mis en jeu, on ne saurait être surpris de l'existence d'une variabilité des DHP en fonction de leur mode de polymérisation.

Avant de présenter quelques exemples de cette variabilité il convient de rappeler que c'est après avoir isolé et analysé les oligolignols (du trimère à l'hexamère) que Freudenberg et ses collaborateurs ont proposé leur formule développée de la lignine qui a été un instrument remarquable d'explication des propriétés « moyennes » des lignines d'extraction. Ces résultats ont été discutés par Freudenberg et Neish (1968) et ne le seront pas davantage ici.

PROPRIETES DES DHP OBTENUS PAR SYNTHESE ORGANIQUE

Nous ne considèrerons, pour le moment, que les DHP obtenus par polymérisation d'alcools hydroxycinnamiques. Les DHP et les pseudo-lignines formés à partir des produits de réarrangement tels que les acides hydroxycinnamiques seront envisagés plus loin.

Des synthèses de DHP ont été faites autant à partir des trois alcools monomères purs H, G, S (fig. 1) qu'à partir de leurs mélanges. Lorsque la polymérisation est faite à partir de mélanges, on constate qu'en présence de quantités relatives élevées d'alcool sinapylique il y a diminution du rendement en DHP formé et de la proportion des alcools p-hydroxycinnamique et coniférylique incorporés. Entre 1973 et 1975, Schweers et Faix ont synthétisé puis caractérisé 10 DHP contenant des proportions différentes des trois monomères et démontré l'existence d'une hétérogénéité de leur composition en monomère, de leurs masses moléculaires et de la fréquence des liaisons intermonomères. Comparant les rendements de dégradation par le nitrobenzène alcalin et par acidolyse, ils ont constaté que, bien que des quantités significatives d'alcool hydroxycinnamique soient incorporées dans ces DHP, on n'obtient pratiquement pas de produits de dégradation de la série H après dégradation des DHP par le nitrobenzène alcalin ou par éthanolyse. De même, comparant les produits de dégradation obtenus dans les séries G et H, ces auteurs ont observé des différences significatives de rendement relatif selon que les DHP étaient dégradés par acidolyse ou par oxydation par le nitrobenzène alcalin. Ces différences relatives sont expliquées par la variation des fréquences de liaisons entre monomères et en particulier par leur aptitude à former des polymères condensés ou non condensés. De façon générale, à l'opposé de l'alcool hydroxycinnamique, l'alcool sinapylique est difficile à incorporer dans les DHP. Au cours de la polymérisation, cet alcool forme principalement des dimères solubles de type pinorésinol (fig. 4 C). Ce résultat a conduit Freudenberg à supposer qu'il n'existait pas de DHP, et donc pas de lignines, constituées uniquement d'unités syringyles. Cette hypothèse a été infirmée depuis par Higuchi et ses collaborateurs (1977) qui ont synthétisé un hepta-syringylignol caractérisé par une fréquence relativement élevée de liaisons β-0-4 caractéristiques des DHP « en ligne » selon Sarkanen (tab. III). La contradiction apparente entre ces résultats est explicable par le choix fait par ces auteurs de conditions différentes lors des réactions de polymérisation. Il est sûr, en effet, que la fréquence

des liaisons intermonomères peut varier non seulement en fonction des conditions d'apport des monomères (tab. III) mais encore, par exemple :

— en fonction de la réactivité des monomères et des oligomères (effets stériques et électroniques, variation des potentiels d'oxydation);
— en fonction de la spécificité des oxydases et de l'apport en oxydant;
— en fonction enfin des propriétés physico-chimiques du milieu.

Le tableau IV présente un exemple de variation des fréquences de ces liaisons en fonction de la constante diélectrique du milieu. L'augmentation de la fréquence relative des liaiaons β-0-4 lorsque la constante diélectrique diminue s'explique par des effets électroniques et, non pas seulement, par des effets stériques d'encombrement de l'hydroxyle phénolique.

TABLEAU IV

Influence des conditions de polymérisation des alcools hydroxycinnamiques sur les rendements de formation, en pour cent, de 3 dilignols : phénylcoumarane, arylglycérol-β-aryléther et résinol.

D'après Tanamashi M., Takeuchi M. et Higuchi T., (1976) (*Wood Research,* **61**, 44-52).

Milieu	Alcool	Coumarane	β-éther	résinol
eau (peroxydase, H_2O_2) à la verse	p-coumarylique coniférylique sinapylique	48 54	20 19 9	32 27 91
eau + acétone (1) (40 + 3 vol)	coniférylique sinapylique	27	27 27	46 73
eau + dioxanne (1) (2 + 5 vol)	coniférylique sinapylique	39	39 85	22 15
dioxanne pur (1)	sinapylique		94	

(1) déhydrogénation non enzymatique par $FeCl_3$.

Il est évidemment très tentant d'extrapoler ces résultats aux lignines dont le mode de polymérisation pourrait dépendre de la polarité de la portion de paroi cellulaire dans laquelle se déroule la polymérisation. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que la réaction a lieu, dans ces conditions, en phase hétérogène et que les études de biosynthèse *in vitro* de DHP semblent indiquer de tels effets.

BIOSYNTHESE IN VITRO DE DHP

Le terme ambigu de biosynthèse *in vitro* tend à opposer les protocoles de synthèse organique de DHP dans lesquels les conditions de réactions, par

LES POLYMERES VEGETAUX

exemple de milieu, sont relativement bien contrôlées (tab. IV), aux protocoles de synthèse de DHP faisant intervenir des extraits végétaux mal définis. Ce dernier type de biosynthèse permet de préciser les effets de « support » que peuvent exercer des polymères pariétaux sur la polymérisation des DHP. Ce phénomène est d'autant plus important à étudier que, dès les débuts des études des DHP, Freudenberg a montré que les méthylènequinones, monomères ou oligomères, sont susceptibles de se condenser non seulement avec de l'eau, formant des alcools benzyliques mais encore avec les fonctions alcooliques et surtout carboxyliques des polyosides pariétaux (fig. 4 A, ROH). Par la suite, il a été montré que non seulement la réactivité des méthylène, quinones va en croissant dans l'ordre : alcools-tertiaires < -secondaires < -primaires < méthanol < eau < oses < phénols < carboxyles, mais encore qu'elle dépend du milieu et surtout d'effets stériques et entropiques. Les produits de condensation, de type éther ou esters, se formeraient en effet grâce à l'organisation de complexes ternaires. Au total, ces données ont conduit à supposer l'existence d'un autre type d'hétérogénéité dans les DHP dépendant d'une part d'effets de surface consécutifs à l'adsorption des lignols et d'autre part de réactions de greffage avec les fonctions carboxyles ou hydroxyles disponibles. Très peu d'études systématiques ont été faites en ce sens. Cependant, on a rapporté des effets d'augmentation du degré de polymérisation des DHP lorsque les réactions ont lieu en présence de papier imprégné de peroxydases. Par la suite, il a été montré que des acides pectiques et des hemicelluloses sont relativement plus efficaces que par exemple des pectines et de la cellulose. L'existence de complexes covalents DHP-polyosides et DHP-protéine a de plus été observée. On est donc conduit à admettre l'existence d'un facteur supplémentaire d'hétérogénéité des lignines qui dépend de la formation d'associations entre polymères puis de réactions secondaires fonctions de la réactivité des lignines et autres constituants de ces associations.

Les études de synthèse *in vivo* de polymères de type lignine (lignin like polymers ou pseudolignines) par incorporation de précurseurs autres que les alcools hydroxycinnamiques semblent bien confirmer ces hypothèses. Ces résultats sont envisagés à propos de données de biosynthèse; auparavant il est nécessaire de décrire plus précisément les principaux types d'hétérogénéité des lignines.

III. HETEROGENEITE DE LA STRUCTURE DES LIGNINES

L'existence de plusieurs types de lignine a été postulée depuis 1930 après analyse par microscopie optique de tissus lignifiés. Ces travaux de microchimie ont fait appel à deux types principaux de révélateurs.

— des colorants de type aniline, carmin adsorbés plus ou moins spécifiquement en fonction du degré de lignification;
— des réactifs capables de réagir spécifiquement avec certains groupements fonctionnels des lignines.

C'est ainsi que la réaction de Wiesner au phloroglucinol-chlorhydrique révèlerait les fonctions hydroxycinnamaldéhyde. De même, les réactions à l'eau de chlore-sulfite de sodium ou de permanganate-ammoniaque (réaction de Maüle) permettent de distinguer les groupements gaïacyl des groupements syringyles qui, dans ces deux réactions, donnent une coloration rouge. Grâce à ces dernières méthodes, il a été possible de montrer l'existence de différences qualitatives, non seulement entre les lignines des gymnospermes et des angiospermes, mais encore entre les lignines présentes dans les différents tissus, cellules et parties de cellule d'une même plante. A quelques exceptions près le xylème des angiospermes réagit positivement à la réaction de Maüle contrairement à celui des gymnospermes. Dès 1940, l'analyse comparée de ces lignines par oxydation au nitrobenzène alcalin a permis d'expliquer ces résultats, exceptions comprises, par l'absence presque complète de monomère de type syringyle chez les gymnospermes. De même, on a constaté que, de façon générale, chez les angiospermes, les parois secondaires des fibres du xylème donnent lieu à réaction de Maüle positive alors que la lamelle moyenne réagit peu, comme le ferait une lignine de gymnospermes. Des différences analogues ont été constatées dans le phloème et les vaisseaux en fonction de l'âge des tissus et, en particulier, lors de cultures de tissus confirmant l'impression d'hétérogénéité des lignines au niveau cellulaire et subcellulaire. Ces observations cependant (et tout particulièrement celles obtenues avec les colorants) sont sujettes à caution, parce que les différences locales de coloration peuvent dépendre des variations des propriétés des parois donnant lieu à adsorption ou réaction. C'est en partie pour ces raisons que, depuis 1970 environ, à la suite des travaux de Goring, plusieurs équipes ont fait appel à l'absorption caractéristique des noyaux benzéniques dans l'ultraviolet pour analyser, la localisation et l'hétérogénéité des lignines, par microdensitométrie. Malgré des difficultés pratiques et théoriques de mise en œuvre, cette méthode a permis de confirmer l'existence de plusieurs types de lignines. Ces différentes lignines ont été caractérisées qualitativement et quantitativement par la forme et l'intensité de l'absorption U.V à partir de 240 nm. Les études de Goring et collaborateurs ont concernés soit des tissus différents provenant d'une même plante, soit des bois homologues de 16 angiospermes et gymnospermes choisies et classées d'après leurs teneurs croissantes en méthoxyle par unité monomère (rapport MeO/C_9). Dans le cas du xylème de Bouleau (*Betula sp*), cette technique a permis de confirmer que la lignine de la paroi secondaire des vaisseaux et de la lamelle moyenne est principalement composée de monomères gaïacyl-propane (lignine de type gymnosperme) alors que la lignine déposée dans celle des fibres est principalement de type syringyl-propane. Dans le cas des 16 échantillons de bois dont le rapport MeO/C_9 allait de 0,91 à 1,64, ces résultats ont été généralisés montrant une augmentation progressive des teneurs en monomères de type syringyle dans les parois des fibres et des rayons alors que les parois des vaisseaux et les coins des cellules contiennent principalement des éléments gaïacyl. Dans le cas du Peuplier, cette technique a permis de constater l'existence de différences qualitatives et quantitatives entre les lignines de bois de réaction (bois normal et bois opposé). De plus, mettant à profit les déplacements de spectre UV consécutifs à l'ionisation des fonctions phénoliques en milieu alcalin, Goring et ses collaborateurs ont montré que les lignines des parois secondaires de gymnospermes se caractérisent par une teneur en phénols libres, en moyenne, deux

fois plus forte que celle des lamelles moyennes. Ce dernier résultat a permis de préciser l'analyse des effets de délignification sélective, effets topochimiques, au cours desquels on constate des cinétiques de délignification différentes : les parois secondaires sont en général délignifiées plus rapidement que les parois primaires et surtout les coins des cellules. C'est sur l'analyse de ces cinétiques et sur celle de la dispersion des masses moléculaires des lignines et complexes lignine-polyosides que Goring a fondé sa théorie de la structure en multi-réseau de la protolignine. Les données fournies par ailleurs dans la littérature sont compatibles avec cette théorie. Lors d'expériences de délignification de coupes de bois de Peuplier par le dioxanne chlorhydrique ou par des bactéries nous avons constaté, par microscopie électronique, des effets topochimiques au niveau des parois secondaires des fibres et des vaisseaux (Czaninsky et al. 1979). Au total, toutes ces données conduisent à affirmer l'existence de plusieurs types de lignines sans préciser cependant les origines de cette hétérogénéité. Pour le moment, il est possible de distinguer trois causes principales d'hétérogénéité fonctions :

- de la fréquence des monomères;
- de leurs modes de liaison dans les multiréseaux;
- des liaisons de ces réseaux avec d'autres molécules.

HETEROGENEITE LIEE A LA FREQUENCE DES MONOMERES

Ce type d'hétérogénéité est de loin le plus étudié. Nous avons vu qu'il peut être mis en évidence de façon relativement aisée, par microscopie ou par analyse centésimale. Les variations du rapport MeO/C_9 citées plus haut rendent compte du fait que les lignines naturelles sont des hétéropolymères contenant les trois alcools H, G et S du tableau I. Les indices MeO/C_9 des homopolymères correspondants, lignines H, G et S pures, sont respectivement égaux à 0, 1 et 2. L'analyse centésimale permet donc, *a priori,* de caractériser l'hétérogénéité des lignines par le calcul du rapport du nombre des monomères G et S. Les monomères H, qui ne sont évidemment pas comptés dans ces cas, peuvent l'être si l'on utilise les méthodes de dégradation progressive envisagées plus haut et si l'on fait le bilan produits correspondants aux trois séries. Compte tenu du fait qu'aucune de ces méthodes n'est quantitative, on ne saurait être surpris que les proportions en monomères mesurées à l'aide de chacune d'entre elles donne des résultats différents. C'est ainsi que l'oxydation par le nitrobenzène alcalin donne des rapports S/G en aldéhydes en C_7 (tab. I) voisins mais parfois sensiblement supérieurs à ceux donnés par l'acidolyse pour les cétones de Hibbert des séries S/G représentées sur la figure 1. Ces deux méthodes ont permis cependant de montrer la présence de monomères non condensés de la série H en quantité relativement importante dans les lignines de monocotylédones. Les deux autres méthodes de dégradation qui permettent d'estimer non seulement les proportions des unités H, G, S dans les unités condensées et non condensées sont surtout utilisées, en conséquence, pour analyser l'hétérogénéité du second type : fonction des liaisons

intermonomères. Quoi qu'il en soit, toutes ces méthodes concordent pour confirmer l'existence du premier type d'hétérogénéité même si elles contribuent à donner des images différentes et souvent difficiles à comparer. C'est la raison pour laquelle les méthodes d'analyses quantitatives, analyses centésimales ou spectroscopiques, sont parfois préférées pour décrire l'hétérogénéité liée aux fréquences des monomères. Dans le tableau V sont présentés les résultats obtenus à l'aide de 5 équations d'approximation linéaire fondées sur la composition centésimale en carbone total, en méthoxyle, sur l'absorbance UV et IR de lignines de bois moulu. Bien que confirmant l'existence même du premier type d'hétérogénéité, ces résultats ne permettent pas d'affirmer l'existence de lignines de type homopolymère constituées par exemple de seuls monomères S.

Compte tenu de la formation préférentielle de dimères de type résinol, lors de la synthèse de DHP à partir de l'alcool sinapylique, on a longtemps douté de l'existence d'une « lignine S ». Ce doute est d'autant plus surprenant que lors de la dégradation de lignines par le nitrobenzène, il a été obtenu des rapports S/V de l'ordre de 5 à 8 alors qu'en général ces rapports sont inférieurs à 3 chez les angiospermes. Ce n'est qu'en 1978, que, pour la première fois, des lignines de type S ont été isolées à partir de lignines de bois moulus. Mettant à profit des différences de solubilité de complexes mercuriques qu'ils avaient observées sur « DHP-syringyl » cités plus haut, Yamazaki, Hata et Higuchi ont isolé et démontré chimiquement l'existence de lignine de type syringyle qui est en cours de caractérisation. En conséquence, compte tenu de l'existence de lignine G chez les gymnospermes, on peut considérer comme certaine l'existence d'une hétérogénéité des lignines fonction de leur composition en monomères.

TABLEAU V

Composition relative en monomères de lignines de bois moulus : proportions calculées à l'aide d'équations d'approximations linéaires à partir de cinq groupes d'analyses centésimales et spectroscopiques,
(d'après Faix (1976), *Papier*, **30**, V1-V9).

	% H (1)	% G (1)	% S (1)
Gymnospermes (Picea sp)	6 à 7	90 à 89	4
Monocotylédones (Bambusa sp)	10 à 13	55 à 56	35 à 31
Angiospermes			
(Fagus sp)	5 à 7	45 à 47	50 à 46
(Piptadienastrum sp) (2)	11 à 14	44 à 45	45 à 41

(1) notation des séries monomères du tableau 1.
(2) origine tropicale.

HETEROGENEITE LIEE A LA FREQUENCE DES LIAISONS

Compte tenu des différences de réactivités observées entre les monomères G et S lors de la synthèse des DHP on ne saurait être surpris de l'existence d'une hétérogénéité du second type, c'est-à-dire, résultant de variations de fréquence des liaisons pour une composition en monomère donnée. On peut, par exemple, supposer que les conditions de polymérisation étant différentes, soit par la disponibilité en oxydant, soit par la polarité du milieu, il peut y avoir variation du degré de condensation des monomères soit par formation d'un polymère en masse (due à une accumulation de dimères) soit par formation d'un polymère en ligne (due à une augmentation de la fréquence des liaisons β-0-4 : tab. III et IV). Pour le moment, on ne dispose d'aucune certitude concernant l'existence de ce second type d'hétérogénéité. Cet état de choses résulte du fait que, premièrement les lignines d'extraction isolées ne subissent en général pas de fractionnement avant analyse, et que, deuxièmement les méthodes d'analyse permettant de suivre les variations du degré de polymérisation (double oxydation et thioacétolyse) n'ont été mises au point que depuis quelques années. Cependant, les résultats obtenus depuis 1973 par Miksche et collaborateurs, grâce à la méthode par double oxydation, rendent très vraisemblable l'existence d'une « non-homogénéité » de la lignine totale des plantes. Pour parvenir à cette conclusion ces auteurs ont comparé les rendements de formation de 9 esters méthyliques (fig. 2) et ils ont défini un indice h en calculant le rapport des quantités absolues d'unités non condensées S et G soit (a_3/a_2), et des unités condensées aryl-alkyl-éther S, G soit (a_7/a_8) et diphényle. L'hétérogénéité des lignines peut être exprimée soit par la variabilité de h, soit par la dispersion des points représentatifs des lignines sur deux axes de coordonnées : (a_3/a_2) et (a_7/a_8). Pour préciser ces résultats nous avons calculé, à partir des données de ces auteurs, un indice c égal au rapport de la quantité totale d'unités non condensées (a_1, a_2, a_3) à celle des unités condensées (a_4 à a_9). La figure 5 donne la dispersion des points représentatifs du rapport c pour 40 dicotylédones. Le tableau VI regroupe les rendements d'obtention de 3 esters ainsi que les valeurs des rapports h, c et $r = a_2/a_3$. Ce dernier rapport est comparable au rapport S/V d'oxydation par le nitrobenzène; il rend aussi compte de la fréquence des unités G et S non condensées. La comparaison des tableaux V et VI permet de constater l'existence de l'hétérogénéité liée à la fréquence des monomères : il semble que les différences des indices h et des indices c et r correspondant à toutes ces plantes ne puissent être expliquées que par l'existence d'une variabilité des lignines en fonction de la fréquence des différentes liaisons. La dispersion des points représentatifs des 40 lignines de la figure 5 peut résulter de l'existence d'une variabilité fonction du degré de condensation des monomères. Cette variabilité est manifeste, non seulement, au niveau interspécifique, mais aussi au niveau des divers organes d'un même végétal (fig. 5). De telles variations peuvent s'accompagner de modifications dans les proportions relatives en monomères qui rendent plus difficile l'analyse de l'hétérogénéité : le cas des bois de réaction est significatif de fait. Dans le tableau VI figurent le bois normal et le bois de réaction du Pin : alors que le rapport r varie peu, on constate une variation de c et une augmentation de a_1. La dégradation par double oxydation ou par

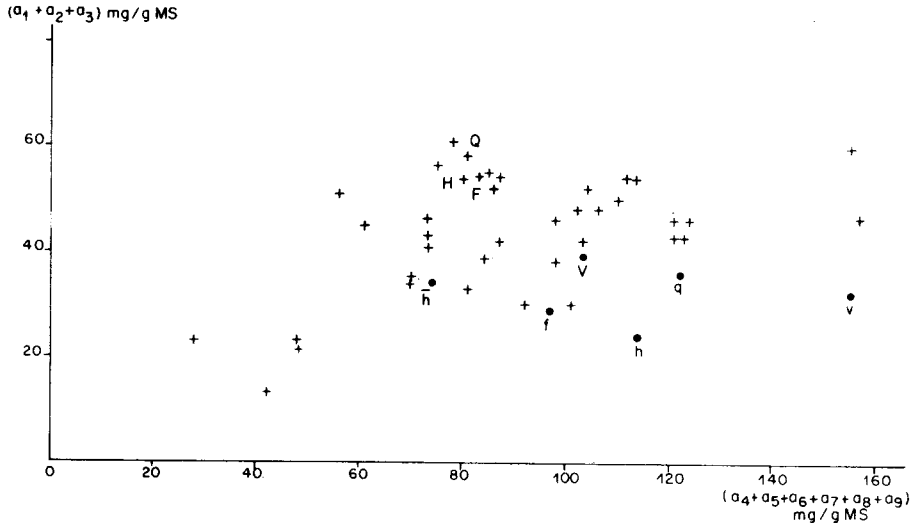


Fig. 5 — Représentation bidimensionnelle de la variabilité du degré de condensation des lignines de 40 dicotylédones. Les rendements en esters a_1 à a_9 obtenus après double oxydation (fig. 2) par Erickson et Miksche (1974) ont été utilisés pour représenter la dispersion des quantités totales des unités non condensées (a_1 à a_3) en fonction de celles des unités condensées (a_4 à a_9). Aux analyses du bois du Hêtre (H), du Frêne (F) et du Chêne (C) correspondent celles des feuilles (lettres minuscules) et des racines (lettres surlignées).

acidolyse dans le dioxanne (Shakakibara, 1977) a révélé l'existence de « liaisons condensées » caractéristiques des lignines de bois de compression, et donc de variation de la fréquence relative des différentes liaisons intermonomères. En conséquence, il parait raisonnable d'admettre que l'hétérogénéité des lignines rapportée dans la figure 5 et le tableau VI résulte d'un phénomène analogue et cela bien que les analyses aient été faites sur « la lignine totale » des plantes.

HETEROGENEITE PAR LIAISON A D'AUTRES MOLECULES

Il est certain que les propriétés physicochimiques d'une lignine donnée peuvent être modifiées par liaison covalente de celle-ci avec d'autres molécules polymérisées ou non. La formation spécifique de telles liaisons constitue donc un troisième facteur d'hétérogénéité des lignines. L'analyse de ce dernier type d'hétérogénéité est d'autant plus délicate à faire que l'on connait mal les deux autres et que, surtout, son existence peut dépendre de la formation d'un nombre relativement très faible de liaisons. De façon générale, il est démontré, que lors du greffage de deux polymères, la formation de quelques liaisons pour cent monomères peut suffire pour provoquer la formation d'un réseau infini (Flory, 1975). Dans le cas des lignines, on ne peut négliger la possibilité de tels effets au niveau des complexes lignines-polyosides. Les études modèles sur DHP semblent indiquer que les fonctions alcool-p-hydroxybenzylique sont les sites privilégiés pour de telles interactions (fig. 4 A). En conséquence, pour caractériser le troisième type d'hétérogénéité, il est nécessaire de tenir compte aussi des possibilités de blocage

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

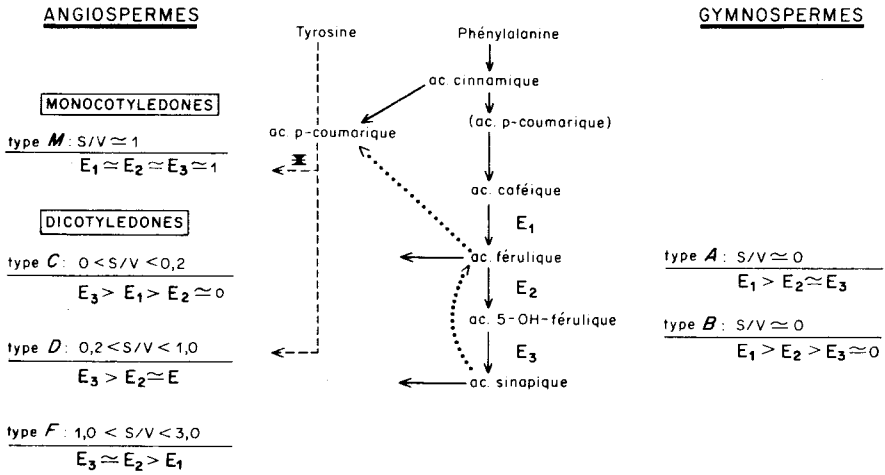
TABLEAU VI

Comparaison de la variabilité des lignines d'angiospermes et de gymnospermes au moyen des 9 esters méthyliques obtenues par double oxydation (fig. 2). La variabilité est estimée au moyen des indices et des rendements publiés par Erickson et Miksche (1974); $\bar{a}_1$, $\bar{a}_2$, $\bar{a}_3$ *: rendements en mg/g matière sèche pour les trois esters* a_1, a_2, a_7 *(fig. 2). Indices* r, h *et* c *définis par* $r = \bar{a}_2/\bar{a}_3$, $h = (\bar{a}_7/\bar{a}_8) \times r$ *et* $c = (\bar{a}_1 + \bar{a}_2 + \bar{a}_3)/(\bar{a}_4 + \bar{a}_5 + \bar{a}_6 + \bar{a}_7 + \bar{a}_8 + \bar{a}_9)$. *L'indice* h *n'est pas calculé* (nc) (1) *chez les gymnospermes ou* a_8 *n'est pas dosable* (nd) (1).

Espèces sp	$\bar{a}_1$	$\bar{a}_2$	$\bar{a}_7$	*r*	*c*	*h*
Dicotylédones						
Acer	*nd* (1)	16,9	0,7	0,5	6,0	1,1
Betula	"	11,7	0,4	0,3	6,7	1,8
Cornus	"	6,7	0,5	1,1	3,1	1,2
Fagus	"	13,4	0,6	0,3	6,7	1,1
Knautia	"	15,2	0,6	0,7	5,2	1,2
Quercus	"	15,5	0,7	0,4	7,0	1,3
Salix	"	20,3	1,3	0,5	3,4	1,7
Urtica	"	17,0	1,1	1,3	3,0	1,5
Veronica	"	8,9	0,4	0,7	4,4	1,0
Vitis	"	15,6	0,8	0,6	3,9	1,1
Monocotylédones						
Alisma	0,4	30,6	2,1	2,1	2,2	1,2
Allium	0,8	23,0	1,0	1,2	4,4	1,4
Alopeavus	1,4	15,9	0,7	1,5	3,8	0,6
Asparagus	1,3	23,1	1,0	0,9	5,2	1,5
Butomus	0,7	18,5	1,5	1,7	2,2	1,3
Deschampsia	1,6	27,4	1,0	2,0	4,3	0,7
Eriophorum	3,0	13,5	0,5	1,0	4,3	1,5
Iris	0,6	14,6	0,7	1,7	3,5	1,6
Juncus	3,5	15,2	0,4	1,0	4,7	1,1
Triticum	4,3	15,8	0,6	0,9	5,8	0,7
Gymnospermes						
Chamaecyparis	4,2	62	5,0	155	1,8	*nc* (1)
Cryptomeria	0,6	65	5,0	130	1,7	"
Gingko	5,5	65	5,2	81	2,0	"
Juniperus	2,0	54	5,2	54	1,5	"
Larix	2,6	70	5,5	78	1,8	"
Metasequoia	3,7	53	3,7	106	2,1	"
Picea	1,3	57	4,4	48	1,9	"
Pinus	3,1	63	5,2	63	1,7	"
Pinus (Bois réaction)	10,5	59	4,8	65	2,2	"
Taxus	3,0	54	5,7	108	1,5	"

TABLEAU VII

Relation entre la variabilité des teneurs en monomères des lignines et l'activité des enzymes E_1, E_2, E_3 de conversion de l'acide caféique en acide sinapique : classification des lignines en 6 groupes d'après Shimada M., Fushiki H., Higuchi T., 1973, Mokuzai Gak. **19**, 13-21, en pointillé = reconversions possibles; en tiret = voie de la tyrosine, surtout chez les monocotylédones (*).



de ces mêmes fonctions par des molécules non polymérisées telles que les acides organiques, acide acétique ou phénolique.

Un cas particulier évident d'association avec des polymères est constitué par la condensation des différents réseaux de lignine. Ce cas est important à considérer parce que des modèles modulaires de lignine ont été proposés. D'après Fors et Fremer la lignine de conifères serait formée de modules de 18 monomères relativement difficiles à dégrader. Ces modules seraient connectés d'une part entre eux, par des liaisons γ-alkyl-éther labiles, et d'autre part avec les polyosides par les liaisons éther-benzyliques. En plus de ces structures régulières il existerait des hémilignines.: substances aromatiques peu polymérisées et encore mal caractérisées. Le modèle de Fors est fondée sur des analyses sophistiquées de bois brut par tamisage sur gel. Ces analyses n'ont pu être reproduites, alors que plusieurs auteurs ont cependant observé des distributions bimodulaires après tamisages dans d'autres conditions. La question de « l'hétérogénéité modulaire » des lignines reste donc en suspens.

Par contre, l'existence d'hétérogénéité fonction de liaisons avec les polyosides semble plus vraisemblable. L'existence de liaisons covalentes entre oses et lignines a été montrée par analyse des oses hydrolysés de lignines perméthylées. Cependant, l'existence d'associations spécifiques avec des hémicelluloses particulières reste controversée principalement à cause des difficultés de purification de ces complexes. La plupart des auteurs s'accordent pour attribuer une grande importance aux liaisons esters qui pourraient s'établir, selon le mécanisme de la

figure 4 A, entre les alcools p-hydroxybenzyliques et les fonctions carboxyles des acides uroniques des hémicelluloses.

Du fait des compétitions possibles, l'existence de liaisons esters avec d'autres acides organiques mérite considération. La présence d'esters d'acides organiques dans les lignines d'extraction est bien confirmée. Ce sont surtout les esters des acides phénoliques qui ont été étudiés, acides benzoïques chez les Peupliers et surtout acides hydroxycinnamiques chez les monocotylédones. Les teneurs en esters de ces lignines sont au maximum de quelques pour cent. Dans les autres végétaux, il existerait des esters d'acide acétique. On dispose cependant de peu d'informations sur ce type d'hétérogénéité qui est d'autant plus difficile à étudier que les lignines sont isolées sous forme de complexes avec des polyosides qui peuvent être eux-mêmes estérifiés. Lors d'une étude de tels complexes isolés de paille de Blé et de bois de Peuplier, nous avons constaté la présence en quantités voisines d'esters des trois acides en C_7 (B, V, S : tableau I) chez le Peuplier et de deux acides en C_9 (PC, FE : tableau I) chez le Blé. Après hydrolyse des polyosides soit à l'aide de cellulases fongiques ou d'acide chlorhydrique 6 N à 100 °C, nous avons observé dans les lignines ainsi purifiées, la présence presque exclusive du seul acide p-hydroxybenzoïque (B) chez le Peuplier, et de l'acide p-coumarique (PC) chez le Blé (Monties, 1980). Ces résultats montrent donc la possibilité d'une estérification spécifique des complexes lignine-polyosides, par certains acides phénoliques.

Comme la formation d'esters aromatiques a été observée lors de la polymérisation oxydative de DHP en présence d'acide p-hydroxybenzoïque et d'acide p-coumarique (Nakamura et Higuchi, 1978), on peut conclure qu'il semble exister, en plus d'une variabilité liée à la fréquence des monomères et à leur mode de liaison, un troisième type de variabilité résultant de la formation de liaisons spécifiques avec des molécules, qu'elles soient polymérisées ou non.

IV. BIOSYNTHESE DES LIGNINES

C'est certainement dans le domaine de la biosynthèse que les connaissances ont progressé le plus vite depuis 1960. En plus des ouvrages mentionnés dans l'introduction et de l'article de Higuchi (1977) il suffit de citer ici, trois revues publiées, elles aussi, en 1977 par Wardrop, Gross et Grisebach. Comme ces dernières concernent respectivement de façon spécifique la cytologie, l'enzymologie et la régulation de la lignification, nous nous limiterons surtout à dégager les résultats en relation avec la variabilité des lignines ainsi que les conséquences concernant la fonction et la valorisation des lignines.

Etant donné l'hétérogénéité du bois lui-même, l'analyse cytologique de la lignification est absolument indispensable. En ce domaine, les observations de Wardrop permettent d'envisager une fonction essentielle des lignines : l'établissement de contraintes de croissance et de poser le problème de l'origine des précurseurs.

La lignification n'a lieu que pendant la croissance des cellules,ce qui n'exclut pas la possibilité de réarrangements moléculaires et même la formation de nouvelles liaisons après cette période. Il peut en résulter une hétérogénéité du troisième type avec, par exemple, variation de la porosité des parois. De plus, systématiquement, la lignification des différentes couches des parois ne se fait pas de façon uniforme. Au commencement de la formation des épaississements secondaires,(en fin d'accroissement en surface des cellules),la lignification débute dans la paroi primaire et seulement dans les coins des cellules. Elle progresse ensuite dans la lamelle mitoyenne des parois tangentielles puis dans les parois radiales. Enfin, les couches S_1, S_2, S_3 se lignifient successivement. Wardrop a montré que dans chaque cas,la lignification a lieu nettement après le dépôt des polyosides et qu'elle s'accompagne en général d'un gonflement des parois. Ce dernier phénomène est essentiel : la plupart des spécialistes s'accordent pour attribuer à ce gonflement l'existence des contraintes de croissance, qui assurent le port normal des végétaux ligneux, ainsi que l'apparition de tensions ou de compressions dans les bois de réaction des végétaux écartés de leur position normale (Archer et Wilson, 1977). Ces tensions, qui peuvent atteindre plusieurs centaines de kg/cm^{-2}, proviendraient de la contraction longitudinale des parois; elles dépendraient de l'incrustation par la lignine des fibres cellulosiques et de variations des angles de ces fibrilles entraînées par le gonflement des parois. Il est remarquable que ce même mécanisme puisse rendre compte des particularités des bois de compression de gymnospermes et des bois de tension des angiospermes, alors que les lignines de ces plantes sont normalement différentes (tab. V) et que, de plus, les lignines des bois de réaction de gymnospermes sont relativement plus riches en unités H (tab. VI) alors que celles des angiospermes, moins bien connues, le seraient en unités S. On peut donc, dans le cas tout au moins de cette fonction, supposer que c'est grâce à la variabilité des lignines, qu'une même fonction, l'incrustation, peut être assurée au niveau de structures polyosidiques différentes mais toutes susceptibles de gonflement et de contraintes mécaniques.

Le second aspect cytologique de la biosynthèse des lignines concerne l'origine extra- ou intra-cellulaire des précurseurs. D'après Freudenberg,les alcools hydroxycinnamiques seraient transportés sous forme de glycosides, hydrolysés par des glucosidases fortement liées au cambium puis incorporés dans le xylème après diffusion centripete. La réaction colorée à l'indican des glucosidases souvent décrite (Freudenberg et Neish, 1968) n'a pu cependant être reproduite par Wardrop (1977) ni Marcinowsky et al. (1979). Dans le cas d'hypocotyles d'Epicea, ces derniers auteurs ont localisé la glucosidase dans la couche interne des parois secondaires et dans toutes les cellules. Ces observations infirment donc la théorie de l'origine extracellulaire des précurseurs. Par contre, elles confirment les conclusions de Wardrop qui suppose, à la fois, que les précurseurs proviennent des cellules en cours de lignification et que les modalités de lignification des espaces intercellulaires dépendent d'une sorte de reconnaissance (recognition) entre les cellules. D'après Wardrop, la composition chimique des substances intercellulaires serait déterminée au moment de la division cellulaire; il en résulterait une potentialité de lignification fonction de la diffusion des précurseurs à partir des cellules en cours de lignification. C'est donc aux deux niveaux intra- et inter-cellulaire que se situerait l'origine de l'hétérogénéité des lignines. Cette hypothèse serait donc valable tout autant pour les différentes couches cellulaires des bois normaux que pour les divers bois de réaction.

La diversité des mécanismes enzymatiques mis en cause lors de la biosynthèse des lignines est compatible avec cette variabilité. Nous envisagerons, dans cette perspective, seulement la biosynthèse des monomères dans son ensemble puis les réactions de polymérisation.

Il est actuellement admis que tous les végétaux sont susceptibles d'incorporer la phénylalanine (Phe) dans les trois alcools hydroxycinnamiques. Actuellement on accepte un schéma en cinq étapes :

1) désamination de Phe en acide cinnamique (CI);
2) hydroxylation en CI en acide *p*-coumarique (PC);
3) hydroxylation et méthoxylation successives de PC en acide caféique (CA), férulique (FE), 5-hydroxyférulique (HF) et enfin sinapique (SI);
4) activation de PC, FE et SI sous forme d'ester du coenzyme A (CoA);
5) réduction en aldéhyde puis en alcools cinnamiques en C_9 (tab. I).

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de ces étapes, tout particulièrement, par les équipes de Bland et de Higuchi. Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de variation de ce schéma général en cinq étapes en fonction de la nature des plantes et même de leurs conditions de cultures (tissus « *in situ* » ou en « culture » ou en « survie »). Ils ont observé par exemple l'existence de réaction de reconversion des acides en C_9 (SI–FE et FE–PC) avant incorporation dans les lignines. De même, une incorporation relativement intense de tyrosine a été observée chez les monocotylédones non seulement dans les esters p-coumariques mais aussi dans les monomères H (Higuchi et al. 1967). Enfin, il a été possible d'établir une corrélation entre la composition monomérique des lignines, estimée par le rapport V/S des aldéhydes en C_7 (tab. I), et les activités relatives de trois enzymes qui aboutissent à la synthèse de SI à partir de CA (étape 3 du schéma général). Le tableau VII résume ces différentes observations. Bien que déjà complexe, ce tableau ne rend pas compte de toutes les possibilités d'explication, au niveau enzymatique, de la variabilité des lignines. Récemment en effet, la présence de lignine G dans une angiosperme a pu être expliquée par la diminution en fonction de l'âge de la seule acide férulique-5-hydroxylase (Kutzuki et Higuchi, 1978). De même, l'accumulation de lignine S ou G dans du xylème de Peuplier en survie a pu être attribuée à la spécificité des trois cinnamoyl-CoA-ligases (Grand et Ranjeva, 1979). Sans entrer davantage dans les détails on peut donc conclure qu'au moins le premier type d'hétérogénéité des lignines est aisément explicable au niveau enzymatique.

Il n'en est pas de même pour le second type d'hétérogénéité principalement parce que ce dernier a été encore peu étudié.

Cependant, compte tenu des possibilités de variation de la fréquence des liaisons dans les DHP en fonction des conditions de polymérisation (tab. III), on peut supposer qu'une variabilité analogue pourrait exister dans les lignines dans la mesure où les conditions de déhydrogénation pourraient varier avec les conditions physiologiques. C'est la raison pour laquelle nous envisagerons maintenant les réactions de polymérisation.

Tentant de généraliser les résultats obtenus par Freudenberg lors des synthèses de DHP en présence de H_2O_2, de nombreux auteurs ont affirmé que des peroxydases sont responsables de la polymérisation déhydrogénative des lignols. C'est

ainsi que Harkin a conclu récemment à la participation exclusive des peroxydases à la lignification, bien qu'il ait insisté auparavant sur le triple problème que posent l'origine, le transport et le contrôle de la concentration des peroxydes (Harkin, 1967). Depuis, on a constaté que les peroxydases pariétales ont une activité oxygénasique : en présence de composés réduits, elles consomment de l'oxygène pour synthétiser des peroxydes. De plus, Gross, a décrit la présence de malate-déhydrogénase pariétale capable de synthétiser du nicotinamide réduit (NADH) consommé lors de la réaction oxygénasique. De ce fait, ce modèle de polymérisation oxygénasique des lignines proposé par Gross (1977) résoud le triple problème posé par Harkin. Il nous a été possible d'en confirmer la validité dans des coupes de tiges d'Oeillet (Catesson et al. 1978) mais non dans celles de Blé et de Peuplier (Monties, 1980); ces derniers résultats sont inexpliqués. Quoi qu'il en soit, la diversité des mécanismes de polymérisation est compatible avec une variabilité des types de polymérisation des lignines. Pour le moment, aucune étude ne semble avoir été faite, en ce sens, sur la variabilité des fréquences de liaisons. Cependant, on dispose de résultats montrant une hétérogénéité du degré de condensation des lignines. C'est ainsi que l'on a montré, lors d'incorporation de ^{14}C-phénylalanine dans la lignine de monocotylédones (Higuchi et al. 1967) et de Peuplier (Alibert et Boudet, 1979), l'existence de lignines néoformées aisément dégradées par le nitrobenzène alcalin; ces lignines seraient estérifiées mais les acides ne représentent, dans le cas du Peuplier et du Blé, qu'une faible part de la fraction soluble dans la soude (Monties, 1980). Or, les études de synthèse *in vitro* de DHP en présence d'acides aromatiques en C_7 et en C_9 (tab. I) ont montré que la formation de tels esters pouvait résulter de réactions de déhydrogénation selon le mécanisme A figure 4. En conséquence, il n'est pas déraisonnable de supposer que des variations des conditions de déhydrogénation, disponibilité en malate par exemple, pourraient entraîner des variations de fréquence des liaisons non seulement entre les monomères mais avec les autres molécules.

Cette dernière hypothèse conduit à envisager, pour terminer, la régulation de la lignification. Des conclusions souvent contradictoires ont été tirées des études de l'influence de facteurs tels que l'éclairement, la fumure minérale, la pression partielle d'oxygène sur la lignification. Il semble prématuré de discuter ces conclusions parce que ces facteurs peuvent agir autant sur le métabolisme général que sur les voies spécifiques de lignification. Des phénomènes de régulation semblent possibles au moyen de la compartimentation subcellulaire des précurseurs, de complexes multienzymes, de variations de perméabilité des membranes ou des charges énergétiques. Il est pour le moment difficile d'estimer l'importance de ces mécanismes parce qu'ils ont été mis en évidence *in vitro* (Grisebach, 1977). Par contre, on dispose de quelques données montrant l'existence d'un contrôle génétique et d'une régulation hormonale de la lignification *in situ.* Ces deux aspects seront donc seulement envisagés pour terminer.

L'existence de mutants pour la lignine semble avoir été rapportée pour la première fois vers 1930, chez le Maïs. Par la suite ces lignines ont été beaucoup étudiées. Elles diffèrent des lignines « normales » par leur composition en monomères et par leur extractibilité et donc vraisemblablement aussi par leur degré de condensation et de liaison avec les polyosides. Comme cependant, on a constaté parallèlement des différences entre les équipements polyphénoliques de ces

mutants et des Maïs normaux, en particulier au niveau des esters en C_9 liés à ces lignines, on ne peut parler au sens strict de « mutant lignine ». Quoi qu'il en soit, des mutants analogues ont été obtenus chez le Sorgho (Porter et al. 1978). L'existence de différences d'extractibilité de complexes lignine-polyosides observées chez différentes variétés de Ray-grass pourrait aussi dépendre de facteurs génétiques. La faible variabilité, en fonction des conditions de culture des teneurs en lignines et en esters des parois cellulaires des tiges de Blé et de Peuplier, est tout à fait compatible avec l'existence d'un contrôle génétique relativement rigoureux de la lignification (Monties, 1980). En conséquence, l'existence d'un contrôle génétique qualitatif et quantitatif de la lignification paraît vraisemblable. Bien que l'on ne dispose d'informations détaillées que dans le cas des monocotylédones, sources de fourrages dont la digestibilité dépend de l'état de lignification, on peut conclure qu'il existe de façon générale un contrôle génétique de la lignification.

L'existence d'un contrôle hormonal de la lignification a été observée soit lors de culture de tissus, soit lors de la mise en survie, soit lors d'implantations d'hormones *in vivo.* Dans presque tous les cas, les lignines n'ont pas été caractérisées de façon fine. Cependant, en plus de variations des modalités de différentiation, il est sûr, qu'au moins dans le cas du Peuplier, la présence d'AIA, de 2,4 D ou de NAA ([1]) dans le milieu de culture entraîne des différences de composition monomérique des lignines (Venverloo, 1969). Ces observations méritent d'être rapprochées de celles faites lors de l'induction et de l'inhibition de la formation des bois de réaction après contrainte mécanique ou après apport de facteurs de croissance (AIA, TIBA) ([1]). La plupart des auteurs s'accordent pour attribuer à des déséquilibres hormonaux les différences observées au niveau de la lignification (Wilson et Archer, 1977); dans ces cas encore l'étude détaillée des lignines n'a pas été faite. Ces derniers résultats méritent enfin d'être mis en relation avec les phénomènes de lignification pathologique et de biosynthèse de pseudo-lignines (lignin-like compounds).

On peut définir les pseudo-lignines comme étant des DHP dont la biosynthèse est provoquée *in vivo* par apport de composés directement polymérisables. En plus de l'eugénol, qui est partiellement converti après oxydation en alcool coniférylique, ce sont essentiellement les trois acides hydroxycinnamiques PC, FE et SI (tab. I) qui ont été utilisés pour ces incorporations. Il est très vraisemblable qu'une fraction de ces composés est incorporée dans les lignines après réduction « normale » en alcool en C_9 (tab. VII) et, qu'une autre partie est directement polymérisée. Les expériences réalisées par Stafford en ce domaine ont contribué à imposer la notion de « pseudo-lignine » et même de « lignine acide » résultant par exemple de la polymérisation d'acides aromatiques. Il est sûr que ces polymères ne sont pas des lignines mais on ne peut être certains que de telles substances ne puissent se former *in vivo,* par exemple, après qu'un stimulus ait profondément perturbé l'ensemble du métabolisme phénolique d'une plante. Cette situation est possible dans des cas pathologiques et donc, dans ces conditions, des variations de composition des lignines sont possibles aussi. C'est

([1]) AIA — 2,4 D — NAA et TIBA sont respectivement les acides indolylacétique — 2,4 dichlorophenoxyacétique — naphtalèneacétique et 2, 3, 5, tri-iodobenzoique.

ainsi que Asada a pu mettre en évidence l'accumulation de lignine G après infection de Radis par un champignon. Après avoir séparé une quinzaine de peroxydases dont il a étudié l'aptitude à former des DHP d'alcool hydroxycinnamiques, cet auteur a expliqué la synthèse de « lignine G pathologique » par la diminution de l'activité des « isoenzymes » catalysant la synthèse de DHP mixtes. Ce dernier exemple confirme donc, d'une part, la possibilité d'un contrôle enzymatique de la lignification au niveau des réactions de polymérisation, et d'autre part, la diversité des facteurs susceptibles de contrôler la lignification puisqu'il existerait, dans ce cas, une substance induisant cette lignification (Asada et al. 1975).

CONCLUSION

Une affirmation du Professeur Kratzl, datant de 1962, aurait pu servir d'introduction à cette revue : « *Lignin in plant as a certain biological mobility and is able to adapt itself to external conditions as can be shown by formation of reaction wood. Therefore we believe that lignin in plant has no uniform degree of polymerization or condensation* ». Il est certain que les résultats obtenus depuis 1962 ont confirmé la justesse de cette affirmation mais il est incontestable aussi qu'il reste beaucoup à faire en ce domaine de la chimie et de physiologie de la lignification.

Les observations des équipes de Goring, Higuchi et Miksche par exemple ont donc bien contribué à rendre vraisemblable l'existence d'une hétérogénéité des lignines.

En 1967, Pearl avait intitulé le premier chapitre de son livre « *the nebulous concept of lignin* ». La même année, Harkin développait une comparaison en huit points entre la lignine et un mélange de jeux de cartes rapprochant par exemple les différents lignols aux figures, les modes de substitution des noyaux aux couleurs; il concluait sa comparaison en affirmant qu'il est plus important de connaître les règles du jeu, c'est-à-dire les mécanismes de lignification, que l'ordonnancement fortuit des cartes. Compte tenu des données cytologiques, physiologiques et surtout chimiques, l'isolement de lignine S par exemple, il paraît actuellement possible d'entreprendre l'étude de l'ordonnancement des lignines; leur ordre est vraisemblablement en relation avec leurs fonctions : mise en tension des parois ou barrière contre les pathogènes par exemple. Il faut donc s'attendre à ce que le mot lignine soit de plus en plus fréquemment utilisé au pluriel lorsque structures et fonctions de cette macromolécule exceptionnellement complexe deviendront mieux connues.

BIBLIOGRAPHIE

ADLER E. (1977) — *Wood Sci. Technol.*, **11**, 169-218.

ALIBERT G. et BOUDET A. (1979) — *Physiol. vég.*, **17**, 75-82.

ARCHER B.F. et WILSON R.R (1977) — *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **28**, 23-43.

ASADA A.Y., OHGUCHI T. et MATSUMOTO I. (1975) — *Rev. Plant Prot. Res.*, **8**, 104-113.

CATESSON A.M., CZANINSKY Y. et MONTIES B. (1978) — *C.R. Acad. Sci. série D*, **286**, 1787-1790.

CZANINSKY Y., ODIER E. et MONTIES B. (1979) — *Communication*, Villeurbanne, Mai 1979, France.

ERICKSON M., LARSON S. et MIKSCHE G. (1973) — *Acta Chem. Scand.*, **27**, 903-914.

ERICKSON M. et MIKSCHE G. (1974) — *Holzforschung*, **28**, 135-138 avec dans la même revue, **27**, 189-193 et 147-150 et 113-117 en 1973.

FAIX O. (1976) — *Das Papier*, **30**, V1 à V9.

FLORY P.J. (1975) — *Principles of polymer chemistry*, 9ème édit, Cornell, Univ. Press, Ithaca, 672 p.

FORS K. et FREMER K.E. (1975) — *Symp. Enzymatic Hydrol. Cellulose*, 41-63, Mars 1975, Avlundo, Finlande.

FREMY M. (1883) — *Chimie biologique et chimie physiologique* in *Encyclopedie Chimique*, t. **X**, p. 21, Dunod éditeur, voir aussi 1859, *C.R. Acad. Sci.*, **48**, 862-868.

FREUDENBERG K. et NEISH A.C. (1968) — *Constitution and biosynthesis of lignin*, 129 p., Springer édit.

GRAND C. et RANJEVA R. (1979) — *Physiol. vég.* **17**, 433-444.

GRISEBACH H. (1977) — *Naturwiss*, **64**, 619-625.

GORING D.A.I. (1971) — *Polymer properties of lignin and derivatives*, Chap. 17 in Lignins, Sarkanen K. et Ludwig C. edit.

GROSS G.G. (1977) — *in Structure, biosynthesis and degradation of wood*, 141-184, Lœwus F.A. et Runeckless V.C. edit. Plenum press pub. 527 p.

HARKIN J.M. (1967) — *in Oxydative coupling of phenols*, 243-321, Taylor W.I. et Battersby A.R. edit., Dekker Inc. pub.

HIGUCHI T., SHIMADA M., NAKATSUBO F. et TANAHASHI M. (1977) — *Wood Science Technol.* **11**, 153-167 et références citées.

HIGUCHI T., ITO Y. et KAWAMURA I. (1967) — *Phytochem.*, **6**, 875-881.

KIRK T.K., HOV-MIN CHANG et LORENZ L.F. (1975) — *Wood Science Technol.*, **9**, 81-86, voir aussi MUSHA Y., GORING D.A.I. 1975 — *Wood Science Technol.*, **9**, 45-58.

KRATZL R., BUCHTELA K., GRATZL J., ZAUNER J. et ETTINGHAUSEN O. (1962) — *Tappi*, **45**, 113-119.

KUTZUKI H. et HIGUCHI T. (1978) — *Mokuzai Gakkaishi*, **24**, 625-631.

LUNDQUIST K., (1976) — *App. Polym. Symp.*, **28**, 1393-1407.

MARCINOWSKI S., FALK H., HAMMER D.K. et HOYER B. et GRISEBACH H. (1979) — *Planta*, **141**, 161-165.

MONTIES B. (1980) — Biosynthèse et biodégradation de la lignine chez le Blé et le Peuplier — *Rapport final de contrat MBO-DGRST* , 250 p., INRA éditeur.

NAKAMURA Y. et HIGUCHI T. (1978) – *Cell Chem. Technol.*, **12**, 209-212.

NIMZ H. (1874) – *Angew. Chem. Int. Ed.*, **13**, 313-321, voir aussi (1969), *Chem. Ber.*, **102**, 799-810.

PEARL I.A. (1967) – *The chemistry of lignin*, 339 p. M. Dekker édit.

PORTER K.S., AXTELL J.D., LECHTENBERG V.L., COLENBRANDER V.F. (1978) – *Crop. Science*, **18**, 205-208.

SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H. (1971) – *Lignins : occurence, formation structure and reactions*, 916 p., Wiley-Intersc. édit.

SHAKAKIBARA A. (1977) – *Rec. Adv. Phytochem.*, **11**, 117-139.

SCHWEERS W. et FAIX O. (1973) – *Holzforschung*, **27**, 208-213 et articles suivants dans la même revue.

VENVERLOO K. (1969) – *Acta Bot. Neerl.*, **18**, 241-314.

WARDROP A.B. (1977) – *App. Polym. Symp.*, **28**, 1041-1063.

YAMAZAKI T., HATA K., HIGUCHI T. (1978) – *Holzforschung*, **32**, 44-47.

M. Th. TOLLIER, A.M. RIQUET

Dosage des polyosides ...

et, de "La" Lignine..

Les parois végétales sont constituées principalement de polyosides et de quantités plus ou moins importantes de lignine et de protéines. Dans les fourrages, elles représentent une certaine importance comme source d'énergie, principalement pour les ruminants qui grâce à la microflore de leur rumen ou de leur caecum sont capables d'en digérer une partie. Il est à considérer, toutefois, que la lignine qui accompagne habituellement les polyosides de structure diminue de façon notable la digestibilité de ces composés. Les polysaccharides sont des polymères de monosaccharides reliés par des liaisons glycosidiques soit en chaînes linéraires, soit en chaînes « branchées » : deux propriétés importantes des polyosides qui sont à la base des principales méthodes d'isolement, d'analyses et de fractionnements sont l'hydrolyse par les acides et la solubilité différentielle.

La précipitation sélective par les alcools, l'hydroxyde de barym (Timell, 1965) ou les détergents (Gramera et Whistler, 1963) est souvent utilisée pour séparer un type de polymères de l'ensemble de la fraction polyosidique.

Les polyosides de structure des parois végétales peuvent être divisés en trois groupes : la cellulose, les polyosides non cellulosiques ou hémicelluloses et les substances pectiques. Le tableau I présente quelques propriétés générales de ces substances.

TABLEAU I

Propriétés des polyosides de structure des végétaux (Bailey, 1973)

Groupe	Nature physique	Fonction générale	Solubilité
Substances pectiques	Amorphe	Ciment intercellulaire	Eau chaude oxalate NH_4 chaud ou EDTA
Polyosides non cellulosiques (hémicelluloses)		Paroi cellulaire	Eau (1), alcali dilué ou alcali-borate
Cellulose	Cristalline	Fibre microfibrilles	Acide concentré

(1) Seulement après délignification.

Après un bref rappel de quelques propriétés de ces divers constituants, nous présenterons un certain nombre de méthodes de dosages de ces composés.

La cellulose est l'élément essentiel des parois cellulaires des végétaux supérieurs où elle joue le rôle de substance de soutien. Elle se rencontre rarement à l'état pur mais se trouve associée dans les tissus végétaux avec des substances très diverses, les unes à peu près constantes, bien qu'en quantités variables d'un végétal à un autre (lignine, hémicelluloses, glucosanes, pentosanes, matières pectiques, matières minérales) les autres occasionnelles (tanins, matières colorantes, matières grasses, matières azotées diverses). Certains de ces composés tels les tanins, les matières grasses et les colorants peuvent être facilement éliminés par des solvants appropriés alors que la lignine et les pentosanes nécessitent l'emploi de réactifs plus énergiques. Ceci incline à croire que ces derniers composés sont chimiquement liés à la cellulose. Les celluloses que l'on extrait des végétaux ne sont pas toutes chimiquement identiques. En se basant sur la solubilité dans la soude on distingue les α, les β et les γ celluloses. Ces distinctions sont d'ailleurs conventionnelles, et ne correspondent pas à des entités chimiques; seule l'α cellulose doit être considérée comme de la cellulose pure (cellulose de coton, de ramie).

On réunit sous le terme « hémicelluloses » les composés glucidiques que l'on rencontre associés à la cellulose dans la membrane végétale. Ces substances ont été longtemps considérées comme les précurseurs de la cellulose. Les hémicelluloses peuvent être divisées en deux classes principales : les pentosanes, constitués de pentoses et les hexosanes non cellulosiques. La plupart des pentosanes sont solubilisés dans les alcalis dilués (5 — 10 %) et les hexosanes à l'aide d'alcalis plus concentrés (17 — 24 %) ou d'alcali-borate (24 % — 4 %). Le groupe des hémicelluloses n'est pas homogène; on distingue une « hémicellulose A » qui précipite par acidification de l'extrait alcalin du matériel végétal et une « hémicellulose B » qui précipite par addition d'alcool au filtrat provenant de la fraction « d'hémicellulose A ». A côté des pentosanes (xylanes — arabanes) et des hexosanes (mannanes, galactanes) on rencontre des β-glucanes constitués d'unités β D-glucose liées en β 1-3 et β 1-4. Certains composés végétaux renferment également des méthylpentoses comme le rhamnose (feuilles) et le fucose (algues).

Les substances pectiques, qui sont un groupe de polyosides amorphes, font fonction de ciment-intracellulaire. Ces polymères mixtes d'oses et d'acides uroniques sont plus ou moins facilement extraits du tissu végétal, en utilisant l'eau chaude, les acides dilués ou des solutions chaudes d'oxalate d'ammonium ou de EDTA (Bailey, 1973).

La lignine correspond à un groupe de substances de haut poids moléculaire de nature aromatique et qui reste mal connu. Elle incruste la cellulose et les hémicelluloses de la paroi des cellules végétales, elle est alors insoluble. Après dégradation ménagée, elle peut être dissoute dans de nombreux solvants organiques; de même, elle peut être solubilisée dans l'eau mais seulement en milieu alcalin.

I. METHODES DE DOSAGE DES CONSTITUANTS DES PAROIS

METHODES DE DOSAGE DE « L'INSOLUBLE CELLULOSIQUE »

La détermination quantitative de la cellulose dans un matériel végétal est toujours délicate. Elle consiste à éliminer par un procédé chimique approprié les substances qui accompagnent ou incrustent la cellulose. Les méthodes proposées tiennent compte de la résistance de la cellulose à l'action des agents oxydants modérés, des acides ou des bases dilués qui détruisent par contre plus ou moins complètement les autres constituants de la membrane. Parmi ceux-ci retenons les hémicelluloses, la lignine, les tanins, les matières pectiques, les gommes et mucilages. Selon le comité d'étude « Cellulose » de la Commission française de normalisation internationale on entend conventionnellement par « indice d'insoluble dit cellulosique » (cellulose brute) la totalité des substances perdues lors de l'incinération du résidu séché restant après traitement acide et alcalin du produit. Il existe de nombreuses méthodes de détermination de la cellulose; toutefois le choix du procédé à appliquer est conditionné par la nature du matériel étudié et par le but poursuivi. Nous distinguerons les méthodes gravimétriques et volumétriques.

a) Méthodes gravimétriques

1) Méthode Weende (1809)

Une des plus anciennes méthodes de dosage de « l'insoluble cellulosique » est sans conteste celle mise au point par l'Institut Agronomique de Weende. Par définition et selon la norme ISO-AFNOR (NF V 03 040, 1977) l'insoluble dit « cellulosique » correspond aux substances perdues lors de l'incinération du produit résistant aux attaques successives acide et alcaline.

Le schéma 1 résume le processus opératoire utilisé. Le produit broyé est soumis à une attaque par l'acide sulfurique 0,255 N à ébullition pendant 30 minutes. La séparation du résidu peut s'effectuer par filtration sur toile de nylon, sable de mer ou amiante du type dit pour creuset de Gooch. Le résidu est ensuite soumis à une attaque par la soude 0,313 N à ébullition pendant également 30 minutes. Après filtration, effectuée comme précédemment, le résidu est lavé à l'eau permutée chaude. L'insoluble obtenu est séché à 130 °C, pesé, puis incinéré à 550 °C.

Cette méthode est applicable aux produits agricoles et alimentaires, mais pas au matériel dont la teneur en cellulose est inférieure à 1 %. Le résidu obtenu dans ces conditions précises ne correspond pas à une cellulose pure. Selon Jongt, 1967, il peut contenir, associées à la cellulose, des quantités variables de pentosanes et de lignine.

Schéma 1

Dosage de la cellulose
Détermination de l' « indice d'insoluble cellulosique »

Méthode de l' « insoluble » dit cellulosique
Weende (1809)

Produit Broyé (3 g)
↓
(Délipidation)
↓
Traitement par : – 200 ml H_2SO_4 0,25 N ébullition, 30 mn
– 200 ml NaOH 0,313 N ébullition, 30 mn
↓
Filtration
↓
Lavage (eau chaude)
↓
Séchage 100 °C 1 h
↓
Incinération 600 °C 1 h

Utilisations : produits agricoles et alimentaires, correspond à la cellulose brute. Méthode normalisée AFNOR NFV 03-040.

2) Méthode Scharrer modifiée (1931)

Cette méthode, qui fait l'objet de la norme AFNOR V 03-041 de février 1977, a été mise au point pour doser la cellulose dans les céréales et produits céréaliers, ainsi que dans certains produits renfermant moins de 1 % d'insoluble « cellulosique », tels que les levures, qui sont exclus du domaine d'application de la norme NF V 03-040.

La prise d'essai, 1 à 3 g, (schéma 2) est soumise à un traitement par un mélange d'acide acétique, nitrique et trichloracétique à ébullition pendant 30 minutes. Le résidu est séparé par filtration sous pression réduite sur un creuset filtrant et lavé successivement par de l'eau bouillante et de l'acétone. Après séchage à 130 °C, il est pesé avant d'être incinéré à 550 °C pendant 30 minutes.

Schéma 2

Dosage de la cellulose
Détermination de l' « indice d'insoluble cellulosique »

Méthode de l' « insoluble » dit cellulosique
Sharrer (1931)

Produit Broyé (1 – 3 g)

↓

Traitement Par : – acide acétique (1,07 g/ml, 900 ml),
– acide nitrique (1,4 g/ml, 60 ml),
– acide trichloracétique
Ebullition 30 mn

↓

Filtration

↓

Lavage résidu (eau bouillante + acétone)

↓

Séchage 130 °C 1 h

↓

Incinération 550 °C 30 mn

Utilisations : céréales et produits céréaliers à faible teneur en cellulose.

Répétabilité 5 %. Méthode normalisée AFNOR NFV 03-041.

3) Méthode aux détergents, Van Soest (1963 a, b)

De nombreux travaux ont été entrepris par Van Soest et ses collaborateurs dans le but de mettre au point des méthodes de dosage des composés hémicelluloses, cellulose, lignine qui donneraient des teneurs en « fibre » contenant le moins d'azote possible. C'est ainsi que les détergents anionique et cationique en milieu tamponné ont été étudiés afin de trouver une combinaison qui permettrait l'obtention de résidus cellulosiques pauvres en azote. Dans cet optique, deux détergents ont été retenus : le lauryl sulfate de sodium en solution neutre ou légèrement alcaline et un composé ammonium quaternaire, le bromure de cétyltriméthyl-ammonium en milieu sulfurique. Ces détergents entraînent la solubilisation des polyosides non cellulosiques, des protéines et des acides nucléiques, soit au total environ 90 % de l'azote.

Le procédé au détergent acide (Acid Detergent Fiber) permet l'obtention de la fraction la plus indigestible, cellulose + lignine. Le schéma 3 rend compte du protocole opératoire utilisé. Si les conditions de préparation de cet ADF restent encore assez arbitraires, les résultats obtenus sont reproductibles. L'étude des résidus « lignocelluloses » ainsi préparés ont montré que ces fractions étaient relativement pures et leur composition était en bonne relation avec la digestibilité des fourrages.

4) Méthode à l'acide formique (Guillemet et Preceptis, 1942; Guillemet et Jacquot, 1943; Tollier, 1974-1975)

L'acide formique concentré et chaud est un très bon solvant des protéines. La fraction « cellulose et lignine » reste pratiquement inattaquée. Dans ce cas

Schéma 3

Dosage de la cellulose + lignine

Méthode au détergent acide
Van Soest (1963)

Produit broyé (1 g)

↓

Traitement par solution de bromure de cétyltriméthylammonium
Ebullition 1 h

↓

Filtration

↓

Lavage (eau bouillante, acétone)

↓

Séchage 100 °C, 8 h → Cellulose + lignine

↓

Traitement par H_2SO_4 72 % 3 h, 20-23 °C

↓

Filtration

↓

Lavage (eau chaude, acétone)

↓

Séchage 100 °C

↓

Incinération 500 °C 2 h → Lignine

là, également, les matières minérales sont déterminées par calcination (schéma 4). C'est une méthode rapide, simple à mettre en œuvre et qui permet d'obtenir des résultats très reproductibles. Le seul point délicat, est sans nul doute le choix du procédé de filtration qui dépend de la quantité d'amidon du matériel dosé. Les verres frittés qui conviennent dans le cas de substrats pauvres en glucides de réserve, peuvent être remplacés par un filtre en feutre de Carbone RVC 2 000 ([1]), qui a l'avantage de ne pas se colmater en présence de quantités importantes d'amidon.

Dans le tableau II nous avons rassemblé des valeurs de lignocellulose obtenues avec la méthode Van Soest au détergent acide (ADF) et avec l'acide formique, comparées aux taux de cellulose Weende, ceci pour des tourteaux de colza et de tournesol.

b) Méthode volumétrique (Van de Kamer et Van Ginkel, 1952)

Ce procédé permet de doser la cellulose dans les céréales et produits céréaliers; elle est particulièrement bien adaptée pour les produits peu riches en cellulose, comme la mie de pain par exemple. Le principe en est le suivant : le produit

Schéma 4

Dosage de la cellulose
Détermination de l' « indice d'insoluble cellulosique »

Méthode de l' « insoluble » dit formique
Guillemet et Préceptis (1942), Tollier (1974)

Produit broyé (5 g)
↓
Traitement par l'acide formique 80 %, ébullition, 75 mn
↓
Filtration
↓
Lavage du résidu (eau bouillante + éthanol 95 % + éther)
↓
Séchage 100 – 105 °C
↓
Incinération 550 °C, 4 h (→ cendres)

Utilisations : produits céréaliers, correspond à la Cellulose + la lignine. Méthode rapide. Répétabilité 4 %.

([1]) RVC 2 000 de Carbone Lorraine, 41, rue Jean Jaurès, Gennevilliers.

TABLEAU II

Comparaison des valeurs de lignocellulose obtenues par différentes méthodes (Tollier, 1976)

	Tournesols			Colzas primor			Colzas industriels		
Détergents acides Van Soest C+L	26,4	28,3	38,8	18,8	18,8	19,5	21,8	22,0	21,9
Insoluble formique C + L	20,8	22,5	31,2	17,2	19,4	19,1	20,8	20,2	20,1
« Cellulose » Weende				11,4	11,7	12,3	13,8	13,8	13,1
« Lignine » Van Soest	7,6	8,7	12,0	7,2	7,2	7,4	8,5	9,0	8,7

finement broyé est traité par un mélange d'acide acétique, nitrique et trichloracétique, dont les proportions sont voisines du réactif de Scharrer, pendant 30 minutes à ébullition dans un flacon à acétylation (fig. 1).

Après refroidissement la cellulose restée insoluble est séparée par filtration sur verre fritté et lavée à l'eau chaude (schéma 5). La deuxième étape du dosage peut s'effectuer :

— soit par gravimétrie, en pesant simplement le résidu sec;
— soit par titrimétrie. Pour ce faire la cellulose filtrée et lavée est solubilisée sur le verre fritté par de l'acide sulfurique concentré, et la solution obtenue est recueillie dans un volume connu de bichromate de potassium. Après oxydation complète la quantité de bichromate utilisé est déterminée par un dosage en retour à l'aide du thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon. Selon la quantité de cellulose présente dans le produit à doser, la solution de bichromate utilisée est 0,2 ou 1,2 N.

Le tableau III est relatif à la comparaison entre les valeurs de cellulose obtenues par la méthode Van de Kamer, le dosage final se faisant par gravimétrie ou par titrimétrie. La méthode titrimétrique présente l'avantage d'être plus sensible puisque l'on peut doser jusqu'à 0,3 % de cellulose. De plus, la reproductibilité est bonne et la rapidité satisfaisante; selon les auteurs 16 à 20 déterminations peuvent être effectuées par jour.

METHODES DE DOSAGES DES POLYOSIDES NON CELLULOSIQUES

Il n'existe pas de méthode spécifique permettant de doser l'ensemble des hémicelluloses. Van Soest et Wine, 1967 ont mis au point un procédé rapide de détermination de l'ensemble des constituants membranaires hémicelluloses,

TABLEAU III

Comparaison entre méthodes gravimétrique et titrimétrique
(J.H. Van De Kamer and L. Van Ginkel, 1952)

	Gravimétrie		Titrimétrie	
	Poids échantillon (en g.)	% Fibre brute	Poids échantillon (en g.)	% Fibre brute
Farine de blé I	30	0,20	5	0,20
II	30	0,27	5	0,27
III	10	0,56	2	0,56
IV	15	0,58	2	0,60
V	10	0,78	1,5	0,76
Blé entier	10	2,02	0,5	1,93
Son de blé	3	9,40	1	9,50
Remoulages	5	7,90	1	7,80

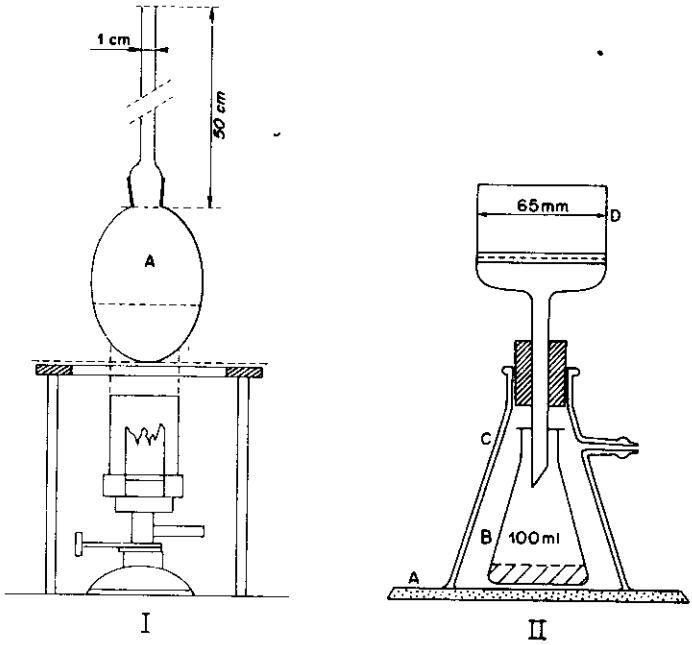


Fig. 1 — Appareillage de digestion (I) et de filtration (II) utilisé dans le dosage de la cellulose selon Van De Kamer, 1952.
I : A — Fiole à acétylation surmontée d'un condenseur à air.
II : A — Plaque de verre.
B — Fiole d'erlenmeyer de 100 ml.
C — Fiole à vide de 500 ml, sans fond.
D — Entonnoir à plaque filtrante de porosité n° 3 et de diamètre 65 mm.

Schéma 5

Dosage de la cellulose

Méthode volumétrique
Van de Kamer et Van Ginkel (1952)

Produit broyé

↓

Traitement par : – acide acétique (70 %, 1 750 cm^3)
– acide nitrique (65 %, d. 1,4, 124 cm^3)
– acide trichloracétique 50 g

↓

Ebullition 30 mn

↓

Filtration – Lavage

↓

Solubilisation dans H_2SO_4 + Bichromate de K 0,2 N

↓

Titration par thiosulfate 0,1 N

Utilisations : produits céréaliers.

cellulose, lignine, par l'utilisation d'un détergent, le lauryl sulfate de sodium en milieu neutre. En défalquant les valeurs de lignocellulose obtenues avec le détergent acide (ADF), il est ainsi possible de calculer les quantités d'hémicelluloses présentes dans le matériel végétal étudié. Dans le cas des aliments pour animaux les résultats obtenus par ces méthodes sont en bon accord avec ceux résultant d'un traitement enzymatique par un mélange d'α-amylase et de pepsine. Les pentosanes, représentent la fraction « d'hémicelluloses » qui conduit, par hydrolyse totale, au xylose et arabinose. Les méthodes de dosage proposées pour ces substances reposent sur le principe suivant : hydrolyse préalable en pentoses suivie de leur transformation en furfural sous l'influence de l'acide chlorhydrique à chaud. Le furfural libéré peut être dosé par différentes techniques (schéma 6) :

– distillation du furfural et colorimétrie à l'acétate d'aniline (Duffau, 1946; Cerning, 1973);
– gravimétrie après formation d'un complexe insoluble, soit avec l'acide thiobarbiturique soit avec le phloroglucinol (AACC, 1945; Brunel, 1950);
– titrimétrie après oxydation en acide pyromucique (Brunel, 1950;AOAC,1962).

La plupart de ces méthodes sont applicables aux céréales et graines, mais de nombreuses substances interférent; seule la méthode colorimétrique à l'acétate d'aniline peut être considérée comme spécifique.

Schéma 6

Dosage des pentosanes

Matériel végétal

↓

Broyage

↓

Hydrolyse (HCl 4,25 N à chaud)

↓

Furfural

Entraînement à la vapeur	Complexe insoluble	Oxydation (BrO_3K)
(Duffau, 1946; Cerning, 1973) Complexe furfural-acétate d'aniline Colorimétrie, 530 nm	– Acide thiobarbiturique – Phloroglucinol (Brunel, 1950) Dosage gravimétrique	acide pyromucique Dosage iodométrique
– Spécifique (concentration en hexoses < 400 x concentration en pentoses; concentration en acides uroniques < 10 %) – Reproductibilité 2 % – Applications : céréales et produits céréaliers	– Non spécifique (interférences entre HMF, méthyl-pentosanes et tanins dans le cas de la méthode au phloroglucinol) – Applications : céréales et graines, méthode officielle AOAC, 1945 (phloroglucinol)	– Non spécifique (interférences entre HMF et méthyl-pentosanes) – Applications : analyses de série méthode officielle AACC, 1962

METHODES DE DOSAGE DES SUBSTANCES PECTIQUES

L'extraction des pectines s'effectue à partir d'un matériel finement broyé en milieu aqueux ou faiblement acide ou encore en utilisant des agents complexants, tels l'EDTA ou l'oxalate de sodium. Après une purification par précipitation alcoolique ou passage sur résine anionique, elles sont dosées par différentes techniques qui peuvent être divisées en 3 groupes principaux :

TABLEAU IV

Détermination de la teneur en acide polygalacturonique par des méthodes gravimétriques

Méthodes	Principe Mode opératoire	Domaine d'application	Références
Teneur en acide pectique	Saponification par NaOH 10 % et précipitation par HC1 ≃ 5N à l'ébullition pendant 5 minutes de l'acide pectique. Filtrer. Sécher. Peser, calciner. Repeser.	Interférences des matériaux solubilisés non spécifiques.	Wichmann, 1922 Denel, 1950
Teneur en pectate de Ca	Saponification par NaOH. Précipitation du pectate de Na soluble en pectate de Ca par Cl_2Ca en milieu acétique. Résultat exprimé en p. 100 pectate de la prise d'essai ou en acide polygalacturonique (Ac. Pgal.).	Nécessité d'une purification préalable car interférence des oxalates er polyuronides. Méthode courante.	Deuel, 1950 Doesburg, 1965
Décarboxylation	Décarboxylation des acides uroniques sous l'action d'HCl à 12 % à l'ébullition. Absorption quantitative du CO_2 libéré sur KOH à 50 % ou amiante sodée dans tube taré.	Non spécifique de l'acide galacturonique.	Lefèvre et Tollens, 1907 Deuel, 1950

— détermination de la teneur en acide polygalacturonique; ce sont généralement des méthodes gravimétriques qui sont basées, soit sur des réactions de saponification suivies de précipitation, soit sur des réactions de décarboxylation (tableau IV);

— détermination des uronides par des méthodes colorimétriques dont le principe repose sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par l'action, à chaud, d'un acide concentré avec divers composés aromatiques. Parmi les réactifs utilisés : anthrone (Helbert et Brown, 1959), orcinol (Khym et Doherty, 1952) naphtorésorcinol (Rahman et Joslyn, 1953) c'est le carbazol en milieu sulfurique (Disch, 1947; McComb, McCready, 1952; Thibault, Robin, 1975) qui reste le plus usité. Il est à préciser que les oses neutres interfèrent lorsqu'ils sont présents en quantité importante. Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) utilisent le métahydroxydiphényl ou métaphenylphenol qui présente l'avantage de ne pas réagir avec les hexoses;

— détermination de la teneur en groupements méthoxyles ($-OCH_3$) ou carboxyles libres (COOH) par colorimétrie ou complexation ou tout simplement par titrimétrie.

TABLEAU V
Détermination des pectines de divers produits par 3 méthodes
(Ahmed E. et Scott L.E., 1958)
Résultats exprimés en %

Produits analysés	Méthode au pectate de calcium	Méthode de décarboxylation	Méthode au carbazole
Pectines citron I	76,8	73,4	81,2
Pectines citron II	75,4	75,6	83,8
Cassis	4,2	3,6	3,8
Groseille	5,8	3,8	3,1
Patate douce	2,4	11,0	10,1
Tomate	4,0	2,7	2,9

Dans le tableau V nous avons rassemblé les valeurs de détermination des pectines selon différents procédés (Ahmed et Scott, 1958).

METHODES DE DOSAGES DE LA LIGNINE

La détermination de la lignine reste très arbitraire. La plupart des méthodes couramment employées sont entachées d'erreurs; les valeurs obtenues correspondent soit à une partie de la lignine totale, soit à un ensemble composé de lignine et de substances glucidiques ou protéiques fortement liées à la fibre.

Le principe de dosage de ce constituant repose sur deux de ses caractéristiques : son insolubilité en milieu sulfurique concentré qui est la base des méthodes gravimétriques et sa solubilité dans le bromure d'acétyle en milieu acétique, qui a permis de mettre au point des méthodes spectrophotométriques.

a) Dosage de la lignine insoluble « selon Klason »

La technique de Klason, 1908, qui représente quelque peu la méthode de référence, préconise l'utilisation de l'acide sulfurique à 72 %; cette solution dissout toutes les substances glucidiques et protéiques laissant un résidu correspondant à la lignine brute.

D'autres procédés reposant sur le même principe ont été depuis utilisés assez largement dans l'étude des fourrages. Il s'agit dans un premier temps de préparer la lignocellulose selon la méthode de Van Soest, 1963, au détergent acide. A partir du résidu ADF plusieurs possibilités d'estimation de la lignine peuvent être retenues :

— solubilisation de la cellulose par H_2SO_4 72 %, laissant la lignine insoluble (Van Soest, 1963);

– oxydation et solubilisation de la lignine par le permanganate de potassium (Van Soest, 1968);
– solubilisation de la lignine par du triéthylène glycol-HCl (Edwards, 1973).

Un autre moyen de doser la lignine par spectrophotométrie a été mis au point par Johnson et coll., 1961. Le principe réside sur la solubilisation de la lignine dans un mélange de bromure d'acétyle et d'acide acétique, l'absorption de la solution obtenue est mesurée à 280 nm. Cette méthode a été modifiée par d'autres auteurs en fonction du matériel à étudier (Marton, 1967; Morrisson, 1972).

b) Dosage de la lignine solubilisée « au bromure d'acétyle » (1)

Cette méthode est applicable à des prises d'essai d'une dizaine de milligrammes soit des quantités de lignine de quelques milligrammes. Elle présente, par rapport à la méthode selon Klason, le double avantage d'être une micro-méthode et de permettre le dosage de la « lignine soluble dans les acides ». Cette fraction de la lignine totale, n'est pas précipitée en milieu sulfurique vraisemblablement à cause de sa composition chimique, de son faible degré de polymérisation, de ses liaisons avec les polyosides.

L'élimination complète des polyphénols autres que les lignines, la solubilisation totale de l'échantillon et le choix d'une lignine de référence constituent les trois points délicats du dosage.

L'élimination des polyphénols est parfois difficile, par exemple dans le cas des tanins souvent fortement « liés » aux parois cellulaires. L'extraction peut être améliorée d'une part, en diminuant la granulométrie de l'échantillon, par broyage dans l'azote liquide par exemple, et d'autre part, grâce à une pré-extraction à température ambiante par de la soude normale sous azote pendant une heure. Ce traitement qui ne réduit pas de façon significative la teneur en lignine permet à la fois l'extraction des polyphénols et améliore la reproductibilité des dosages.

La solubilité des échantillons dans le réactif, bromure d'acétyle à 25 % en volume dans l'acide acétique, est un facteur important de la reproductibilité. Solubilité, et donc reproductibilité, dépendent beaucoup de la granulométrie des micro-échantillons et de la qualité du réactif : « fraîcheur » liée très vraisemblablement à la teneur en eau. L'amélioration de la reproductibilité, après traitement alcalin des échantillons, est certainement due au gonflement des parois qui entraîne une meilleure solubilisation.

L'étalonnage du dosage, enfin, peut être fait soit par référence à la teneur en lignine selon Klason soit par rapport à une lignine étalon. Dans ce dernier cas, il est commode d'utiliser des « lignines au dioxane » (voir Monties, cet ouvrage) qui sont faciles à préparer et contiennent des quantités négligeables d'oses hydrolysables. Dans ces conditions les gammes étalon sont linéraires, au moins entre 1 et 25 mg de lignine, et sont très reproductibles. Les quantités de lignine estimées selon ce protocole sont parfois très significativement supérieures à celles trouvées par le dosage selon Klason. L'origine de ces différences est inexpliquée pour le moment.

(1) D'après Monties 1979, résultats non publiés (communication personnelle).

II. FRACTIONNEMENT DES POLYOSIDES DE LA PAROI VEGETALE

Après avoir présenté un certain nombre de méthodes permettant le dosage des fractions hémicelluloses, cellulose, lignine, nous allons maintenant examiner quelques possibilités de fractionnement des polyosides de structure. Ce procédé d'étude apporte des renseignements tant sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif. En précisant la nature et l'importance des unités constitutives de ces fractions, ces méthodes peuvent aboutir à une meilleure connaissance de la composition de ces substances.

METHODE DE FRACTIONNEMENT SELON JARRIGE, 1961

Cette méthode permet de déterminer successivement, sur un même échantillon, les quatre principaux groupes de constituants glucidiques (schéma 7). Celui-ci est tout d'abord traité à l'eau tiède puis par un mélange alcool-benzène de façon à extraire la totalité des glucides cytoplasmiques, les lipides et une fraction importante de matières azotées. Le résidu membranaire ainsi obtenu renferme l'ensemble des polyosides de structure et la lignine. Il est alors soumis à l'action de l'acide sulfurique environ 1,8 N pendant 3 heures sous reflux, de façon à hydrolyser la plupart des hémicelluloses sans toutefois attaquer la fraction lignocellulose. Cette dernière est traitée par de l'acide sulfurique environ 27 N à température ambiante pendant 4 heures, puis après dilution de l'acide elle est maintenue à ébullition pendant 3 heures. La fraction restante correspond à la lignine brute. Une détermination du pouvoir réducteur (Nelson et Somoggi, 1952) permet dans un premier temps d'avoir une idée de la quantité globale des substances libérées dans les deux hydrolysats. Les oses constitutifs sont ensuite dosés après séparation par chromatographie sur papier (Jermyn et Isherwood, 1949).

METHODE DE FRACTIONNEMENT SELON SALO, 1965

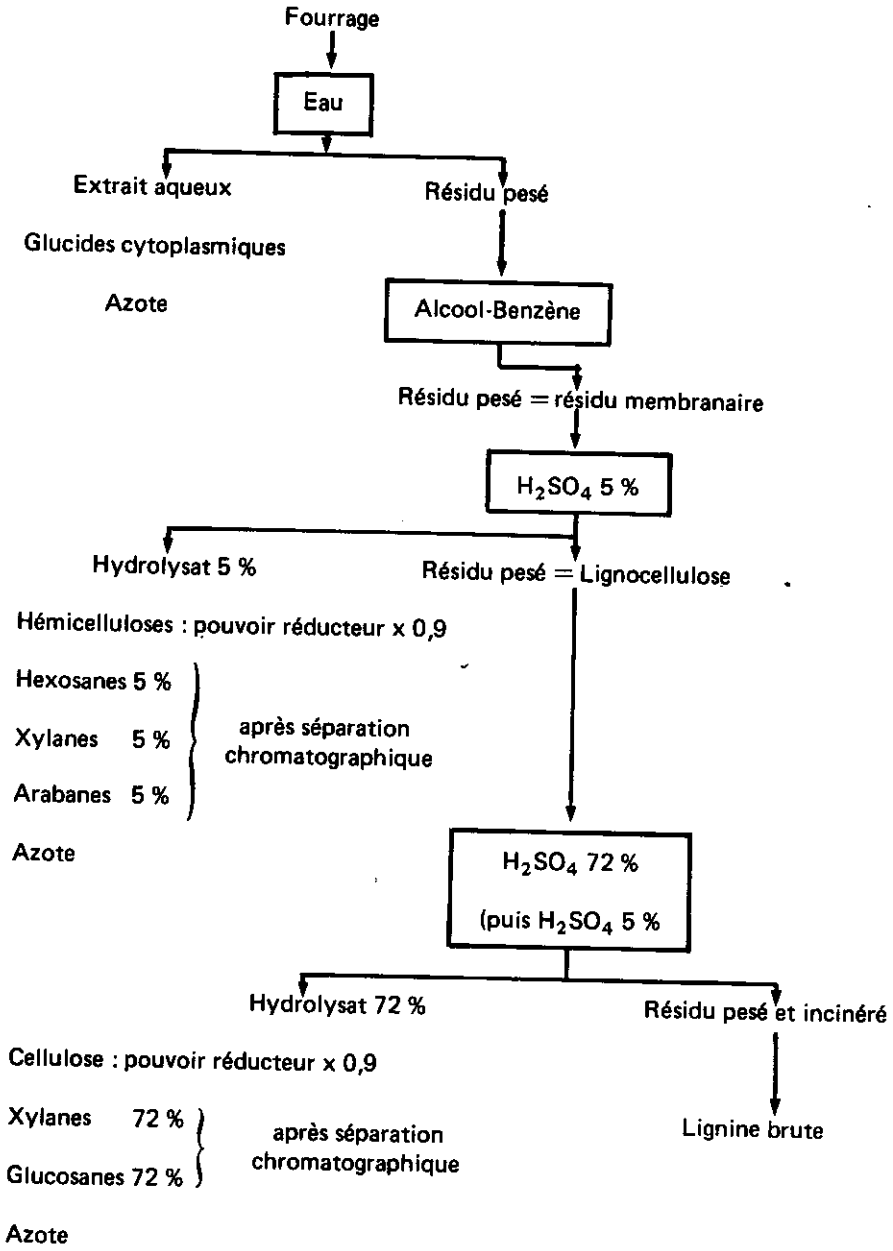
Le principe de ce fractionnement, très voisin de celui de Jarrige, est basé sur les hydrolyses acides progressives. A noter une légère différence entre ces 2 méthodes; celle-ci réside dans le choix de l'acide destiné à hydrolyser la fraction hémicelluloses. Lors du fractionnement selon Salo, le résidu membranaire, obtenu après extraction à chaud des oses et oligosides de faibles poids moléculaire par l'éthanol 80 °, est soumis à l'action de l'acide chlorhydrique 0,7 N pendant 5 heures à 96 °C (schéma 8).

La méthodologie d'isolement des fractions cellulose et lignine reste identique à celle préconisée par Jarrige.

A partir des extraits chlorhydriques et sulfuriques neutralisés sont réalisées les déterminations des substances réductrices (Nelson, 1944) des générateurs de

Schéma 7

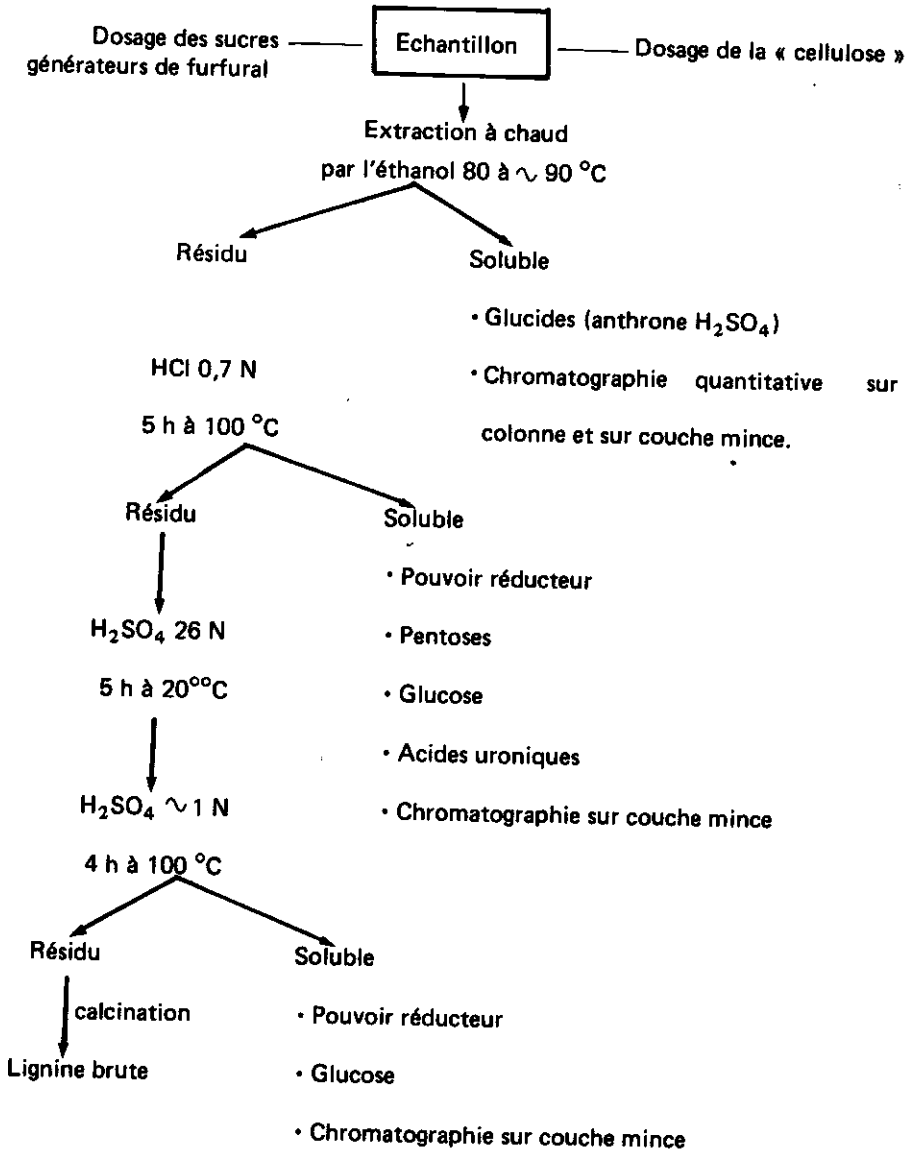
Schéma de fractionnement selon Jarrige (1961)



furfural (Duffau, 1946; Cerning et Guilbot, 1973), du glucose (Lloyd et Whelan, 1969) et des acides uroniques (Dische, 1947; McComb et McCready, 1952).

Schéma 8

Schéma de fractionnement (Salo, 1965)

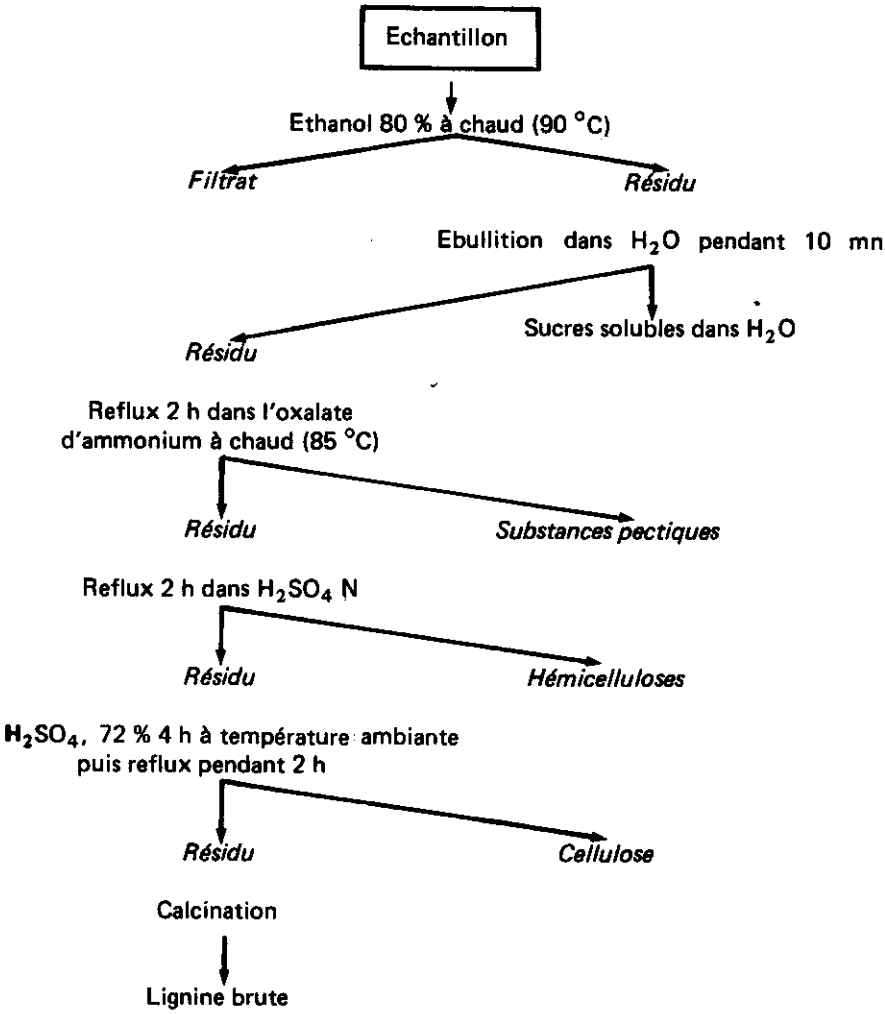


METHODE DE FRACTIONNEMENT SELON BAILEY, 1966

La caractéristique essentielle de ce fractionnement est l'isolement des substances pectiques par l'oxalate d'ammonium à chaud avant l'hydrolyse des hémicelluloses par l'acide sulfurique N (schéma 9). Le protocole opératoire est ensuite sensiblement équivalent à celui de Jarrige et de Salo. Il faut toutefois noter que les temps d'hydrolyse sont plus courts.

Schéma 9

Fractionnement des glucides dans les fourrages, Bailey (1966)



Il existe encore d'autres processus de fractionnement des polyosides de structure. Ils diffèrent surtout les uns des autres par le choix du réactif utilisé pour l'extraction de l'hydrolyse des hémicelluloses et matières pectiques.

CONCLUSION

Les polyosides de structure représentent une fraction très importante des végétaux. Une meilleure connaissance de leur évaluation quantitative et de leur constitution en monomères ne peut avoir que des répercussions très intéressantes au niveau de la nutrition animale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHMED E. and SCOTT L.E. (1958) — *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **71**, 376.

BAILEY R.W. (1966) — N.Z, *J. Agric. Res.*, **10**, 15-32.

BAILEY R.W. (1973) — *Structural Carbohydrates in Chemistry and Biochemistry of Herbage*, Acad. Press London and New-York.

BRUNEL A. (1950) — *Traité pratique de chimie végétale*, tome III.

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. (1973) — *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.

CERNING J., GUILBOT A. (1973) — *Cereal Chem.*, **50**, 176-184.

DISCHE Z. (1947) — *J. Biol. Chem.*, **167**, 189-198.

DEUEL M.H. (1950)— *Traité de chimie végétale*, tome III. A. Brunel, 181-189.

DUFFAU F. (1946) — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 10-12, 873-877.

EDWARDS C.S. (1973) — *J. Sci. Fd. Agric.*, **24**, 381-389.

GRAMERA R.E., WHISTLER R.L. (1963) — *Archs Biochem. Biophys.*, **101**, 75-80.

GUILLEMET R., PRECEPTIS P. (1942) — *Académie d'Agriculture de France*, tome 28, 383-386.

GUILLEMET R., JACQUOT R. (1943) — *C.R. Acad. Sciences* (Paris), **216**, 508-510.

HELBERT J.R., BROWN K.D. (1959) — *Anal. Chem.*, **31**, 1 700-1 702.

JARRIGE R. (1961) — *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 163-204.

JERMYN M.A., ISHERWOOD F.A. (1949) — *Biochem. J.*, **44**, 402-407.

JOHNSON D.B., MOORE W.E., ZANK L.C. (1961) — *Tappi*, **44**, 11, 793-798.

JONGT K., GILLINGHAM J.F., LOADHOLT C.B. (1967) — *J. of Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**, 2, 340-343.

KHYM J.X., DOHERTY D.G. (1952) — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3199-3200.

LLOYD J.B., WHELAN W.J. (1969) — *Anal. Biochem.*, **30**, 467-470.

McCOMB E.A., McCREADY R.M. (1952) — *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

MARTON J. (1967) — *Tappi*, **50**, 335-337.

MORRISON I.M. (1972) — *J. Sci. Fd. Agric.*, **23**, 455-463.

NELSON N. (1944) — *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.

RAHMAN M.B., JOSLYN M.A. (1953) — *Food Res.*, **18**, 308-318.

SALO Maya Liisa (1965) — *Suomen Maataloustieteellisen Seuran Julka*, **105**, Acta Agralia Fennica.

SCHARRER K. and KÜRSCHNER K. (1932) — *Biedermamas Z.*, **3**, 302-310.

THIBAULT J.F., ROBIN J.P. (1975) — *Ann. Technol. Agric.*, **24**, 99-110.

TIMELL T.E. (1965) — In « *Methods in carbohydrate Chemistry* » (R.L. Whistler, ed), **5**, 134-137, Academic Press, New-York.

TOLLIER M. Th. (1974-1975) — Résultats non publiés.

VAN de KAMER J.H., VAN GINKEL L. (1952) — *Cereal. Chem.* XXIX, **24**, 239-250.

VAN SOEST P.J. (1963) — *J. of Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **46**, 829-835.

VAN SOEST P.J., WINE R.H. (1967) — *J. of Assoc. Off. Agric. Chem.*, **50**, 50-55.

VAN SOEST P.J. and WINE R.S. (1968) — *J. of Assoc. Off. Agric. Chem.*, **51**, 780-785.

M. METCHE et M. GIRARDIN

Les tanins des végétaux

Les tanins naturels sont par définition des substances polyphénoliques végétales qui présentent la propriété de s'associer et de se combiner avec les protéines ainsi qu'avec certains polyols. Ce comportement est à la base des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau des animaux, au cours de sa transformation en cuir. De même la précipitation des protéines salivaires et des glycoprotéines buccales permet d'expliquer la physiologie de l'action astringente des tissus végétaux avant maturité. C'est pourquoi, le test le plus courant pour la recherche des tanins est basé sur la précipitation d'une solution aqueuse de gélatine à 0,5 %. Ces propriétés tannantes sont directement responsables de l'inhibition des enzymes et de l'influence néfaste qu'exercent les tanins sur les processus digestifs des animaux.

Les solutions de tanins sont connues aussi pour précipiter les alcaloïdes (sulfate de cinchonine) pour complexer les ions de métaux lourds et pour réduire le $KMnO_4$. Ajoutons que, comme beaucoup de composés phénoliques simples, les tanins forment des chélates bleu-violacé avec le $FeCl_3$, réaction qui a été utilisée pendant des siècles pour la préparation des encres « ferrogalliques ».

Les propriétés tannantes concernent plus particulièrement un ensemble de substances polyphénoliques d'origine végétale dont les masses moléculaires sont comprises entre 500 et 3 000, que l'on peut classer d'emblée en deux catégories : les tanins hydrolysables ou gallotanins et les tanins condensés ou tanins catéchiques.

La plupart des structures chimiques de ces substances naturelles, connues depuis peu de temps, ont fait l'objet de travaux remarquables où se sont illustrés notamment de nombreux chercheurs des écoles de Heidelberg avec Freudenberg et Weinges, en Allemagne, et de Sheffield avec Haslam en Angleterre. C'est grâce au perfectionnement des méthodes d'isolement et de fractionnement ainsi qu'aux renseignements apportés par les techniques modernes d'analyse structurale (IR; ^1H, ^{13}C RMN) que des progrès décisifs ont pu être accomplis qui ont permis de préciser la structure d'un certain nombre de tanins.

I. TANINS HYDROLYSABLES

Tandis que les tanins condensés sont présents dans la plupart des plantes vasculaires, les gallotanins sont rencontrés dans les dicotylédones et uniquement dans certains ordres (Bate-Smith, 1978).

L'hydrolyse de ces substances en milieu acide fournit soit du glucose soit un dérivé polyalcoolique (acide quinique, galitol) à côté de l'acide gallique ou de dérivés tels que les acides ellagique (III), chébulique (IV), déhydrodigallique (V) valonique (VI) (fig. 1).

L'hydrolyse peut être avantageusement effectuée par voie enzymatique à l'aide d'hydrolases fongiques telles que la tannase d'A. niger. Cette préparation enzymatique que l'on sait purifier, incorpore deux types d'activités estérasiques : une activité estérasique vraie et une activité depsidasique que l'on peut fractionner par chromatographie sur gel.

Les gallotanins peuvent donc être considérés comme des polyesters galloylés du glucose que l'on classe à l'heure actuelle en deux catégories :

— les gallotanins qui libèrent par hydrolyse l'acide gallique (I) et ses dérivés galloylés (depsides),
— les ellagitanins qui libèrent par hydrolyse de l'acide gallique (I) et qu'accompagnent des acides tels que l'acide ellagique (III), l'acide chébulique (IV), l'acide valonique (VI), etc...

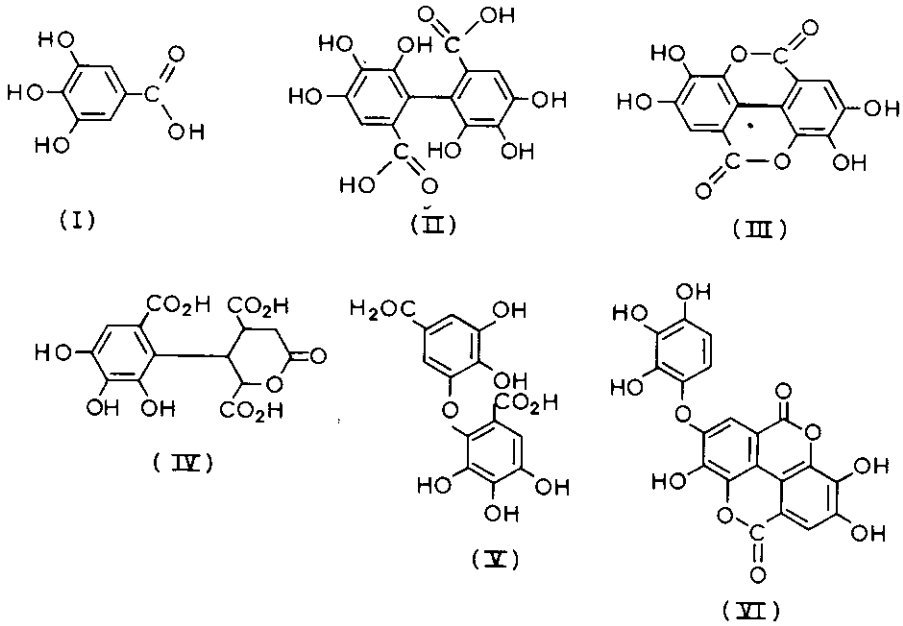


Fig. 1 — Acides phénoliques caractéristiques des tanins galliques et ellagiques.

(I) Acide gallique
(II) Acide hexahydroxydiphénique
(III) Acide ellagique
(IV) Acide chébulique
(V) Acide déhydrodigallique
(VI) Acide valonique

LES GALLOTANINS

Bien que les ellagitanins soient représentatifs des tanins hydrolysables les plus répandus, les gallotanins n'en sont pas moins intéressants pour leur intérêt à la fois commercial et historique.

Des espèces de Rhus appartenant à la famille des Anacardiacae sont la source des gallotanins les mieux connus : gallotanins de Chine (VII) (galles et feuilles de *Rhus semialata*) et de Sumach (VII) (feuilles de *Rhus coriaria*) tandis que du bois de *Quercus infectoria* on extrait le gallotanin de Turquie (VII). (fig. 2). A noter aussi que la famille des Coriariacae rassemble plusieurs espèces riches à la fois en tanins galliques et ellagiques.

L'hydrolyse acide des gallotanins de Chine et de Sumach (VII, $n = 0$, 1 et 2) ainsi que de Turquie (VII, $n = 0$, 1 et 2 avec les positions 2 et 4 du glucose diversement substituées) (fig. 2) libère du glucose et de l'acide gallique dans la proportion 1/5 à 1/8. Ces structures ont été confirmées à la fois par des méthodes chimiques et spectrophotométriques de ^{1}H RMN des molécules perméthylées. Par méthylation spécifique au diazométhane des OH phénoliques libres puis hydrolyse en milieu acide il y a formation simultanément des acides 3, 4, 5 tri O méthylgallique et 3, 4 di O méthylgallique. D'autre part, les liaisons depsidiques caractéristiques des groupements galloyl galliques sont facilement rompues par méthanolyse ménagée à chaud et à pH 6,0 tandis que les fonctions esters attenantes au glucose sont conservées dans ces conditions.

De telles structures admettent plusieurs isomères d'où la complexité des mélanges et la nécessité pour isoler des composés purs de faire appel aux méthodes chromatographiques et ultérieurement à la ^{1}H RMN pour la détermination de la configuration des molécules. Ajoutons que le glucose, bien que le plus fréquent, peut être remplacé par d'autres polyols; il existe en effet dans les gousses d'une légumineuse d'Amérique du Sud (*Caesalpinia spinosa*) un gallotanin connu sous le nom de Tanin de Tara (fig. 2) formé d'un mélange d'esters tétra et pentagalloylés de l'acide quinique dans lequel l'OH, en position 3, est estérifié, soit par un résidu m.digalloyle, soit par un résidu m.trigalloyle (IX) (fig. 2).

De même le gallotanin contenu dans les feuilles d'*Acer ginnale* (Erable de Corée) plus connu sous le nom de Tanin d'Acer libère par hydrolyse acide du galitol (anhydro D glucitol) (X) et de l'acide gallique (I) (fig. 2) tandis que l'hydrolyse du tanin des écorces d'*Hamamélis virginica* produit un ose, l'hamamélose ou 2C-(hydroxyméthyl) D ribose ainsi que de l'acide gallique (I) (fig. 2). Ce constituant de l'hamamélitanin serait le 2^1 , 5 digalloyl-hamamélose (XI).

LES ELLAGITANINS

Ces tanins sont très répandus dans les dicotylédones ligneuses où le plus souvent ils accompagnent les gallotanins, d'autre part certaines espèces de *Melianthus* (Melianthacae) très riches en ellagitanins présentent la particularité d'être pratiquement dépourvues de proanthocyanidines (Bate-Smith). On rencontre les

ellagitanins dans les fruits et dans certains bois de plantes telles que *Terminalia chebula (Myrobalans)* les cupules de *Quercus valonea,* les gousses de *Caesalpinia coriaria* (Divi,divi), les gousses de *Caesalpinia brevifolia* (Algarobilla), le bois de cœur de *Schinopsis balansae (Quebracho).*

Il s'agit des plus connus, toutefois, grâce à la séparation à contre-courant, à la chromatographie liquide ainsi qu'aux méthodes d'analyse structurale modernes, la liste des végétaux contenant des ellagitanins s'est considérablement accrue en même temps qu'une meilleure connaissance de leurs structures. Ajoutons que la recherche qualitative de ces tanins dans les végétaux est facilitées à l'heure actuelle par le test à l'acide nitreux de Bate-Smith (1956).

Les tanins ellagiques peuvent être considérés comme des esters du glucose et de l'acide hexahydroxydiphénique (II) qui est souvent accompagné de ses dérivés biogénétiques tels que les acides chébulique (IV), déhydrohexahydroxydiphénique, déhydrodigallique (V), valonique (dilactone) (VI). A noter que l'acide ellagique (III) lui-même qui peut être considéré comme un artefact, provient d'une lactonisation de l'acide hexahydroxydiphénique directement lié par deux fonctions esters à la molécule de glucose, au moment de l'hydrolyse du tanin.

L'utilisation de la chromatographie sur papier, sur colonnes de cellulose, sur gels de dextranes (Sephadex) associée à la lyophilisation des éluats, facilite à l'heure actuelle l'obtention de produits purifiés dont la structure a pu être abordée par des méthodes non destructives (IR, ^1H et ^{13}C RMN).

Pour illustrer la démarche retenue pour l'établissement de la structure, nous avons choisi trois tanins différents, la corilagine, la pédunculagine, l'acide chébulagique et les tanins contenus dans le fruit du grenadier.

1) Corilagine

La corilagine est un tanin cristallisé qui a été isolé initialement des fruits de Divi-divi et de Myrobalans et que l'on a trouvé plus récemment dans le bois d'*Eucalyptus delegatensis* (Seikel et Hillis (1970).

L'hydrolyse en milieu acide par $H_2SO_4$1N pendant 5-30 mn fournit un mélange équimoléculaire d'acide gallique (I) (5 mn), d'acide (+) 3-6 hexahydroxydiphényl glucose (HHDP glucose (8H) et d'acide ellagique (III).

L'hydrolyse ménagée dans l'eau chaude (0,7 à 10H) libère (I) (0,7H) du 3-6 HHDP glucose ainsi que (III) (3H), ce qui tend à montrer que le groupement galloyle est rattaché à l'OH anomérique tandis que l'acide hexahydroxydiphénique (II) estérifie les positions 3 et 6 de la molécule de glucose.

Bien que les spectres de ^1H RMN soient très utiles pour confirmer la position des différents éléments de la structure de la molécule ils ne permettent pas à eux seuls d'apporter une réponse absolue. En effet, la corrélation entre les déplacements chimiques δ associés aux protons aromatiques du groupement HHDP avec les positions des hydroxyles estérifiés de la molécule de glucose, telle qu'elle a été établie par Haslam (1967) pour les gallotanins, n'est pas toujours facile. Néanmoins, on sait que les δ des protons des groupements HHDP qui pontent deux OH du glucose se manifestent toujours pour des intensités de

champ plus faibles que pour les protons des groupements galloyles. Chez les ellagitanins des interactions rendent l'identification des protons du glucose difficile, toutefois, la comparaison des constantes de couplage en relation avec la conformation du cycle pyranosique (B_1, B_3, $_1C$, C_1...) a largement contribué à l'interprétation des spectres dans cette région; encore faut-il être très prudent sur les modifications de conformation que peuvent entraîner les solvants utilisés.

Dans ces conditions, on peut affecter à la corilagine la structure 3, 6 (+) HHDP 1 galloyl glucose, la molécule de glucose ayant la conformation B_3 (XIIa) ou 1C (XIIb) (fig. 3). Ajoutons que dans le péricarpe de la noix de *Juglans regia* existe un isomère de la corilagine, la juglanine qui n'en diffère que par la configuration (—) de l'acide hexahydroxydiphénique (II).

2) Pédunculagine

Du bois d'*Eucalyptus delegatensis* a été isolée la pédunculagine formée d'une molécule de glucose de conformation B_1 estérifiée par deux molécules d'acide hexahydroxydiphénique rattachées aux positions 2,3 et 1,6 du glucose ce qui confère à ce tanin la structure 1,6 — 2,3 di HHDP glucose (XIII) (Fig. 3). (Seikel et Hillis, 1970).

3) Acide chébulagique

Les tanins des fruits de *Terminalia chebula (Myrobalans)* sont formés d'un mélange d'acides chébulinique et chébulagique (XIV) (fig. 3) qui ont été isolés sous forme cristallisée. La structure du second (XIV) fait apparaître, au cours de l'hydrolyse acide, du glucose ainsi que les acides gallique, ellagique et chébulique (IV). D'autre part, l'hydrolyse du dérivé tridécaméthylé obtenu par traitement prolongé de (XIV) au diazométhane conduit à l'acide (+) hexaméthoxydiphénique. L'acide chébulique serait donc le 3,6 HHDP — 1 galloyl 2,4 chébuloyl glucose (XIV), le glucose étant en conformation 1C.

4) Tanins de Punica granatum et de Castanea sativa

Du fruit du grenadier *(Punica granatum)* ont été extraits récemment des mélanges de tanins qui après fractionnements chromatographiques répétés (Mayer & al. (1977) ont débouché sur des produits chimiquement purs. L'un d'entre eux la punicalagine (XVI) (fig. 4) libère par hydrolyse ménagée de l'acide ellagique. Après perméthylation et hydrolyse acide on obtient le dérivé dodécaméthylé du tétraméthylester de l'acide dodécahydroxyquaterphényltétracarboxylique, ce qui a permis d'affecter à (XVI) la structure d'un tanin ellagique complexe. Des structures encore plus complexes ont été élucidées récemment dans les tanins de la châtaigner *(Castanea sativa)*, dans le bois de *Quercus valonea* [1] dont celles de la castaline avec ses dérivés ellagiques, la castalagine (XVII), la vescalagine et l'acide castavalonique (XVIII) ou 4,6 valonoyl castaline (fig. 4) dans lequel une molécule de castaline est estérifiée par une molécule d'acide valonique (VI). La physionomie de telles structures qui est loin d'être familière a cependant le mérite de rendre compte subjectivement des difficultés qu'a pu soulever leur détermination.

[1] Mayer, 1977.

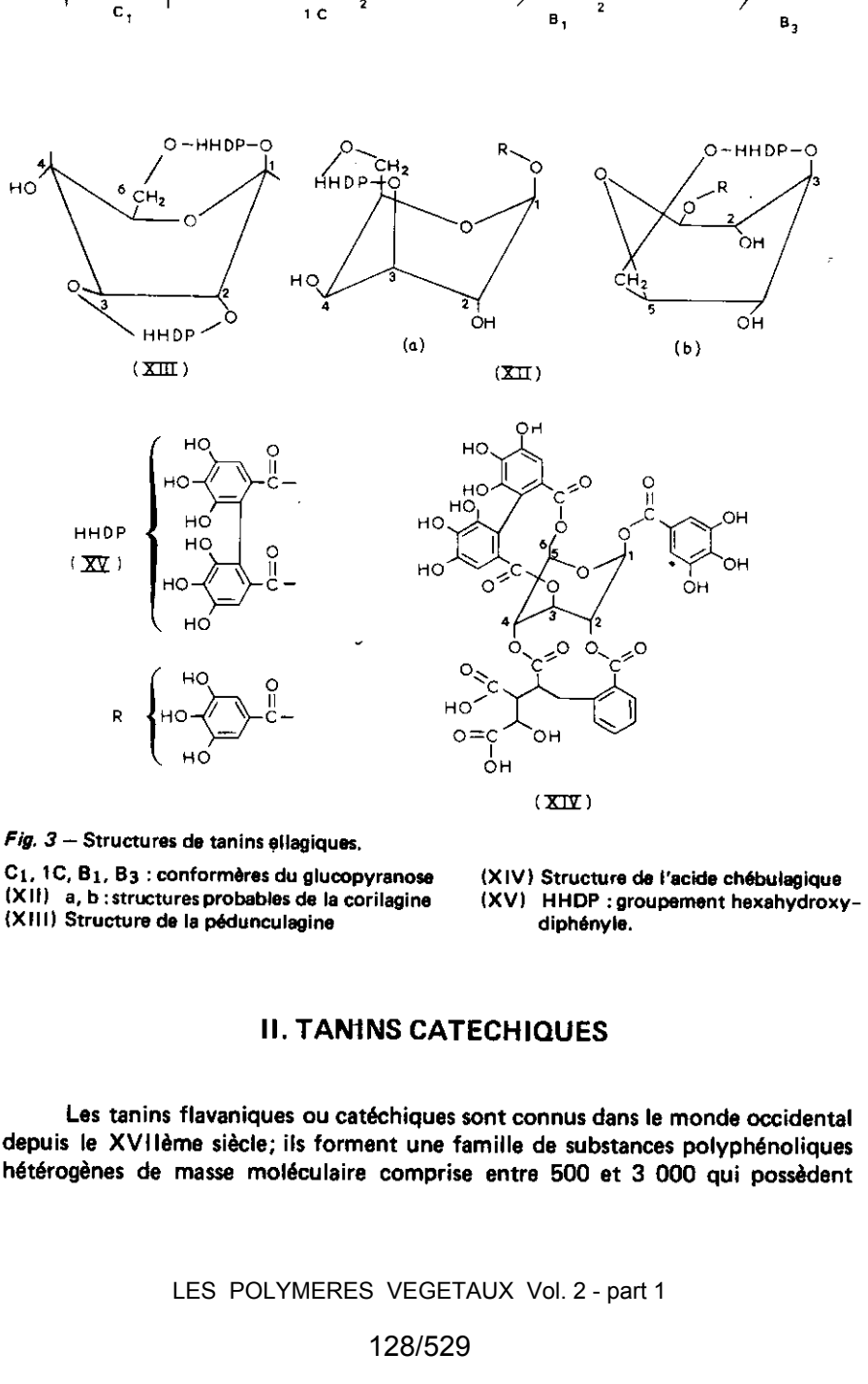


Fig. 3 — Structures de tanins ellagiques.

C_1, 1C, B_1, B_3 : conformères du glucopyranose
(XII) a, b : structures probables de la corilagine
(XIII) Structure de la pédunculagine
(XIV) Structure de l'acide chébulagique
(XV) HHDP : groupement hexahydroxydiphényle.

II. TANINS CATECHIQUES

Les tanins flavaniques ou catéchiques sont connus dans le monde occidental depuis le XVIIème siècle; ils forment une famille de substances polyphénoliques hétérogènes de masse moléculaire comprise entre 500 et 3 000 qui possèdent

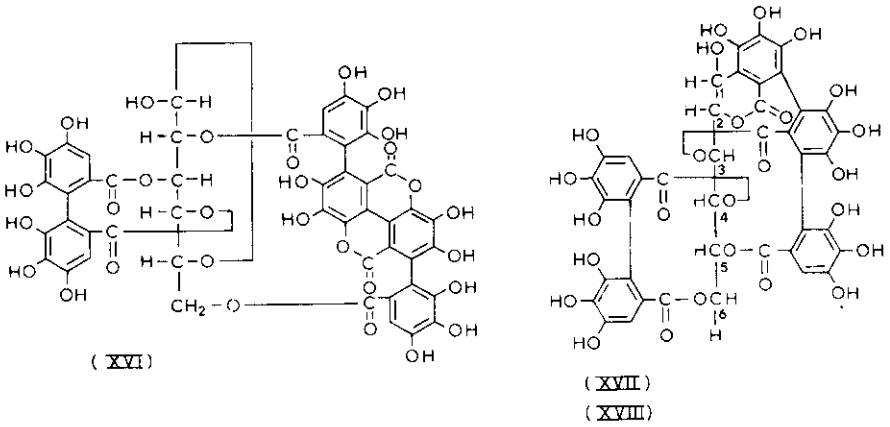


Fig. 4 — Structures de tanins ellagiques complexes.

(XVI) Punicalagine
(XVII) Castalagine ou 4,6 — HHDP — castaline
(XVIII) Acide castavalonique ou 4,6 valonoyl castaline : les positions 4,6 de la castaline sont estérifiées par une molécule d'acide valonique à la place d'une molécule d'acide hexahydroxydiphénique.

sensiblement les mêmes propriétés que les tanins galliques et ellagiques. Comme ces derniers ils précipitent les protéines en solution aqueuse et manifestent une astringence caractéristique au niveau de la langue. Il s'agit de substances incolores qui possèdent pour la plupart un noyau flavane et qui se rencontrent principalement dans les tissus végétaux lignifiés. On les trouve aussi dans les tissus végétatifs notamment dans la partie tégumentaire des fruits mûrissants auxquels ils communiquent leur astringence.

Leur présence dans les bois de cœur de *Schinopsis lorentzii* et *S. balansae* (Quebracho), l'écorce et le bois d'*Acacia mollisima* (mimosa), l'écorce et le bois d'arbres de la famille des Légumineuses, des Anacardiacae, des Fagacae a donné lieu depuis plusieurs siècles à une exploitation commerciale de ces tanins pour le traitement des peaux.

Traités par HCl 5N en milieu alcoolique, ils sont dégradés avec formation de pigments anthocyaniques de coloration rouge (cyanidine (XIX) et plus rarement delphinidine (XX)) (fig. 5), d'où le nom de leucoanthocyanes qui leur a été affecté pendant longtemps.

D'autre part, il est important de rappeler que ces substances existent in vivo sous forme non glycosidée ce qui est pour le moins inhabituel dans la chimie des polyphénols des végétaux; ce critère a sans doute une signification biogénétique encore mal perçue. Rappelons aussi que Forsyth vers 1950 a été le premier à montrer que ces réactions partagées par la plupart des tissus végétaux étaient dues généralement à des flavanes 3 ol (fig. 5) Freudenberg et Weinges (1960) — Weinges et coll., (1969) tandis que le terme de leucoanthocyanidines doit être réservé aux proanthocyanidines monomères ou flavanes 3-4 diol (fig. 6). Néanmoins, étant donné le fait que l'optimum d'efficacité tannante et de l'astrin-

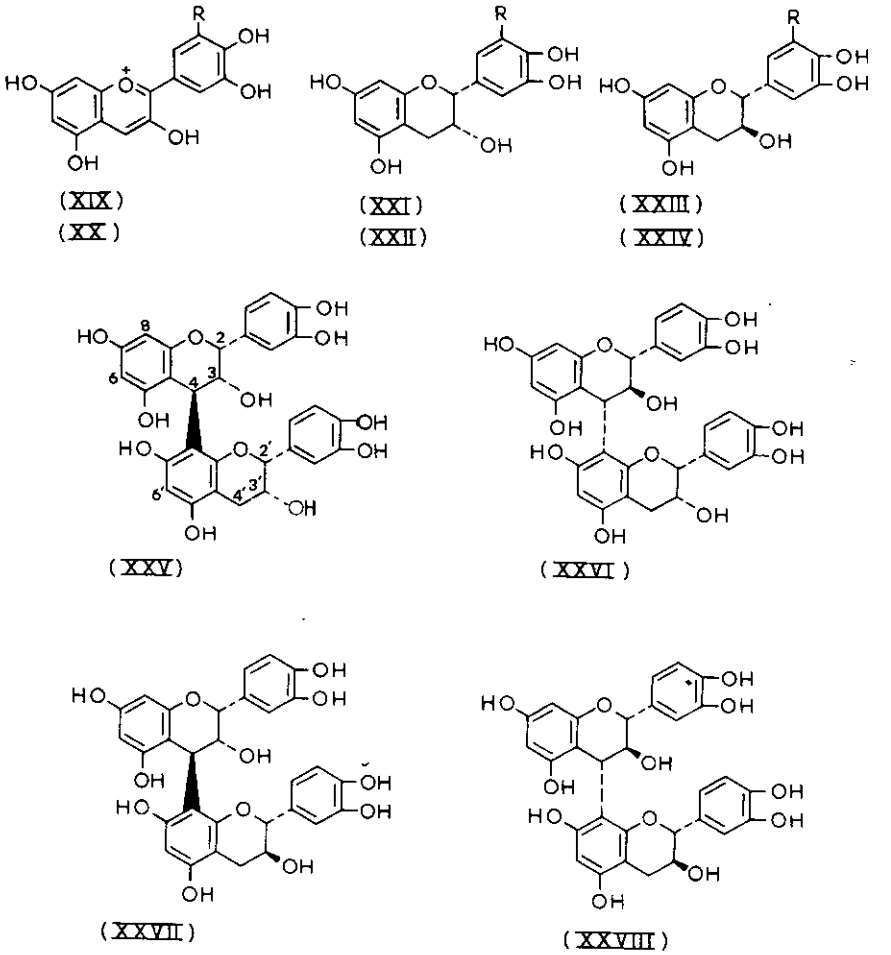


Fig. 5 — Anthocyanidines — Flavanes 3-ol — Procyanidines dimères.

(XIX) R = H Cyanidine
(XX) R = OH Delphinidine
(XXI) R = H (2R – 3R) (–) Epicatéchine
(XXII) R = OH (2R – 3R) (–) Epigallocatéchine
(XXIII) R = H (2R – 3S) (+) Catéchine
(XXIV) R = OH (2R – 3S) (+) Gallocatéchine
(XXV) Procyanidine B_2 (3R, 3'R, 4R)
(XXVI) Procyanidine B_4 (3S, 3'R, 4S)
(XXVII) Procyanidine B_1 (3R, 3'S, 4R)
(XXVIII) Procyanidine B_3 (3S, 3'S, 4S)

gence se rencontrent dans des substances de P.M. compris entre 500 et 3 000, il est opportun de réserver le terme de tanins condensés à des oligomères (dimères, trimères, etc...) de flavanes 3-ol (fig. 5 et 12), de 5 déoxyflavanes 3-4 diol (fig. 6) et de 5 déoxyflavanes 3-ol (fig. 12).

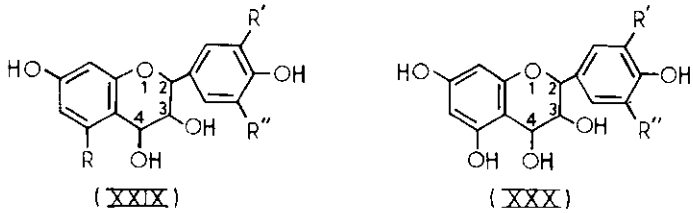


Fig. 6 — Flavanes 3-4 diol.

(XXIX) : R = R' = R'' = H Leucoguibourtinidine
R = R' = H; R'' = OH Leucofisétinidine
R = H; R' = R'' = H Leucopélargonidine
R = H; R' = R'' = OH Leucorobinétinidine
(XXX) : R' = H; R'' = OH Leucocyanidine
R' = R'' = OH Leucodelphinidine

PROANTHOCYANIDINES DIMERES

Les proanthocyanidines dimères peuvent être classés d'après l'anthocyanidine qu'elles libèrent par traitement à chaud avec HCl 5N, en milieu alcoolique. Ainsi ont été découvertes les procyanidines, prodelphinidines, propelargonidines, profisétinidines et prorobinétinidines. Signalons au passage que dans tous les tissus végétaux où les procyanidines sont présentes on trouve en même temps l'une ou l'autre des catéchines ((+) catéchine et (—) épicatéchine) et quelquefois les deux ensemble.

On classe à l'heure actuelle les procyanidines en deux catégories :

— les procyanidines de type B en $C_{30}H_{26}O_{13}$,
— les procyanidines de type A en $C_{30}H_{24}O_{12}$.

1) Procyanidines dimères de type B

Leur isolement et leur purification met en œuvre des techniques telles que la séparation à contre-courant, la chromatographie de partition sur colonnes de cellulose et de polyamide ou encore la filtration sur gels de dextranes (Sephadex LH 20).

Elles peuvent être identifiées par chromatographie bidimensionnelle sur papier ou sur couches minces de silice, par chromatographie en phase gazeuse (jusqu'au trimère) ou encore par chromatographie liquide haute pression (HPLC). La généralisation de l'emploi de cette nouvelle technique permet à l'heure actuelle d'obtenir une excellente résolution des mélanges d'oligomères. A noter aussi pour leur caractérisation l'accroissement du pouvoir de résolution des couches minces de silice commerciales et l'emploi de révélateurs chromogéniques nouveaux tels que le p. diméthylcinnamaldéhyde (Lea, 1978). D'un point de vue structural les procyanidines dimères de type B sont formées par liaison 4-8 de deux molécules de catéchines (fig. 5).

L'acétylation conduit en effet au dérivé décaacétylé attendu tandis que le traitement par HCl 5N en milieu alcoolique conduit à cyanidine (XIX) et une

Le Professeur Emile Lederer, Collège de France

catéchine (fig. 7). Cette réaction constitue manifestement un argument de taille en faveur de la fragilité de la liaison C-C interflavane. La rupture catalysée de la liaison 4-8 par les H^+dans le cas de la procyanidine B_2 conduit à la (–) épicatéchine qui provient de la sous-unité flavane inférieure et à un 4 flavanyl carbocation (C_4 carbocation) (XXXIII) à partir de la sous-unité flavane supérieure. Cet intermédiaire très réactif, à moins qu'il ne soit piégé par un réactif nucléophile, (toluène α thiol par exemple) se transforme avec perte d'un proton en flavène 3 ol-3 (XXXI) pour donner ensuite par oxydation, la cyanidine.

Lorsque le C_4 carbocation (XXXIII) réagit avec le toluène α thiol, il y a formation d'un flavanyl 4 benzylthioéther (XXXII) par rupture de la liaison 4-8 inter flavane et libération du flavane 3-ol, correspondant à la sous-unité flavane inférieure. Le benzylthioéther (XXXII) libère de la cyanidine lorsqu'il est traité en milieu acide fort tandis que par réduction catalytique en présence de Nickel de Raney on obtient de la (–) épicatéchine (fig. 7). Cette dernière réaction permet de manière simple de confirmer la configuration de la sous-unité flavane supérieure. Il convient par ailleurs d'ajouter que la nature de la liaison C-C interflavane des dimères de type B n'a pû être encore complètement précisée malgré l'étude approfondie des spectres de ^1H RMN des dérivés décaacétylé et octaméthyldiacétate. En fonction de ces observations, on pense généralement que les deux sous-

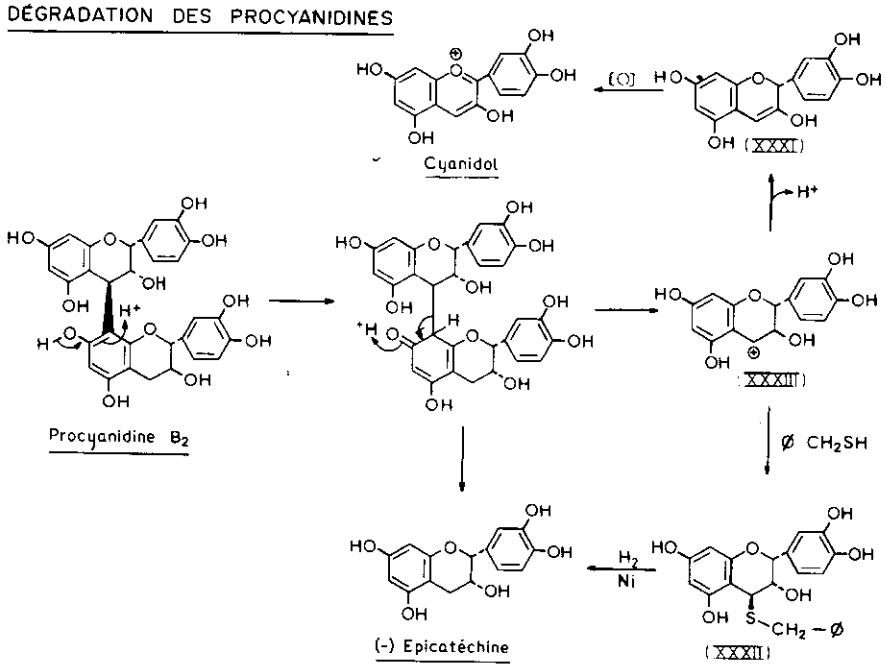


Fig. 7 — Dégradation en milieu acide de la procyanidine B_2.(Haslam, 1977).

(XXXI) Flavène 3-ol 3
(XXXII) Flavanyl 4 benzylthioéther
(XXXIII) Flavanyl 4 carbocation (C_4 carbocation)

TABLEAU I

Procyanidines dimères

Type	Sous-unité supérieure	Sous-unité inférieure
B_1	(–) épicatéchine	(+) catéchine
B_2	(–) épicatéchine	(–) épicatéchine
B_3	(+) catéchine	(+) catéchine
B_4	(+) catéchine	(–) épicatéchine
B_5	(–) épicatéchine	(–) épicatéchine (E)
B_6	(+) catéchine	(+) catéchine (E)
B_7	(–) épicatéchine	(+) catéchine (E)
B_8	(+) catéchine	(–) épicatéchine (E)

(E) : épimère C4.

unités flavanes 3-ol sont liées par l'intermédiaire d'une liaison simple C_4-C_8 ou C_4-C_6 à moins qu'il ne s'agisse plus simplement de couples d'épimères en C_4 (B_1 et B_7), (B_2 et B_5), (B_3 et B_6), (B_4, B_8) ? (tableau I).

On est cependant à peu près assuré à l'heure actuelle que parmi les 8 dimères en provenance de la (+) catéchine et de la (–) épicatéchine les procyanidines B_2 et B_3 ont une liaison C_4-C_8 tandis que B_5 et B_6 seraient de type C_4-C_6 (Haslam, 1977).

L'ensemble de ces observations est valable pour les procyanidines dimères homogènes dans lesquelles les deux sous-unités flavane 3-ol ont même formule globale, pas forcément même configuration. Récemment ont été isolées aussi de certaines espèces de palmes *(Livinstonia chinensis)* puis caractérisées, des procyanidines non homogènes de type B formées de (+) épicatéchine et de (+) épiafzéléchine (XXXIX) (fig. 12).

2) Stéréochimie des procyanidines dimères de type B

En dehors de quelques rares dimères tels que B_4 et B_3 pour lesquels la configuration du C_4 a été montrée de type 4S il n'est pas facile de déterminer la configuration absolue de la liaison C_4-C_8 ou C_4-C_6. L'examen approfondi des spectres de ^1H RMN des procyanidines B_1, B_2, B_3, B_4 sous forme de dérivés octaméthylés et décaacétylés a permis de montrer qu'en solution ces molécules pouvaient exister sous forme d'un mélange d'au moins 2 conformères privilégiés, état qui découle directement de l'empêchement à la libre rotation de la liaison interflavane. Pour les procyanidines B_1 et B_2 et leurs dérivés, cette rotation contrariée est la conséquence en premier lieu de la tendance au recouvrement du proton en C_2 par les groupements OH et O substitués (OH, OCH_3, OAc)

situés en ortho par rapport à la liaison interflavane dans la sous-unité flavane 3-ol sous-jacente (fig. 8). Pour les procyanidines B_3 et B_4 l'empêchement à la libre rotation résulterait du recouvrement des substituants des atomes d'oxygène portés par le C_3 et le C_5 de la sous-unité flavane 3-ol supérieure avec les oxygènes en position ortho,situés de part et d'autre de la liaison interflavane, dans la sous-unité flavane inférieure (Haslam, 1977) (fig. 8).

Ces observations débouchent sur deux remarques complémentaires susceptibles de modifier à terme la compréhension des processus d'association tanins/protéines. On est tenté en effet de voir dans la stéréoisomérie des procyanidines B_2 et B_3 deux configurations dont l'une est approximativement l'image de l'autre. D'autre part si le passage des dimères aux trimères puis aux oligomères supérieurs se fait par addition répétée d'une unité flavane 3-ol supplémentaire, la libre rotation de la liaison interflavane se trouve alors contrariée et on aboutit à terme à la création de deux structures hélicoïdales de configurations inverses (Haslam, 1977). Les oligomères reliés à la (—) épicatéchine formeraient des hélices gauches tandis que ceux qui dépendent de la (+) catéchine seraient engagés dans des hélices droites. Il est intéressant de noter encore que dans ces structures les cycles A et B des unités flavanes font partie de l'enchaînement principal tandis que les cycles C porteurs de groupements o-diphénol occupent sur l'hélice des positions périphériques qui doivent jouer un rôle important dans l'association avec les protéines (Haslam, 1977).

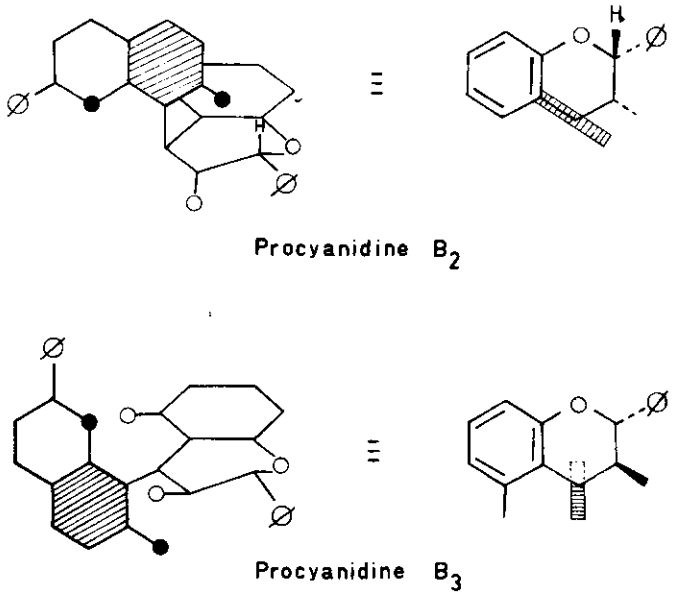


Fig. 8 — Procyanidines B_2 et B_3. Conformations avantagées. (Haslam, 1977).

4) Procyanidines dimères de type A

Les procyanidines A (fig. 9) qui semblent moins répandues que les procyanidines B, ont été isolées de *Aesculus hippocastanum, Cola acumiata, Vaccinium vitis idae.* Par acétylation, on obtient un dérivé nonaacétylé ce qui signifie qu'un OH se trouve engagé dans une liaison interflavane. D'autre part, le traitement en milieu alcoolique HCl 5N de la procyanidine A_2 fournit de la cyanidine avec un rendement très faible ainsi que de la (–) épicatéchine. La structure de A_2 (XXXIV) est par ailleurs résistante à l'attaque par le toluène α thiol en milieu acétique tandis que l'hydrogénolyse conduit à deux dérivés identiques à ceux que l'on obtient par un traitement semblable de la (–) épicatéchine. Ces différents résultats tendent à confirmer l'existence d'une liaison interflavane inhabituelle de type acétal

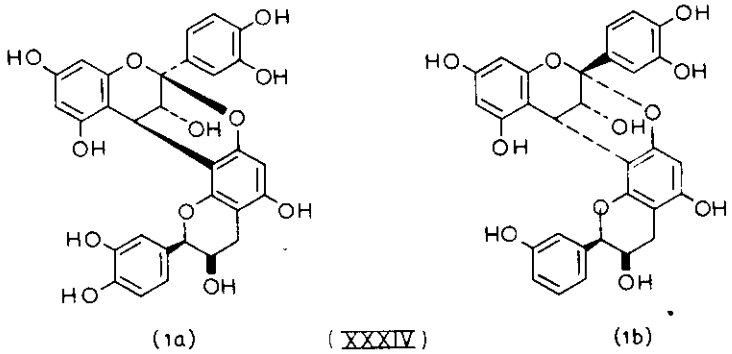


Fig. 9 – (XXXIV) Configurations 1 a et 1 b de la procyanidine A_2. (Haslam 1974).

qui a pu être confirmée par ailleurs par ^{13}C RMN. La comparaison de cette structure avec celle de composés modèles, ainsi que les considérations d'ordre biogénétique ont conduit Haslam (1974) a affecter à la procyanidine A_2 (XXXIV) la structure et la stéréochimie d'un 2, 8'' époxy 4, 7'' biflavane. Il a été établi en plus que l'unité flavane 3-ol supérieure de la molécule a la même configuration absolue que celle de la (–) épicatéchine, ce qui conduit à envisager l'existence de 2 configurations possibles (1 a) et (1 b) (fig. 9). Toutefois, seule la configuration (1 a) s'est avérée conforme à la stéréochimie du produit naturel.

4) Proanthocyanidines dimères non homogènes

Dans différents bois d'origine exotique, *S. balansea* (Quebracho), *Acacia luederitzii, Colophospermum mopane, Acacia mearnsii* ont été identifiés divers dimères non homogènes de type B résultant de l'association, par l'intermédiaire de liaisons 4-6 et 4-8, de molécules de flavanes 3-ol et de 5 déoxyflavanes 3-ol (XXXVII) et (XXXVIII) (fig. 11), qui libèrent par traitement acide des anthocyanidines telles que : pélargonidine, delphinidine, robinidine, fisétinidine (fig. 12).

TABLEAU II

Proanthocyanidines B dimères non homogènes (Marini-Bettolo, 1975)

Type	S/unité flavane supérieure	S/unité flavane inférieure	Plante
B_2 ou B_5	(–) épiafzéléchine	(–) épi-4'-méthoxy gallocatéchine	*Ouratea*
B_3 ou B_6	(+) fisidanol	(+) catéchine	
B_1 ou B_7	(–) robidanol	(+) catéchine	*Acacia mearnsii*
	(–) robidanol	(+) gallocatéchine	
B_3 ou B_6	(+) gallocatéchine	(+) catéchine	*Myrica nagi*

Fait assez insolite certains de ces dimères possèdent comme sous-unité inférieure une molécule flavane 3-4 diol (fig. 6) (Roux, 1975) ce qui pose alors un délicat problème de biogénèse pour ces substances.

PROCYANIDINES OLIGOMERES HOMOGENES DE TYPE B

Des procyanidines trimères C_1 (XXXV) et C_2 (XXXVI) (fig. 10) formées respectivement d'unités (–) épicatéchine et (+) catéchine unies par des liaisons

Fig. 10 — Procyanidines B trimères.

(XXXV) Trimère C_1 (formé d'unités (–) épicatéchine)
(XXXVI) Trimère C_2 (formé d'unités (+) catéchine).

C_4-C_8 ont été isolées de Theobroma cacao et de Salix caprea ainsi que d'autres végétaux dans lesquels coexistent des proanthocyanidines dimères. De même des oligomères jusqu'à l'heptamère ont été mis en évidence récemment dans le cidre (Lea, 1977) toutefois leur identification demeure incomplète. A noter en particulier que l'accroissement du poids moléculaire a pour effet de diminuer la solubilité et d'augmenter l'affinité pour le collagène de telle sorte que ces substances (P.M. $\simeq$800) peuvent être déjà considérées comme de véritables tanins.

PROANTHOCYANIDINES OLIGOMERES

Tous les oligomères (trimères, tétramères...) ont des propriétés astringentes et tannantes qui peuvent être mises en évidence au niveau de la salive et de la poudre de peau. D'un point de vue structural, ils comportent tous comme sous-unité terminale une molécule de flavane 3-ol reliée à celle qui la précède par une liaison 4-8; d'autre part, les sous-unités 5 déoxyflavanes 3-ol (fisétinidol, robinétinidol) forment avec les suivantes une liaison interflavane de type 4-6 (XXVII) et (XXXVIII) (fig. 11).

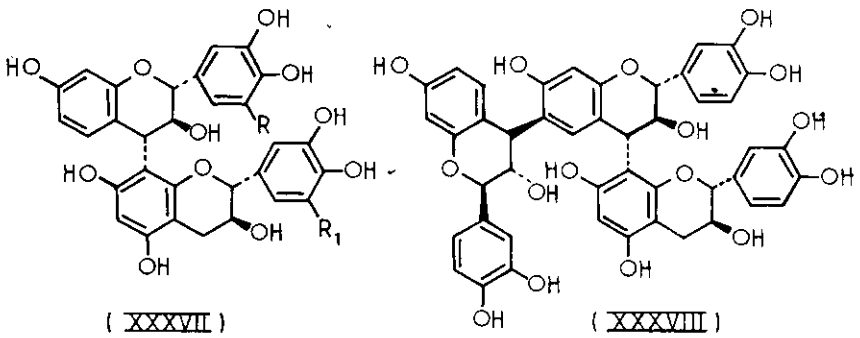


Fig. 11 — Procyanidines oligomères.

(XXXVII) R = R_1 = H; Profisétinidine dimère; [(–) Fisétinidol- (+) Catéchine]
R = OH; R_1 = H; Prorobinétinidine dimère; [(–) Robinétinidol-(+) Catéchine]
R = R_1 = OH; Prorobinétinidine dimère; [(–) Robinétinidol- (+) Gallocatéchine]

(XXXVIII) Profisétinidine trimère; [(–) Fisétinidol- (–) Fisétinidol- (+) Catéchine]

Il est donc probable (Roux, 1975) que la substitution préférentielle des positions 6 et 8 dans les flavanes de type phloroglucinol et résorcinol doit dépendre d'une plus grande accessibilité à chacune de ces positions.

Ces considérations se trouvent corroborées par les résultats de la ^{1}H RMN. Pour les dimères comme pour les oligomères la position 8 de la (+) catéchine ou de la (–) épicatéchine représente le site nucléophile de la sous-unité terminale

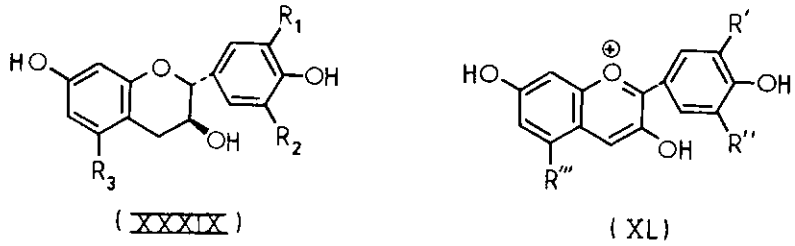


Fig. 12 – 5-déoxyflavanes 3-ol et anthocyanidines.

(XXXIX) $R_1 = R_3 = H$ (–) Fisétinidol
$R_1 = R_2 = R_3 = H$ Guibourtinidol
$R_3 = H; R_2 = OH$ (–) Robinétinidol
$R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$ (+) Epiafzéléchine

(XL) $R' = R'' = R''' = H$ Guibourtinidine
$R' = R''' = H; R'' = OH$ Fisétinidine
$R''' = H; R' = R'' = OH$ Robinétinidine
$R' = R'' = H; R''' = OH$ Pélargonidine
$R' = R'' = OCH_3; R''' = OH$ Malvidine

qui réagit avec l'ion benzyl carbonium formé à partir d'une molécule de flavane 3-4 diol. Cette substitution électrophile pourrait ensuite se répéter au niveau de la position 6 de la sous-unité flavane de l'oligomère, la plus accessible. Cette première hypothèse avancée par Roux et coll. (1975) malgré sa cohérence résiste mal cependant à l'observation générale qui fait qu'il est possible d'isoler d'une même plante les flavanes 3-ol correspondant aux proanthocyanidines tandis que les leucoanthocyanidines ne sont jamais présentes en même temps.

A cet égard, il semble bien que l'hypothèse avancée par Haslam et coll. (1977) soit davantage conforme aux faits observés. D'après ces auteurs les procyanidines seraient formées par un processus de déshydrogénation des précurseurs (–) épicatéchine et (+) catéchine sans qu'il soit besoin par ailleurs de faire appel à une polycondensation oxydative. La clé du processus serait le flavène 3-ol-3 (XXXI) ou une forme tautomère dont la réduction pourrait conduire aux flavanes 3-ol (XXI) et (XXIII) ainsi qu'à la biosynthèse des procyanidines oligomères, tandis que son oxydation conduirait à la cyanidine (XIX) (fig. 13). La réduction stéréospécifique de (XLII) donnerait lieu à la formation des flavanes 3-ol (XXI) ou (XXIII) tandis que la protonation stéréospécifique conduirait aux carbocations (XXXIII)a et (XXXIII)b de même configuration que les flavanes 3-ol (XXI et XXIII). Dès lors, on peut concevoir que la condensation de (XXXIII)a et (XXXIII)b avec les flavanes 3-ol peut être dirigée sur les sites nucléophiles C_6 ou C_8 par l'intermédiaire du C_4 électrophile de l'hétérocycle oxygéné, pour former les procyanidines correspondantes.

Il est certain par ailleurs que les deux sous-unités flavanes 3-ol qui forment les molécules de procyanidines proviennent d'entités métaboliques différentes. On peut penser dès lors que si la réduction de (XXXI) en flavane 3-ol fait l'objet de 2 étapes successives, l'arrangement stéréospécifique du proton sur l'ion hybride (XLII) qui conduit aux carbocations (XXXIII)a et (XXXIII)b précède la formation stéréospécifique des produits de réduction (XXI) et (XXIII).

Cette réduction met probablement en œuvre un nucléotide réducteur (NADPH) qui pourrait conférer un caractère limitant à la 2ème étape du processus de formation des flavanes 3-ol (fig. 13).

Dès lors, il semble évident que les procyanidines oligomères (trimères, tétramères...) puissent être formées à partir des dimères par condensation répétitive avec les carbocations (XXXIII)a et (XXXIII)b. Par ailleurs, certaines observations tendent à accréditer l'idée que ces réactions se déroulent dans les cellules végétales en l'absence de contrôle enzymatique. Chacun sait qu'au moment de la mâturation des fruits et des graines, on assiste à une diminution caractéristique de l'astringence (Goldstein et Swain, 1963) et de l'activité photosynthétique. On peut donc penser qu'au moment de la maturation, la capacité de réduction du flavène 3-ol 3 (LI) en flavène 3-ol est très affaiblie de telle sorte que (XXXI) peut être facilement oxydé en cyanidine (XIX). Cette hypothèse permet de rendre compte du développement de la pigmentation rouge caractéristique des téguments des fruits mûrs ainsi que de la coloration rouge des feuilles sénescentes en automne. De même, il est évident que la condensation des carbocations (XXXIII)a et (XXXIII)b avec les procyanidines dimères déjà formées provoque leur disparition au profit des formes oligomères plus condensées, ce qui se traduit par une perte de l'astringence et une diminution de la solubilité (Haslam, 1977).

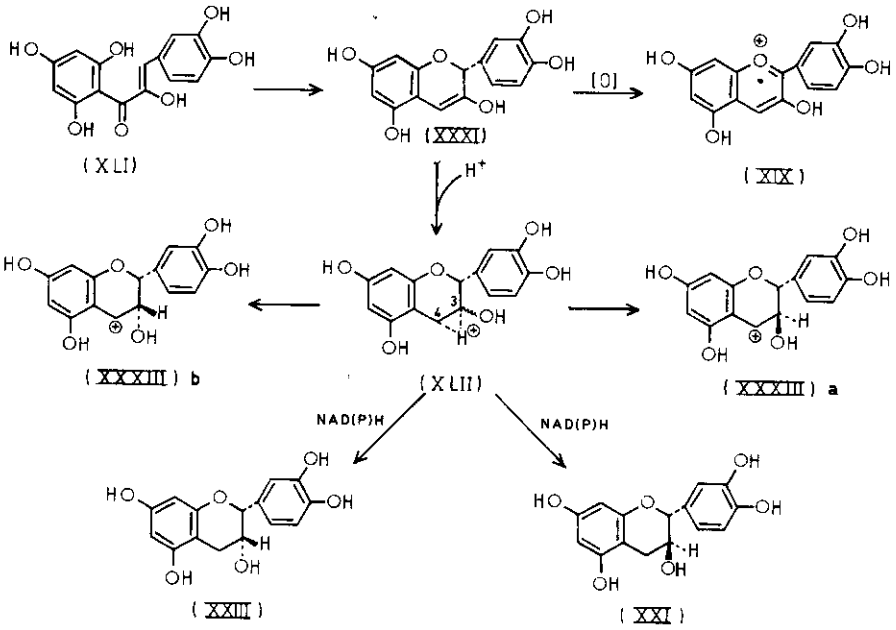


Fig. 13 — Mécanisme hypothétique de la biosynthèse des catéchines et des procyanidines. (Haslam et coll., 1977).

(XLI) α hydroxychalcone
(XXXI) Tetrahydroxyflavène 3-ol 3
(XLII) Cation hybride
$(XXXIII)_a$ et $XXXIII)_b$ Flavanyl 4 carbocations.

III. REACTIVITE DES TANINS CONDENSES

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la transformation des tanins condensés, étant donné l'importance qu'ils présentent pour la conservation des fruits et des légumes ainsi que pour le conditionnement des boissons telles que le thé, le vin, le cidre ou encore la bière.

La connaissance des mécanismes de la polycondensation revêt un intérêt particulier pour la compréhension à la fois des processus de vieillissement et de stabilisation colloïdale des milieux contenant des protéines.

POLYCONDENSATION DES TANINS OLIGOMERES EN MILIEU ACIDE

Quand ils sont chauffés en présence d'un acide minéral les tanins sont soumis à deux réactions compétitives : la première, nous l'avons vu, conduit par coupure partielle des liaisons interflavanes à la formation d'anthocyanidines et de catéchines (fig. 7) tandis que la seconde entraîne l'ouverture partielle de l'hétérocycle oxygéné des unités flavanes 3-ol avec formation de p-hydroxybenzyl carbocations ou C_2 carbocations (fig. 18). Ces derniers peuvent ensuite se condenser au hasard avec différents sites nucléophiles appartenant à d'autres unités flavanes pour former des phlobaphènes ou tanins rouges ([1]) (fig. 18). Tandis qu'en milieu alcoolique (80-100 % d'éthanol) la formation d'anthocyanidines est facilitée, en milieu aqueux c'est surtout la polycondensation et la production de phlobaphènes qui l'emporte.

COUPLAGE OXYDATIF DES PHENOLS

Pour comprendre les mécanismes de la polycondensation oxydative des tanins, il nous paraît utile de rappeler le comportement des phénols simples et des o. et p. diphénols en milieu oxydant.

Tous les phénols simples tels que l'hydroquinone, le catéchol, le pyrogallol, la catéchine ainsi que les flavanes 3-ol oligomères donnent lieu à couplage oxydatif avec polycondensation des sous-unités monomères (fig. 14).

L'oxydation spontanée par l'oxygène moléculaire est minimale aux environs de pH = 2,5, elle s'accroît très vite en solution aqueuse dès que l'on dépasse pH = 3,5-4,6 pour devenir très rapide en milieu alcalin ou en présence d'oxydases telles que laccases, catécholases, peroxydases. Le mécanisme de couplage est vraisemblablement de nature à la fois ionique et radicalaire (schéma 1), ce qui explique la création de liaisons -C-C- et -C-O-C- entre les différents noyaux aromatiques (fig. 14). Dans le cas de l'oxydation de la catéchine en milieu aqueux par la laccase en présence de benzène sulfinate de sodium à pH = 5,0 il y a blo-

([1]) (Mécanisme (C)).

cage de la structure semi-quinonique intermédiaire avec formation d'une sulfone (XLIII) ce qui est un argument en faveur de la formation de ces intermédiaires (fig. 14). L'oxydation enzymatique de la catéchine débouche par ce mécanisme sur la formation de dimères et de polymères de déshydrogénation couplés par l'intermédiaire de liaisons 2-8 au niveau des noyaux B et A de deux unités flavanes consécutives (fig. 14). L'oxydation enzymatique du pyrogallol (XLIV) par la peroxydase, la laccase ou la tyrosinase débouche elle aussi sur la formation intermédiaire d'une hydroxy o.quinone qui se condense pour former la purpurogalline (XLV) (fig. 15) caractérisée par la présence d'un noyau tropolone.Dans les mêmes conditions l'oxydation de l'acide gallique entraîne la formation d'acide purpurogalline β carboxylique (XLVI) tandis que le gallate de méthyle en présence de tyrosinase donne lieu à couplage C-C de deux molécules avec formation d'une lactone qui n'est autre que l'acide ellagique (III). A noter que la peroxydase ne semble pas catalyser cette réaction (fig. 15).

Ces différents processus sont amplement illustrés par l'oxydation des polyphénols du thé (fig. 16).

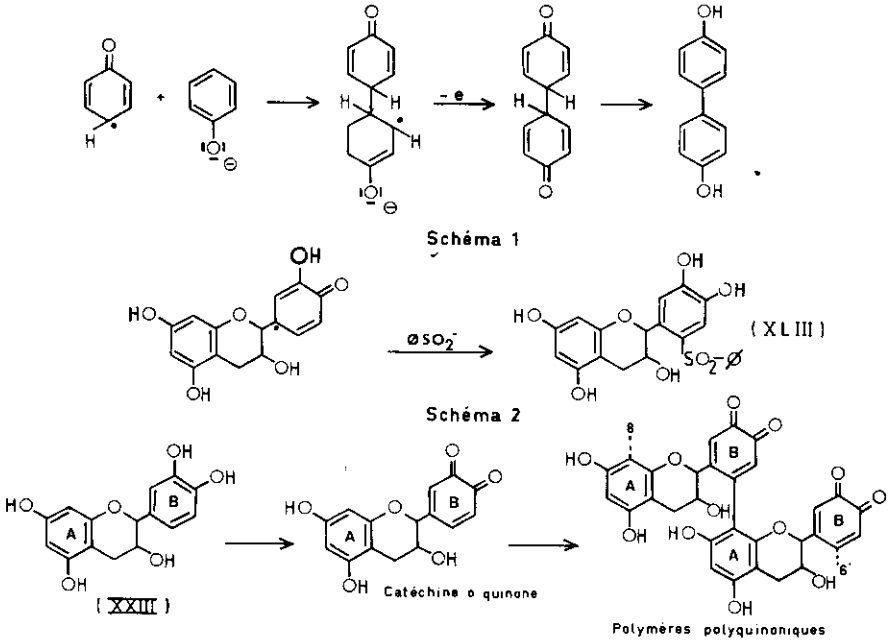


Fig. 14 — Mécanismes de couplage des phénols par oxydation.

Schéma 1 : Couplage oxydatif des monophénols
Schéma 2 : Oxydation de la catéchine par la laccase en présence d'acide sulfinique. Formation de la 6' phénylsulfonyl catéchine (XLIII).
Schéma 3 : Formation de liaisons de couplage 6' — 8 entre noyaux B et A de deux unités flavanes 3-ol.

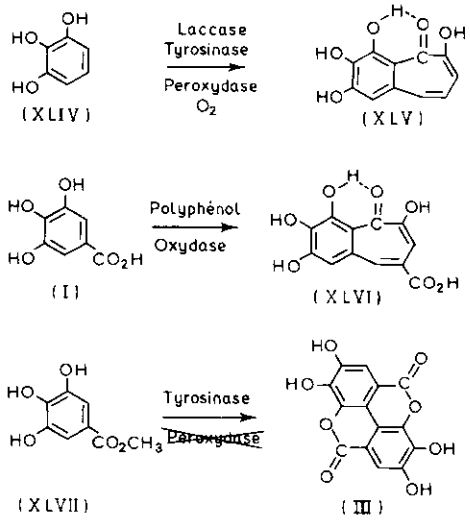


Fig. 15 — Oxydation enzymatique du pyrogallol, de l'acide gallique et du gallate de méthyle.

(XLIV) Pyrogallol
(XLV) Purpurogalline
(XLVI) Acide purpurogalline β carboxylique
(XLII) Gallate de méthyle
(III) Acide ellagique.

PRODUITS D'OXYDATION DES POLYPHENOLS DU THE

La fermentation est l'étape la plus caractéristique et la plus importante de la préparation du thé noir, après la récolte. Le « thé frais » est particulièrement riche en composés polyphénoliques parmi lesquels les flavanols représentent 15 à 25 % du poids sec : (–) épicatéchine (XXI), (–) épicatéchine 3 gallate, (–) épigallocatéchine (XXII), (–) épigallocatéchine 3 gallate, (+) catéchine (XXIII), (+) gallocatéchine (XXIV) avec en plus diverses procyanidines et prodelphinidines oligomères (fig. 16). La fermentation est initiée par macération dans l'eau des jeunes pousses ce qui a pour effet de mettre en contact les polyphénoloxydases du thé avec les flavanols. L'oxydation couplée de ces derniers avec l'acide gallique (I) conduit à la formation des bisflavanols A, B, C, (XLIX) à la théaflavine (LI) aux théaflavines gallates A et B (LI) à la théaflavine digallate (LI), à l'acide épithéaflavique (XLVIII) et à l'acide 3' galloyl épithéaflavique (XLVIII) (fig. 16).

En même temps, on observe aussi la formation de théarubigines dont les P.M. sont compris entre 700 et 40 000 et qui proviennent de la polycondensation oxydative complexe des proanthocyanidines (L) avec les différents produits de dimérisation (XLIX), (LI) etc. Elles sont responsables de la couleur brun foncé du thé noir et forment un ensemble de polycondensats de structures mal connues (Sanderson et coll., 1976).

La fermentation entraîne de manière sensible une diminution notable de la quantité totale des flavanols au cours de la période initiale. D'autre part, il est

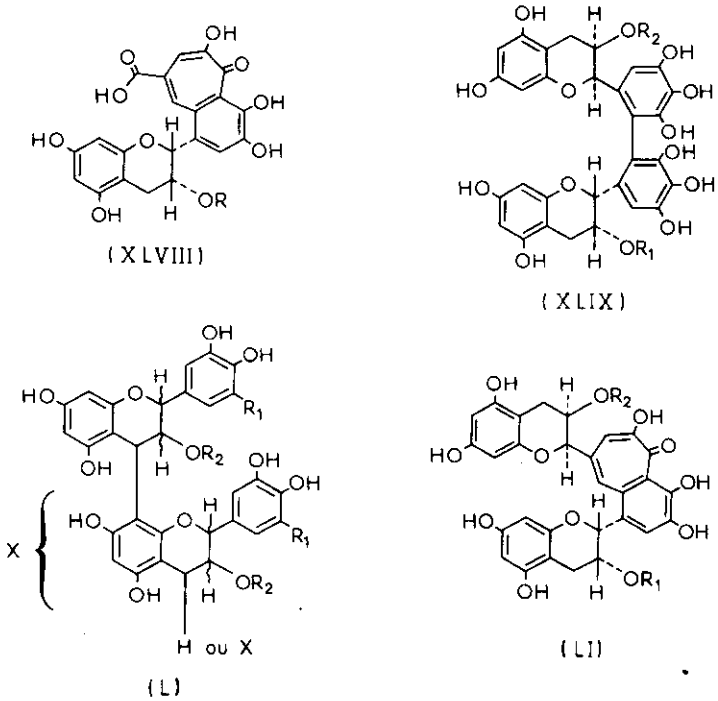


Fig. 16 – Tanins du thé noir : produits de dimérisation oxydative.

(XLVIII) R = H; Acide épithéaflavique
R = galloyle; Acide 3' galloyl épithéaflavique
(XLIX) $R_1 = 4_2$ = galloyle; Bisflavanol A
R_1 = H; R_2 = galloyle; Bisflavanol B
$R_1 = R_2$ = H; Bisflavanol C
(L) $R_1 = R_2$ = H Procyanidines
R_1 = H; R_2 = galloyle; Procyanidine gallate
R_1 = OH; R_2 = H. Prodelphinidine
R_1 = OH; R_2 = galloyle; Prodelphinidine gallate
(LI) $R_1 = R_2$ = H; Théaflavine
R_1 = H; R_2 = galloyle; Théaflavine gallate A
R_1 = galloyle; R_2 = H; Théaflavine gallate B
$R_1 = R_2$ = galloyle; Théaflavine digallate

remarquable que les galloflavanols soient oxydés plus rapidement que les catéchol-flavanols alors que les uns comme les autres présentent des affinités très voisines pour le système oxydasique du thé. Cette observation n'a pas trouvé encore d'explication satisfaisante.

POLYCONDENSATION OXYDATIVE DES TANINS

Les observations et les mécanismes imputables aux phénols simples o. diphénols et vic.triphénols sont valables aussi dans leur ensemble pour l'oxyda-

tion des tanins qui portent les mêmes groupements fonctionnels. Nous observerons par exemple que l'anhydride sulfureux et les acides organiques inhibent également l'oxydation des phénols simples et des tanins.

La formation des théarubigines par oxydation enzymatique des proanthocyanidines du thé (L) permet de mettre en évidence dans ces polycondensats bruns l'existence de liaisons de couplage C-C et -C-O-C. L'établissement de ces dernières dépend directement de la réactivité des positions 6, 8, 2', 5', 6'; 2'' et 6'' des noyaux B et des groupements gallates (fig. 17). (Brown, 1969).

Les théarubigines qui sont formées par un ensemble de polymères hétérogènes,dont la composition varie essentiellement avec les conditions de la fermentation et de la torréfaction du thé, libèrent des quantités notables de cyanidine (XIX) lorsqu'elles sont chauffées en milieu alcoolique-HCl.

A cet égard, il est intéressant d'observer que malgré la présence dans le thé d'une quantité de dérivés 3'-4' dioxygénés égale environ au tiers des dérivés 3', 4', 5', trioxygénés la quantité de cyanidine obtenue en milieu alcool isopropylique-HCl est toujours supérieure à la quantité de delphinidine formée dans ces mêmes conditions. Ce résultat tend donc à montrer que des liaisons interflavanes s'établissent préférentiellement entre positions 2' et 6' des noyaux B trihydroxylés et d'autres unités flavanes ou gallates. D'autre part, le faible rendement en acide gallique de l'hydrolyse acide des théarubigines suggère que les résidus galliques sont oxydés en groupements hydroxy o.quinoniques à moins que des liaisons inter-aryles ne soient échangées entre les positions 2'' et (ou) 6'' de ces mêmes résidus.

Ces transformations participent en continu aux processus de polycondensation au fur et à mesure que progresse la fermentation. Ces hypothèses sont d'ailleurs corroborées par le fait même que le P.M. des pigments du thé noir s'accroît au cours du vieillissement des solutions aqueuses de théarubigines.

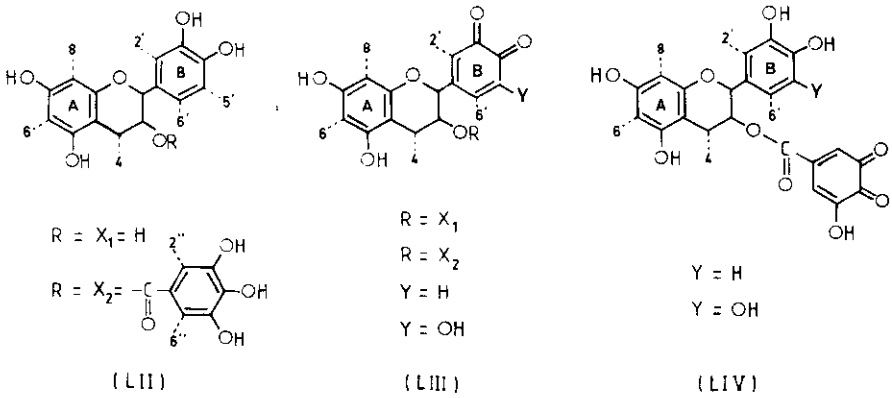


Fig. 17 — Couplage oxydatif des flavanes 3-ol du thé au cours de la formation des théarubigines en présence des systèmes polyphénol oxydasiques. (Brown, 1969).

(LII) Positions réactives des noyaux A, B et des groupements gallates
(LIII) et (LIV) Position réactives des intermédiaires quinoniques.

ORIGINE ET NATURE DES TANINS DES VINS

Les principaux flavanes 3-ol des vins sont la (+) catéchine et la (−) épicatéchine qu'accompagnent de faibles quantités de gallocatéchine (XXIV) et de dérivés galloylés. La teneur en catéchine des vins blancs est de l'ordre de 10 à 50 mg/l, elle peut atteindre 800 mg/l dans les vins rouges. (Ribéreau-Gayon, 1973).

Les catéchines sont avec divers anthocyanogènes à l'origine de la formation des tanins condensés du vin; il semble d'ailleurs que la participation simultanée de ces deux sortes de composés soit plus efficace que celle des catéchines seules. Nous noterons aussi, au passage, que la teneur en anthocyanogènes des vins rouges est environ 4 fois plus élevée que leur teneur apparente en catéchine. Sur un total de 1 400 mg de phénols totaux exprimés en équivalents galliques (E.G.) qu'incorpore un vin rouge nouveau, 120 mg sont imputables aux pigments anthocyaniques, 250 mg aux catéchines et 750 mg environ aux anthocyanogènes polymérisés. Pour des teneurs respectives en composés phénoliques totaux exprimés en (EG/l) de 350 mg (vin blanc) et de 1 460 mg (vin rouge) les teneurs en tanins astringents les plus polymérisés atteignent 22 mg (EC/l) pour un vin blanc contre 460 mg (EG/l) pour un vin rouge. Par précipitation sélective (méthylcellulose) il est facile de montrer qu'un tiers environ des polyphénols totaux d'un vin rouge se trouvent engagés sous forme de tanins polymérisés.

D'autre part il est important d'observer que la plus grande partie des pigments anthocyaniques responsables de la couleur des vins rouges sont incorporés dans la fraction des tanins polymérisés.

Mais à coté des catéchines et des pigments anthocyaniques il existe aussi des procyanidines oligomères (dimères, trimères) très réactives qui, au cours du vieillissement, se polycondensent avec formation de polymères de P.M. compris entre 2 000 et 4 000, comportant 8 à 14 unités flavanes ([1]). Il est certain qu'au cours de la conservation oxydative du vin (pH = 3,0) en présence d'air, pendant la première phase de vieillissement, les procyanidines dimères et trimères se polymérisent plus rapidement que les catéchines.

La formation d'un flavanyl 4 carbocation (C_4 carbocation) (XXXIII) (fig. 18) en milieu acide et à température de conservation du vin pourrait être à l'origine de la condensation avec les positions nucléophiles 6 et 8 d'une autre molécule de procyanidine; la répétition de ce processus débouche sur la formation de tanins condensés (Processus A, fig. 18).

On ne saurait écarter aussi la formation probable de C_2 carbocations (fig. 18), isomères des précédents, qui pourraient infléchir la condensation vers la formation de structures polymères dans lesquelles un certain nombre de noyaux flavanes ont été ouverts (Processus B et C). A signaler enfin que la déshydratation au détriment de deux OH appartenant à deux noyaux A consécutifs (fig. 19) peut être à l'origine de la création de groupements xanthyliums dont la contribution à la couleur des vins rouges se manifeste par une absorption carac-

([1]) (Ribereau-Gayon, 1973).

téristique entre 400 et 500 nm. L'oxydation ménagée des vins oriente vraisemblablement les réactions vers la formation de C_4 carbocations et tend à faciliter les polymérisations qui en découlent (fig. 18).

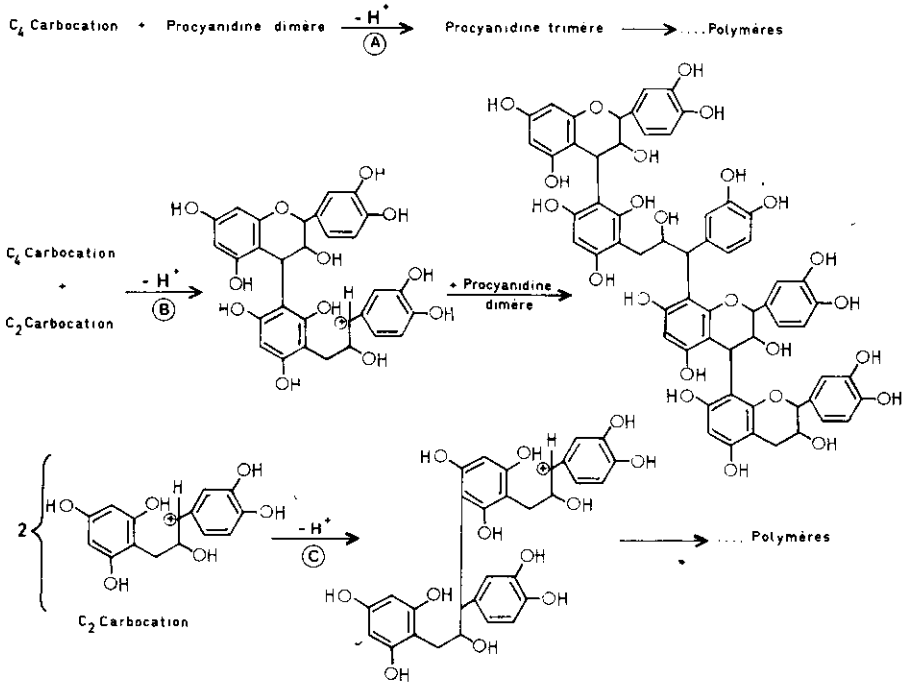


Fig. 18 – Polycondensation des procyanidines du vin. (D'après Glories, 1978).

(A) : Mécanisme hypothétique de formation de polymères par condensation de C_4 carbocations et de procyanidines dimères.

(B) : Mécanisme hypothétique de formation de polyflavanes par condensation mixte de C_4 et de C_2 carbocations avec les procyanidines dimères.

(C) : Mécanisme hypothétique de formation des phlobaphènes par condensation en milieu acide de C_2 carbocations provenant de l'ouverture de l'hétérocycle des flavanes 3-ol.

Lorsque l'oxydation est importante les procyanidines peuvent donner lieu à la formation d'intermédiaires à structures semi-quinoniques, par oxydation des résidus catéchol et phloroglucinol dans les polymères déjà formés, ce qui débouche sur la formation de polycondensats insolubles qui précipitent. Ce processus rend notamment compte de l'élaboration avec le temps de la teinte brune des vins vieux et de l'accroîssement de l'absorption dans la région 400-500 nm, caractéristique des structures polyquinoniques (fig. 14 et 17).

Il est probable que ce mécanisme privilégie l'établissement de liaisons entre noyaux B et positions nucléophiles 6 et 8 d'autres unités flavanes, comme dans le cas de la formation des théarubigines du thé (fig. 17).

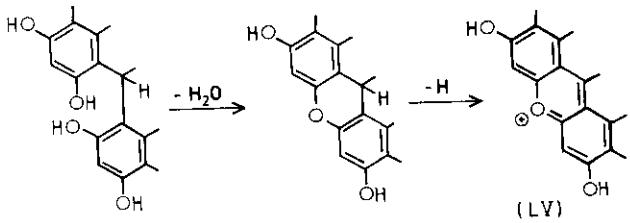


Fig. 19 — Formation des groupements xanthylium au cours de la polycondensation des tanins du vins rouge. (Somers, 1971).

(LV) : Groupement xanthylium formé par déshydratation puis oxydation d'un flavène intermédiaire.

Bien que la réalité soit encore plus complexe il y a tout lieu de croire que l'ensemble de ces trois mécanismes se développent simultanément dans la première phase du vieillissement, néanmoins après la mise en bouteille on peut supposer que l'évolution des fractions polymérisées, dans des conditions limitées d'oxydation, sera plus lente et débouchera sur la formation de tanins très polycondensés dépourvus d'astringence. Dans le cas où le vin est riche en procyanidines oligomères les réactions seront plus rapides et produiront des tanins moins condensés dont certaines fractions manifesteront encore de l'astringence (Glories, 1978).

PIGMENTS POLYMERISES DES VINS ROUGES

Au cours du vieillissement, les pigments anthocyaniques issus du raisin (λ_{Max} = 520 nm) sont transformés avec formation de polymères rouges qui, au bout de la première année, contribuent déjà pour plus de 50 % à la couleur résultante des vins.

Ces nouvelles formes pigmentaires sont beaucoup moins sensibles aux modifications du pH et manifestent une plus grande résistance à la décoloration par l'anhydride sulfureux que les anthocyanines initiales. Au cours du veillissement le maximum d'absorption à 520 nm tend à disparaître tandis que l'absorption s'accroît à 420 nm, ce qui explique que les vins vieillissants voient leur couleur évoluer du rouge vers le rouge orangé (tuilé).

Des expériences modèles ont montré que les anthocyanines se combinent avec les tanins du vin; Ribereau — Gayon (1974) signale en effet qu'en présence de tanins et en l'absence de O_2 la teneur en anthocyanines qui est initialement de 350 mg/l, est abaissée à 135 mg/l. Lorsque en plus le mélange est oxydé, cette teneur n'est plus que de 60-70 mg/l.

On pense généralement à la suite des travaux de Somers (1971), de Ribereau — Gayon (1973) de Timberlake et Bridle (1976) que les anthocyanines du vin peuvent se condenser avec les procyanidines pour former des combinaisons stables (fig. 20). Les molécules d'anthocyanines (malvidine 3 β glucoside (LVI) par exemple) sous forme de cations flavyliums peuvent se combiner aux positions

nucléophiles 6 ou 8 d'une procyanidine dimère pour former un flavène oligomère (LVII) qui, par oxydation, peut être à son tour transformé en sel de flavyliym (LVIII) (fig. 20).

D'autre part, la formation de C_4 et C_2 carbocations à partir des procyanidines et des catéchines peut entraîner suivant les conditions de milieu leur combinaison avec des molécules d'anthocyanines sous forme pseudobase (LIX). Les dimères flavanyl flavanes ainsi formés (LX) et (LXI) ainsi que les anthocyanines polymérisées, en provenance de la condensation flavylium polymères (LXVIII) plus anthocyanines pseudobases (LVIII) font partie avec les cations flavylium polymérisés (LIX) des anthocyanes combinés et polymérisés qui contribuent à l'évolution lente de la couleur rouge du vin vers le rouge tuilé des vins vieux.

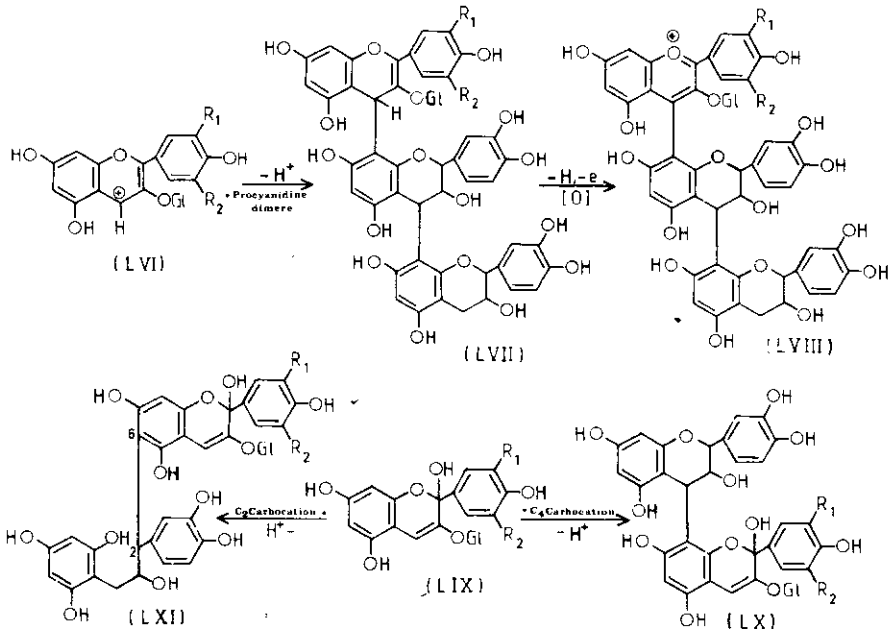


Fig. 20 — Polycondensation des anthocyanines avec les procyanidines du vin rouge. (D'après Glories, 1978).

(LVI) $R_1 = R_2 = OCH_3$; Malvidine 3 β glucoside
(LVII) Flavène 2 oligomère
(LVIII) Sel de flavylium oligomère
(LIX) Pseudobase de la malvidine 3 β glucoside
(LX) et (LXI) Flavanyl flavanes dimères

IV. ACTIONS DES TANINS SUR LES PROTEINES

ACTIONS DES TANINS SUR LES PROTEINES INSOLUBLES

1) Collagène

Avant d'aborder le processus du tannage à proprement parler, il nous paraît important de décrire brièvement la structure du collagène.

Le collagène est une protéine fibreuse qui, chez les vertébrés supérieurs, représente environ 25 % des protéines totales. La structure primaire est caractérisée par une teneur importante en glycocolle (1/3 des aminoacides (a.A) en proline et en hydroxyproline (1/4 des a.A)) et une quantité moindre de lysine et d'hydroxylysine. A noter que l'hydroxylysine ne se rencontre que dans le collagène et l'élastine. Les fibres de collagène ont un diamètre de 1 à 12 μm et sont composées de fibrilles parallèles ayant un diamètre de 0,3 à 0,5 μm formées à leur tour par des faisceaux de molécules parallèles de tropocollagène dont les extrémités se chevauchent régulièrement tous les 640 Å. La molécule de tropocollagène dont le P.M. atteint 300 000 daltons est constituée par une triple hélice formée de chaînes α dont la répétition tous les 280 nm confère à cette molécule une grande tenacité. La disposition des fibres de collagène varie selon la fonction biologique du tissu conjonctif. Dans les tendons les fibres de collagène sont disposées suivant une structure qui présente peu d'élasticité, au contraire dans la peau des ruminants les fibrilles de collagène forment un entrelacement de feuillets qui lui confèrent à la foi une bonne résistance mécanique et une grande souplesse. Le cuir peut donc être considéré comme du collagène à l'état tanné; cette transformation est caractérisée par la combinaison irréversible du collagène avec la substance tannante ce qui a pour effet de le rendre résistant à l'eau et aux enzymes protéolytiques (trypsine, collagénase).

D'autre part, cette stabilisation s'accompagne d'une bonne tenue à la chaleur et aux agents de gonflement.

2) Tannage des peaux

L'action des tanins végétaux, hydrolysables ou condensés, sur le collagène, est à la base de l'opération du tannage au cours de laquelle les molécules de tanins se fixent aux régions amorphes de la structure fibrillaire. La première étape selon Gustavson (1956) dépend étroitement de l'association des groupements phénoliques avec certains groupements spécifiques des régions amorphes; cette étape serait accompagnée de la formation de nouveaux liens susceptibles de s'établir entre molécules de tanins déjà fixées et de nouvelles molécules de ces substances jusqu'à ce que l'espace entre les chaînes de collagène soit rempli. L'accès aux groupements spécifiques est sans doute facilité en milieu acide par la formation de groupements cationiques, au niveau des résidus lysine et hydroxylysine, ce qui a pour effet de faciliter le gonflement des fibres. Dans la pratique, on considère que les fibres sont tannées lorsque le collagène a fixé environ la moitié de son poids en tanin.

Une substance présente les propriétés d'un tanin dans la mesure où elle est capable de pénétrer dans l'espace interfibrillaire, ce qui suppose aussi qu'elle a des dimensions suffisantes pour ponter les chaînes de protocollagène en différents endroits de leur structure.

Un certain nombre de composés polyphénoliques de P.M. compris entre 500 et 3 000 semblent satisfaire à ces critères.

La formation des associations tanins-protéines dépend principalement de la facilité avec laquelle s'échangent des liaisons hydrogène entre groupements peptidiques et fonctions phénols (LXV et LXVI) (fig. 21) ce qui n'exclue pas pour autant la contribution des charges électrostatiques portées par des groupements amide et amine rattachés à des résidus amino acides polaires.

La fixation quantitative des molécules de tanins par des polymères de synthèse, résine formol-urée (LXII), polyvinyl pyrrolidone (LXIII) qui ne contiennent que des groupements amide substitués contribue de manière expérimentale à renforcer l'idée de l'importance du rôle des liaisons hydrogène.

Le cas du Nylon 6-6 (LXIV) est particulièrement intéressant à cet égard; en effet, la configuration de cette polyamide est telle que l'échange de liaisons H entre groupements peptidiques appartenant à des chaînes voisines empêche l'établissement de liaisons suffisamment stables avec les OH phénoliques des molécules de tanins, ce qui se traduit par l'absence d'association.

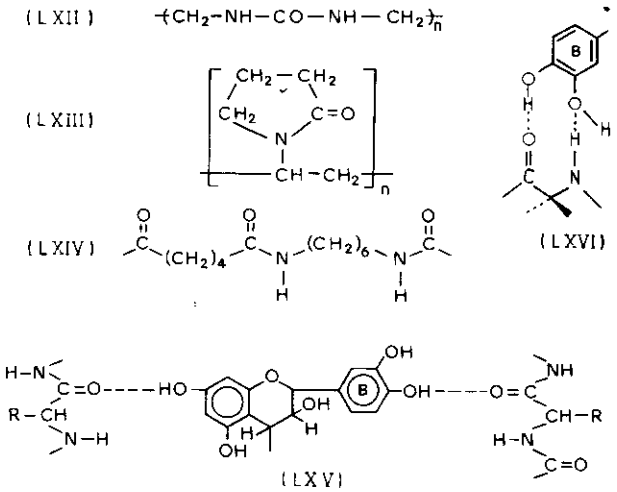


Fig. 21 — Polymères de synthèse présentant une affinité pour les tanins.

(LXII) : Résine formol-urée
(LXIII) : Polyvinyl pyrrolidone (P.V.P)
(LXIV) : Nylon 6-6
(LXV) et (LXVI) : Modèles d'échange de liaisons Hydrogènes entre groupements phénoliques des unités flavanes 3-ol et chaînes polypeptidiques.

Au contraire, si on crée une certaine irrégularité dans la structure des chaînes on facilite la fixation des molécules de tanins. Comparativement au Nylon 6-6 le copolymère dissymétrique acide adipique-hexaméthylène diamine (60 %) + caprolactane (40 %) retient les tanins de manière irréversible. Il est donc raisonnable de penser que les groupements phénoliques se comportent comme autant de points d'encrage vis-à-vis des groupements peptidiques accessibles, appartenant à des structures protéiques. (Gustavson, 1956).

ACTION DES TANINS SUR LES PROTEINES SOLUBLES

L'astringence des tanins s'identifie à la fois avec leur aptidude à précipiter les mucoprotéines de la salive et avec leur effet inhibiteur sur l'activité de diverses enzymes, ce qui éclaire d'un jour nouveau leur influence sur les processus digestifs. A noter plus particulièrement leur action sur la digestion pancréatique et sur les processus de détoxification ce qui a pour effet d'entraîner une déficience grave en méthionine.

Il est important de pouvoir évaluer de façon objective l'importance de ces effets afin d'optimiser la valeur nutritive des céréales et des fruits ainsi que les qualités organoleptiques des boissons telles que le thé, le vin, le cidre ou encore la bière. Différentes méthodes basées sur la précipitation de la gélatine et de la caséine ou encore la fixation par la poudre de peau ont été employées pour suppléer aux difficultés rencontrées avec la précipitation des protéines de la salive. Récemment Bate-Smith (1973) a proposé une méthode d'appréciation spectrophotométrique de l'effet tannant basée sur la détermination de l'hémoglobine résiduelle à 578 nm, à la suite de la précipitation des protéines du sang hémolysé. Cette méthode présente l'avantage de comporter un domaine de précipitation étroit caractérisé par un seuil et une fin de précipitation rapprochés. La précipitation des protéines du sang est linéaire pour des concentrations en acide tannique comprises entre 0,15 et 0,40 mg/l. D'autre part, cet auteur a été amené à introduire la notion d'astringence relative (A.R.) qui est représentée par le rapport des concentrations en acide tannique et en tanin équivalent,nécessaires pour atteindre le même degré de précipitation.

Plus récemment, Haslam (1974) a insisté sur l'intérêt que pouvait présenter la β glucosidase pour la détermination de la concentration en tanin nécessaire pour précipiter une quantité prévue d'enzyme (tableau III). Ni la β D glucogalline (βD galloylglucose) ni la (–) épicatéchine ne précipitent la β glucosidase dans ces conditions. Par contre, la configuration du βD pentagalloylglucose (b) (fig. 2) est optimale et apparaît comme étant la mieux adaptée parmi les esters galloylés du glucose, à la précipitation des protéines.

Si l'on affecte un P.M. de 120 000 d. à l'enzyme, la stœchiométrie du complexe enzyme-β D pentagalloylglucose est telle qu'une mole d'enzyme peut fixer approximativement 20 moles d'ester galloylé. Ce complexe peut être dissocié par traitement à l'acétone ce qui permet de restaurer plus de 75 % de l'activité initiale. L'accroissement de la capacité tannante bien qu'approximativement

dépendant du P.M. des tanins n'est pas pour autant proportionnel au nombre de groupements galloylés portés par chaque molécule. (Haslam, 1974).

Il est intéressant en effet d'observer que les tanins naturels de Chine ou de Sumach (VII) (fig. 2) ne présentent pas une capacité de complexation supérieure à celle du β D pentagalloylglucose. On peut donc penser que la capacité tannante dépend en premier lieu d'un certain nombre de sites spécifiques, géographiquement séparés, capables de lier les protéines. Dans la série des esters galloyles les sites sont vraisemblablement confondus avec les groupements galloylés cependant que la capacité de réticulation des protéines nécessite au minimum la présence de deux groupements par molécules de sucre. Cette remarque d'après Haslam (1974) permet de comprendre pourquoi les tanins naturels de Chine et de Sumach (VII — fig. 2) ont la même capacité tannante que le β D pentagalloylglucose (tableau III).

Ce même raisonnement s'applique aux procyanidines dimère (B_2) et trimère (C_1) à la différence près que les sites à prendre en considération sont les groupements o. diphénols de chaque molécule (LXVI) (fig. 21). Dès lors, il est aisé d'imaginer que de telles associations puissent se réarranger en feuillets plissés β

TABLEAU III

Précipitation de la β glucosidase par différents polyphénols (Haslam, 1974)

	10^7x concentration en polyphénol (moles) pour la précipitation de la β glucosidase (2 mg, approx. 50 % précipitation)	P.M. des polyphénols
3,6 digalloylglucose	136	484
β 1, 3, 6 trigalloyl D glucose	33,9	636
2, 3, 4, 6 tétragalloyl D glucose	13,6	788
β méthyltetragalloyl D glucoside	16,4	802
β pentagalloyl D glucose	4,4	940
Gallotanins de Chine et de Sumach (VII) (n = 0, 1 ou 2) (structure : heptagalloylglucose)	4,3	1 244
Gallotanin de Turquie (structure hexagalloylglucose)	6,0	1 092
Gallotanin de Tara (structure acide tetragalloylquinique	20,6	794
Procyanidine B_2	11,6	578
Procyanidine C_1	31,0	866

analogues à ceux qui existent dans les kératines (Haslam, 1974). Encore faudrait-il tenir compte de la répartition hélicoïdale des groupements o. diphénols dans les procyanidines oligomères de type B; une telle configuration doit certainement influencer l'initiation du processus de réticulation et à terme la structure des associations protéines-tanins. (Haslam, 1977).

ACTION DES TANINS SUR LES PROTEINES IMMOBILISEES

Il est important de se souvenir que la grande majorité des associations tanins protéines en dehors des associations tanins-collagène, présentent un caractère réversible. En effet, les complexes tanins-protéines peuvent être solubilisés par abaissement du pH tandis que l'on peut libérer les tanins par précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique. Néanmoins, cette récupération demeure incomplète. Par ailleurs si l'on immobilise les protéines sur une matrice inerte l'espacement des groupements liant les molécules de tanins sera suffisamment grand pour faciliter leur diffusion. L'immobilisation de sérum albumine bovine sur matrice de Sepharose (J.E. Hoff, 1977) permet ainsi de lier relativement à pH 4,0 différents tanins tandis que des composés phénoliques simples a. gallique, a. chlorogénique ou encore catéchol ne sont pas complexés par la protéine, dans ces conditions. Les complexes tanins-protéines formés sont aisément dissociés par les solvants organiques tels que méthanol, mélange diméthylformamide — tampon acétate pH = 4,0 ce qui permet d'éluer les tanins relâchés et de les séparer des composés polyphénoliques plus simples. Le fractionnement peut être contrôlé par spectrophotométrie U.V. ou par colorimétrie.

A l'inverse, l'immobilisation des gallotanins par couplage covalent sur aminohexylcellulose permet d'adsorber et de séparer spécifiquement différentes protéines (Nunokawa, 1977). Le procédé a été utilisé récemment au Japon pour éliminer le trouble protéique résultant de la pasteurisation du saké.

V. ASTRINGENCE ET TROUBLES NON BIOLOGIQUES DE NATURE TANNOPROTEIQUE

ASTRINGENCE ET AMERTUME DES BOISSONS ALCOOLISEES

A l'échelle moléculaire le phénomène d'astringence (Lea et Timberlake, 1978) découle de la formation non spécifique et en partie irréversible de liaisons hydrogène entre groupements o. diphénols et protéines de la cavité buccale ce qui a pour effet de provoquer une sensation désagréable de sécheresse au niveau de la langue et de la bouche.

Dans le cas des cidres il a été montré que l'équilibre entre les sensations d'amertume et d'astringence dépend étroitement de l'équilibre qui s'établit entre procyanidines oligomères (1 à 5 unités) et procyanidines polymères (6 à 10

unités) (Lea et Arnold, 1978). De même dans les vins Singleton et Noble (1976) ont récemment suggéré que l'équilibre entre amertume et astringence est conditionné par la concentration en procyanidines, un accroissement de la teneur en ces substances ayant pour effet de masquer l'amertume.

L'amertume, considérée comme relevant d'une interaction entre molécules polaires et lipides membranaires des cellules gustatives dépend avant tout de la solubilité des substances amères. Dans le cas des procyanidines, seules les petites molécules d'oligomères sont suffisamment solubles pour pouvoir traverser la membrane lipidique et accéder aux récepteurs responsables de la sensation d'amertume. Des considérations analogues permettent aussi de comprendre le rôle de l'alcool dans un milieu aqueux contenant des tanins. L'alcool facilite la pénétration des procyanidines oligomères ce qui tend à accroître la sensation d'amertume mais en même temps son action s'exerce sur les liaisons hydrogène qu'échangent les groupements polyphénols et les protéines, ce qui entraîne une diminution de la sensation d'astringence. (Lea et coll., 1978).

Les procyanidines natives sont plus ou moins amères et astringentes, leur oxydation au travers du processus de maturation des fruits ou au cours des transformations technologiques qui s'en suivent provoque la formation de polymères dont les propriétés organoleptiques sont beaucoup moins marquées ([1]). De même on peut aussi penser que l'oxydation d'une petite quantité de procyanidines sous forme quinonique peut donner lieu à l'établissement de liaisons hydrogène avec les procyanidines natives non oxydées, ce qui pourrait entraîner la formation d'agrégats dont l'amertume et l'astringence seraient considérablement affaiblies (Lea et Timberlake, 1978). De tels mécanismes doivent prendre une part importante aux processus de vieillissement et d'amélioration des qualités organoleptiques des boissons alcoolisées.

FORMATION DES TROUBLES TANNOPROTEIQUES DE LA BIERE

La formation des troubles non biologiques de la bière relève d'un mécanisme complexe dans lequel interviennent à la fois des composés polyphénoliques et certaines fractions protéiques. Il est important de remarquer d'emblée que la formation des troubles tannoprotéiques n'est pas directement imputable à des tanins préexistants malgré l'identification récente dans la bière de procyanidines dimères B_3 et B_4 et d'une procyanidine trimère C_1. En effet, dans une bière limpide la teneur en protéines est suffisamment élevée pour provoquer leur précipitation. Par contre, il existe un ensemble de composés polyphénoliques de P.M. relativement bas qui coexistent avec les protéines de la bière et qui présentent une grande affinité pour la polyvinylpyrrolidone (LXIII) ou P.V.P. de P.M. = 700 000 d. Cette association se traduit par la formation d'un précipité insoluble à partir seulement de quelques milligrammes de ces composés polyphénoliques auxquels on donne maintenant le nom de tannoïdes (Chapon, 1961).

([1]) (Goldstein, 1963).

Cette réaction admet une stœchiométrie bien définie qui met en évidence l'existence d'un maximum de saturation des carbonyles disponibles apportés par la P.V.P; un excès de réactif entraîne la redissolution du précipité formé à la suite d'une redistribution des tannoïdes au niveau des sites d'association.

Il est évident que certains composés polyphénoliques simples sont lentement transformés en tannoïdes (T) puis en tanins. Cette polycondensation spontanée dans laquelle l'oxydation et le milieu jouent un rôle important est à l'origine de la perte de stabilité colloïdale des bières au cours de leur conservation. Les polymères ainsi formés manifestent des propriétés tannantes qui entraînent l'apparition d'une phase dispersée tanins-protéines dont la solubilité est plus faible au voisinage de 0 °C qu'à température ambiante et qui constitue le « trouble au froid ».

Lorsque le degré de polycondensation des tannoïdes s'accroît la réversibilité du phénomène diminue tandis que la quantité des substances insolubles augmente ce qui se traduit par la formation d'un trouble tannoprotéique permanent. Toutefois une partie seulement des protéines de la bière semble participer aux processus de formation des troubles, il s'agit de « protéines sensibles » (P) qui en s'associant aux tannoïdes (T) donnent lieu à la formation de complexes réversibles tanins-protéines (PT). Il s'agit plus vraisemblablement de produits de dégradation des protéines dont le P.M. se situe entre 10 000 et 20 000 d. qui sont sensibles à la précipitation par les gallotanins.

L'existence d'un équilibre tannoïdes-protéines répondant au modèle schématisé (fig. 22) a été nettement mis en évidence au cours de l'extraction en milieu aqueux des tannoïdes d'orge et de malt ([1]). Ce modèle rend plus particulièrement compte, de manière très simplifiée, des principaux facteurs qui affectent la quantité des tannoïdes solubles (T) et des protéines insolubles (Pin), la quantité des protéines solubles (Psol.) et des peptides, ainsi que l'affinité des tannoïdes pour les différentes protéines. La solubilisation des protéines par les endopeptidases qui apparaît comme un processus réversible est en fait elle, aussi en partie, sous la dépendance de réactions réversibles. D'autre part, il est à peu près certain

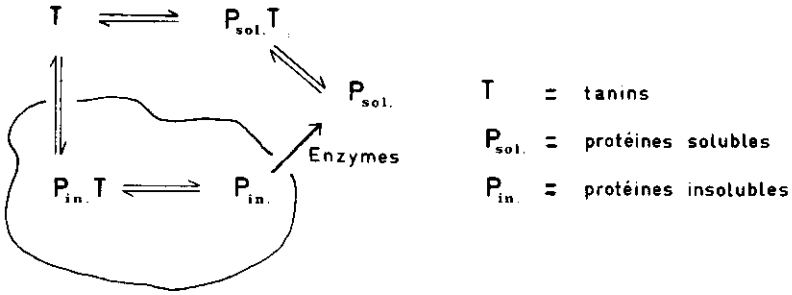


Fig. 22 — Modèle d'équilibre entre tannoïdes, protéines solubles et insolubles régissant l'extraction des tannoïdes de l'orge et du malt. (Jacobsen, 1974).

([1]) (Jacobsen, 1974).

qu'il n'y a pas de relation étroite entre la teneur en anthocyanogènes et la potentialité de trouble de la bière, c'est pourquoi il convient d'être très circonspect vis-à-vis des traitements de prévention et de stabilisation utilisant les agents d'adsorption tels que Nylon 6-6, Polyclar AT, bentonite ou encore gel de silice.

De tels traitements peuvent, sans discernement, entraîner parfois des modifications préjudiciables d'amertume. Il a été montré en effet que des quantités excessives de Nylon 6-6 peuvent éliminer en même temps que les anthocyanogènes la presque totalité de l'amertume due aux isohumulones.

A l'inverse, cependant que les enzymes protéolytiques tendent à réduire de manière efficace la teneur en protéines sensibles de la bière, laissant les tannoïdes inchangés, le Nylon 6-6 et le Polyclar AT éliminent respectivement 95 % et 80 % des tannoïdes sans modifier pour autant les protéines.

VI. CONCLUSIONS

Les développements récents de l'analyse structurale grâce aux acquisitions spectaculaires de la spectrophotométrie ^{1}H et ^{13}C RMN ont permis de progresser rapidement dans la connaissance de la structure des substances naturelles les plus complexes. L'étude des tanins se situe précisément dans ce contexte. Les progrès réalisés dans la connaissance des structures des tanins ellagiques et catéchiques permet à l'heure actuelle d'aborder avec plus de rigueur l'étude des transformations auxquelles participent ces substances.

Les processus de tannage des protéines basés fondamentalement sur l'échange de liaisons hydrogène entre fonctions phénoliques et peptidiques sont le plus souvent compliqués par la formation de combinaisons entre produits d'oxydation de nature quinonique et groupements aminés des protéines. Le rôle de l'oxydation dans l'évolution des associations puis des combinaisons tanno-protéiques revêt de ce fait une importance capitale illustrée notamment par les transformations oxydasiques développées au cours de la fermentation du thé ou encore par l'autoxydation des tannoïdes de la bière.

Dès lors, les critères des tanins réservés à des substances végétales de P.M. compris entre 500 et 3 000, dont un certain nombre de structures sont maintenant parfaitement élucidées, doivent être élargis avec prudence à divers polymères d'origine polyphénolique capables de former des associations puis des combinaisons covalentes irréversibles avec les protéines.

La connaissance de ces processus présente un intérêt immédiat à la fois pour l'amélioration de la stabilité colloïdale de boissons telles que le vin, le cidre et la bière, pour l'optimisation de la valeur nutritive de certaines céréales et pour la fixation des qualités organoleptiques de divers fruits.

Il convient en effet de rappeler que les processus de brunissement enzymatiques ou non qui accompagnent la formation de structures polyquinoniques contribuent au développement des réactions de Strecker et à la formation de

dérivés carbonylés, par condensation avec des amino acides libres. Ces processus interviennent pour une large part dans la formation des théarubigines et dans l'élaboration de l'arôme du thé.

On peut donc conclure en disant que si les tanins naturels n'ont pas trouvé jusqu'à présent d'applications importantes en dehors du tannage des peaux, de la fabrication de produits adhésifs ou encore d'agents de floculation pour le traitement des eaux il n'en est pas moins vrai qu'une meilleure connaissance des mécanismes de polycondensation, d'oxydation et de combinaison avec les protéines revêt un intérêt considérable pour l'amélioration de la valeur nutritive et des qualités organoleptiques d'un certain nombre de produits alimentaires qui les incorporent.

BIBLIOGRAPHIE

BATE-SMITH E.C. (1956) – *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **27**, 365.

BATE-SMITH E.C. (1973) – *Phytochem.*, **12**, 907-912.

BATE-SMITH E.C. (1978) – *Phytochem.*, **17**, 1945-1948.

BROWN A.G., EYTON W.B., HOLMES A., OLLIS W.D. (1969) – *Phytochem.*, **8**, 2333-2340.

CHAPON L., CHOLLOT B., URION E. (1961) – *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 429-442.

GLORIES Y. (1978) – *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Université de Bordeaux II, n° **18**, 195 p.

GOLDSTEIN J.L., SWAIN T. (1963) – *Phytochem.*, **2**, 371-383.

GUSTAVSON K.H. (1956) – Ed., *The Chemistry of tannins processus*, Academic Press, 403 p.

HARBORNE J.B., MABRY T.J., MABRY H. (1975) – Ed. *The flavonoïds*, Chapman & Hall, 1 204 p.

HASLAM E. (1967) – *J. Chem. Soc.* (C), 1 734 et 2 381.

HASLAM E. (1974) – *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 2 663-2 671.

HASLAM E. (1974) – *Biochem. J.*, 139, 285-288.

HASLAM E., OPIE C.T., PORTER L.J. (1977) – *Phytochem.*, **16**, 99-102.

HASLAM E. (1977) – *Phytochem.* **16**, 1 625- 1 640.

HOFF J.E., SINGLETON K.I. (1977) – *J. Food Sci.*, **42**, 1 566-1 569.

JACOBSEN J., LIE S., CHAPON L. (1974) – *MBAA Technical Quarterly*, **11**, 255-261.

JOCHIMS J.C., TAIGEL G., SCHMIDT O.T. (1968) – *Liebigs Annalen*, 717-169.

LEA A.G.H., TIMBERLAKE C.F., ARNOLD G.H. (1978) – *J. Sci. Fd. Agric.*, **29**, 471-492.

MARINI-BETTOLO G.B. (1975) – *Assemblée annuelle du Groupe.* Polyphénols - Gargnano sul Garda, 1-25.

MAYER W., GÖRNER A., ANDRÄ K. (1977) – *Liebigs Ann. Chem.*, 1 976-1 986.

MAYER W. (1977) – *Das Leder*, **28**, 18-24.

NUNOKAWA Y., MIKAMI S., TOSA T., CHIBATA I. (1977) – *Hokko Kaguhu Zasshi*, **55**, 343-348.

RIBEREAU-GAYON P. (1973) – *Vitis,* **12**,119-142.

RIBEREAU-GAYON P. (1974) – *Chemistry of red wine color,* ACS Symposium n° **137**, 50-87.

ROUX D.G., FERREIRA D., HUNDT H.K.L., MALAN E. (1975) – *Applied Polymer Symposium,* n° 28, 335-353.

SANDERSON G.W., RANADINE A.S., EISENBERG L.S., FARRELL F.J., SIMONS R., MANLEY C.H., COGGON P. (1976) – *Contribution of polyphenolic compounds to the taste of tea,* ACS Symposium Series n° **26**, 14-46.

SEIKEL M.K., HILLIS W.E. (1970) – *Phytochem.,* **9**, 1 115-1 128.

SINGLETON V.L., NOBLE A.C. (1976) – *Wine flavor and phenolic substances,* ACS Symposium n° **26**, 47-70.

SOMERS T.C. (1971) – *Phytochem.,* **10**, 2 175-2 186.

TIMBERLAKE C.F., BRIDLE P. (1976) – *Am. J. Enol. Vitic.,* **27**, 97-105.

WEINGES K., BAHR W., EBERT W., GÖRITZ K., MARX H.D. (1969) – *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe,* **27**, 158-260.

G. JANIN et G. NEPVEU

La qualité des bois

Ce qu'on a demandé autrefois aux forêts était très différent de ce qu'on leur demande aujourd'hui et de ce qu'on leur demandera demain.

M. Plaisance (Guide des forêts de France)

I. INTRODUCTION

L'étude de la qualité des bois consiste notamment à retrouver, dans l'aspect macroscopique sous lequel le bois se présente, les relations qui conditionnent ses bonnes aptitudes technologiques au travers de la structure ordonnée de tous les éléments constitutifs essentiels du plan ligneux : les fibres, les fibres trachéides, les vaisseaux, les rayons ligneux et le parenchyme.

Dans l'ensemble des travaux menés sur l'étude des qualités des bois, les chercheurs ont toujours clairement distingué la structure tubulaire du bois, due aux cellules allongées et rendue compacte par la présence des lignines, l'organisation fibrillaire des parois des fibres, les macromolécules et les molécules qui entrent dans la composition des fibrilles et de l'ensemble des tissus du bois, en montrant qu'elles sont à l'origine des sources de variation des qualités des bois.

La connaissance des propriétés physico-chimiques et chimiques des macromolécules, comme la cellulose, les hémicelluloses, les lignines et les substances phénoliques, dégagées de leur contexte végétal permet en partie de comprendre le comportement du matériau-bois en ce qui concerne :

— l'affinité pour l'eau due à la présence de la cellulose par les relations de sorption et de désorption de l'eau, selon l'état hygrométrique de l'air,

— la résistance mécanique apportée par sa structure fibreuse, par la taille et l'orientation des microfibrilles par rapport à l'axe de ses fibres dans les parois successives, par le degré de polymérisation des chaînes de cellulose et des liaisons chimiques inter-chaînes au niveau des motifs anhydroglucoses constitutifs de ces chaînes,

— la diversité des tissus anatomiques due à des différences de composition chimique entre le bois normal et le bois de tension tenant à la présence de sucres (oses) différents ou aux proportions variées de ces sucres les uns par rapport aux autres,

— la déformation permanente du bois obtenue à chaud liée à la présence relativement plus importante dans la lamelle mitoyenne des fibres des lignines qui sont des macromolécules, polymères du type phénylpropanes ($C_6 - C_3$) tridimensionnelles avec une forte aptitude thermoplastique,

— la résistance du bois de cœur aux agents pathogènes et aux insectes due à la présence de substances phénoliques dérivés du stilbène.

Cependant, ces relations simples entre les propriétés des macromolécules et le comportement des bois n'ont pas toujours leur équivalent dans l'état de nos connaissances actuelles au niveau des qualités de bois définies comme de bonnes aptitudes technologiques.

II. EVOLUTION DU CONCEPT DE QUALITE DES BOIS DEFINITIONS ACTUELLES

La description d'un bois de qualité a toujours tenu compte, d'une part de la forme extérieure sous laquelle se présente l'espèce dont il provient : hauteur, rectitude du fût, défilement ou conicité, finesse des branches, couronnes de nœuds apparents ou nœuds isolés, méplats, et d'autre part de l'aspect interne : présence de bois de cœur différencié par la couleur de l'aubier, la largeur des accroissements annuels, leur texture qui est la proportion de bois final sur la largeur de l'accroissement annuel, le droit fil.

Ses qualités sont aussi considérées en fonction des usages auxquels il est destiné et, dans ce cas, les diverses propriétés de résistance mécanique sont le plus souvent mises en avant [1], et aussi la densité, la dureté, la durabilité et les variations dimensionnelles en fonction de sa teneur en eau.

Le bois a des propriétés qui varient avec chaque individu. Cette variabilité individuelle traduit les influences de tous les facteurs forestiers naturels : sol, climat, hérédité, et facteurs artificiels (interventions humaines dans le travail du sol, densité de plantation, fréquence des éclaircies, élagage artificiel précoce de branches vivantes, fertilisation). Les interventions plus élaborées, comme celles qui concernent le travail de sélection des spécialistes de l'amélioration des arbres forestiers, modifient elles aussi les propriétés, les qualités de productivité et de résistance aux maladies du matériel utilisé.

Les efforts menés dans un but d'amélioration sont limités par l'HETEROGENEITE naturelle du bois à différents niveaux dans l'arbre, hétérogénéité due au rythmes de croissance de l'arbre dans son environnement. En effet, si l'on considère la tige globale dans le sens axial, les élongations de bourgeons apicaux, qui différent chaque année, donnent des hauteurs de pousses annuelles variables. Dans le sens radial, l'assise génératrice du cambium produit des couches successives de cellules dans lesquelles les fibres s'améliorent avec l'âge en augmentant de longueur. Cette croissance se produit dans un environnement chaque année différent (fig. 1).

Au niveau de l'accroissement annuel lui-même apparaît une forte hétérogénéité du point de vue de la densité du bois entre le bois de printemps ou bois initial, et le bois d'été ou bois final. Ces deux étapes correspondent respectivement à la période d'élongation des bourgeons apicaux pour l'arbre avec production de fibres à parois minces et à un arrêt de croissance en hauteur, avec apparition de fibres à parois épaisses. Ces fonctions antagonistes sont réglées par une production d'auxine différente dans le temps.

Les qualités du bois qui se rapportent aux propriétés technologiques souhaitables pour un bois d'œuvre de qualité et pour la majorité des bois dans leurs

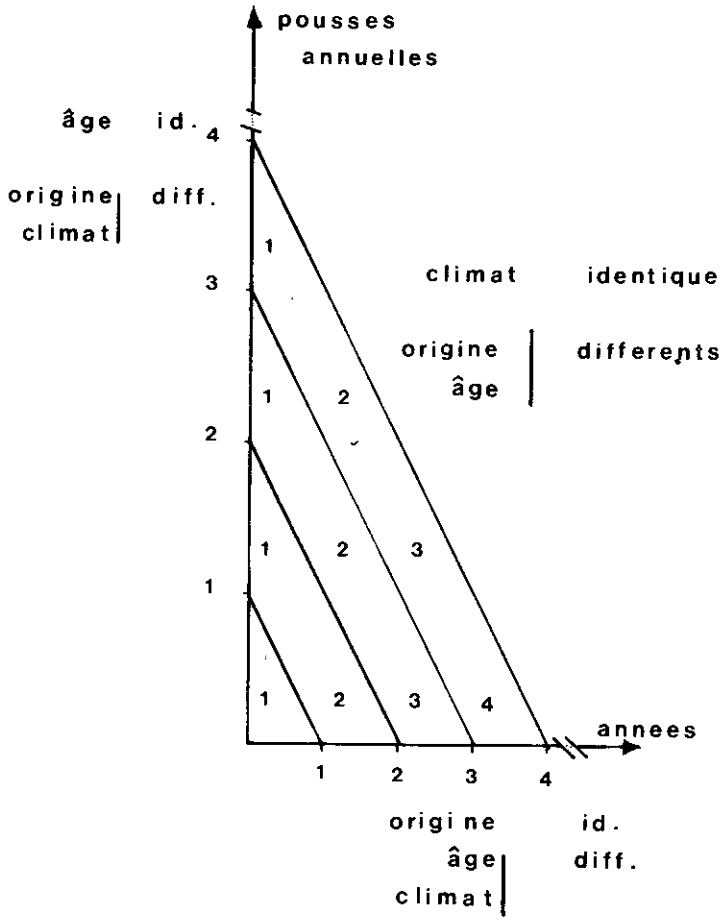


Fig. 1 — Hétérogénéité du Bois suivant les assises génératrices :

— en ordonnée : (âge : identique, origine climat : différents);
— en abscisse : (origine : identique, âge climat : différents);
— en diagonale : (climat : identique, âge origine : différents).

usages futurs peuvent se définir actuellement selon les grandes lignes suivantes par :

— la densité qui fournit une somme d'information résultant de tous les facteurs qui modifient la physiologie de l'arbre. Ce paramètre constitue un des moyens les plus directs de l'appréciation des qualités du bois (et surtout par une densité homogène de valeur faible ou forte selon les usages envisagés et une faible hétérogénéité, c'est-à-dire des variations de densité d'amplitude réduite entre la densité maximum et la densité minimum dans des accroissements annuels : fig. 2 et 3);

— une rétractibilité ou variation dimensionnelle faible,

— une dureté adaptée à l'utilisation prévue, forte pour les bois de charpentes ou de parquets, faible pour les bois de tranchage et de déroulage.

Pour l'aspect plus particulier des bonnes qualités du bois pour l'industrie papetière, le bois doit posséder des fibres de la plus grande longueur — pour l'espèce utilisée — et avec un rendement en fibres après cuisson le plus élevé possible pour une qualité de fibres égale.

Le rôle de la recherche forestière est de trouver les relations existant entre les facteurs forestiers de la production du bois et l'ensemble des qualités du bois, et également de définir les rapports entre la structure du plan ligneux et les qualités du matériau recherchées pour tel ou tel usage.

III. METHODES DE MESURES DES QUALITES DU BOIS

Les méthodes normalisées d'étude des caractéristiques du bois existent dans les principaux pays, et notamment en France, et elles reposent sur l'expérimentation d'éprouvettes de divers types dont l'obtention et l'étude nécessitent la destruction de l'arbre étudié.

De plus, les opérations préalables aux mesures sont longues, s'échelonnent souvent sur une période de deux années : abattage des arbres, transport, sciage, séchage, confection des éprouvettes, conditionnement en humidité et essais de résistances. Enfin le nombre d'échantillons et d'individus examinés est forcément limité par le surcroît de travail qu'occasionnent des comparaisons entre de nombreux individus. Au cours de ces essais, le nombre d'individus étudiés est toujours insuffisant pour prendre en compte la variabilité individuelle qui se manifeste pour tous les critères de qualité du bois.

La nécessité de procéder à des tests NON DESTRUCTIFS est donc apparue très rapidement et bien que les essais sur éprouvettes normalisées continuent à être employés au laboratoire à titre complémentaire, le matériel vétégal d'étude de base est maintenant constitué de carottes de sondage prélevées à la tarière de Pressler (fig. 2) beaucoup plus rapidement et en grand nombre sur des arbres vivants, jeunes ou adultes. Il n'est pas rare de procéder à des campagnes de mesures portant sur 1 500 ou 2 000 échantillons dans une étude comparative de 40 familles différentes.

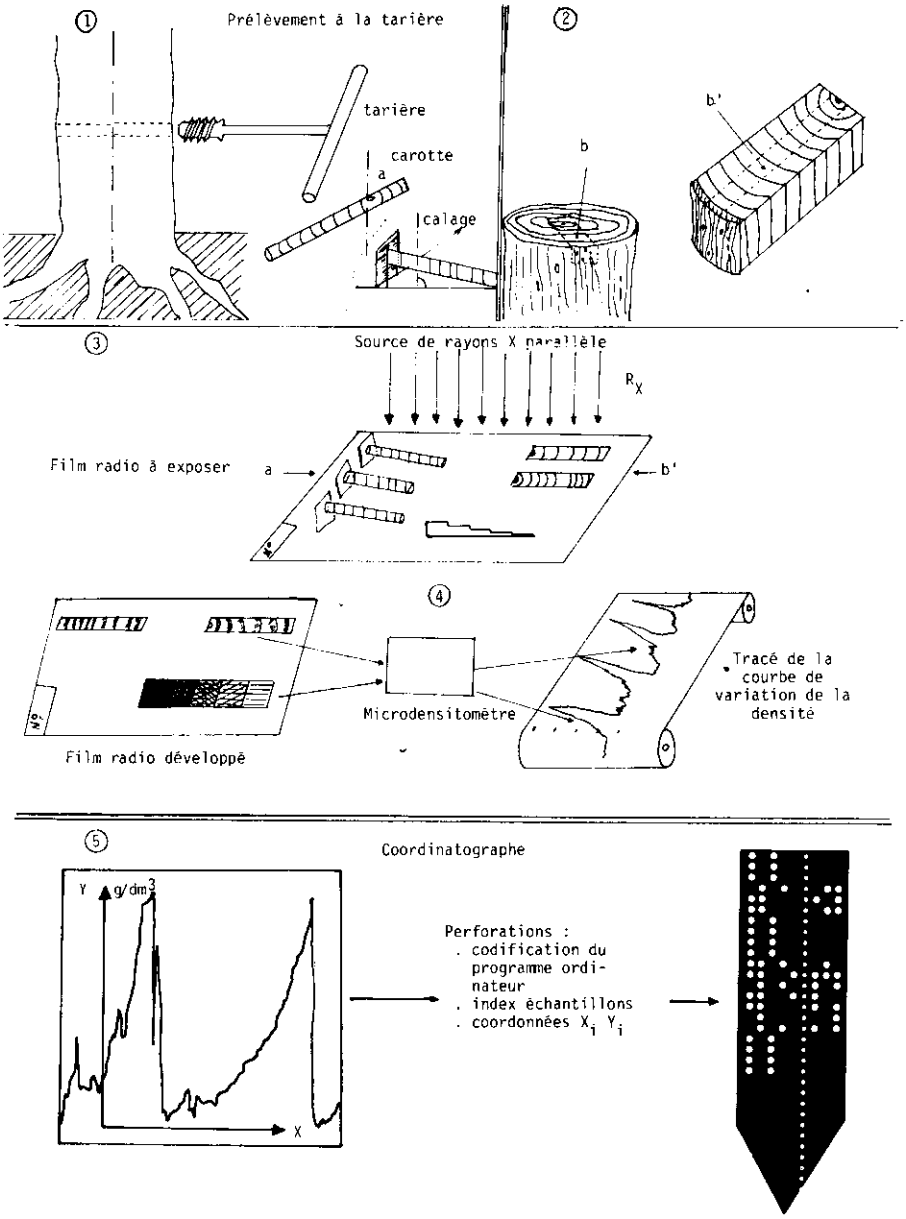


Fig. 2 — Séquences opératoires pour obtenir l'enregistrement du profil de densité du bois :

1. **prélèvement de la carotte de sondage dans l'arbre à l'aide de la tarière de Pressler,**
2. **découpage d'éprouvette radiale,**
3. **exposition à une source de rayons X parallèles des échantillons placés sur une radiographie,**
4. **développement et enregistrement graphique du profil de la densité,**
5. **acquisition des données (Xi, Yi) et codage pour l'ordinateur.**

MESURE DU COUPLE DE TORSION

Cette méthode d'évaluation de la qualité du bois sur des arbres vivants est basée sur l'utilisation d'un torsiomètre qui sert à mesurer les couples de torsion nécessaires pour enfoncer une tarière de Pressler à une profondeur donnée à l'intérieur de l'arbre.

Ce couple de torsion exprime la dureté du bois sondé et se trouve lié très fortement à la densité par des coefficients de corrélation de 0,90*** à 0,94** selon les modalités [2]. Il permet aussi de choisir directement en forêt un individu ayant une densité et des caractéristiques voisines de la moyenne d'une parcelle donnée ou de sélectionner des arbres supérieurs du point de vue de la densité du bois.

Cette information se fait évidemment dans le même temps que le prélèvement de l'échantillon de bois dans l'arbre sous forme de carotte de sondage.

MESURE DES VARIATIONS DIMENSIONNELLES : LA RETRACTIBILITE

La variation de la teneur en eau d'un bois au-dessous de 30 %, qui est le point de saturation des fibres, entraîne des variations dimensionnelles du bois. La méthode d'évaluation repose sur la mesure du diamètre d'une même carotte de sondage dans le sens axial et tangentiel placée entre les mâchoires d'un microcapteur d'épaisseur avec la précision du micron.

Cette méthode dépasse en précision les méthodes de mesure du retrait en vigueur jusqu'ici. En effet elle permet, d'une part d'obtenir une valeur moyenne par individu, faisant intervenir des mesures d'épaisseur au pas de 1/4, 1/2, 1 ou 2 mm au long de l'échantillon, et d'autre part de traiter un grand nombre d'individus pour tenir compte de la variabilité du caractère mesuré en fonction des facteurs forestiers, au même degré d'humidité ou à des degrés d'humidité différents.

MESURE DE LA DENSITE DU BOIS ET DE L'HETEROGENEITE PAR LA METHODE AUX RAYONS X

Cette méthode utilise une source de rayons X mous de grande longueur d'onde émis sous une faible tension accélératrice, à une grande distance (2,50 m) sur des carottes de sondage placées sur une radiographie. A cette distance la dose de rayons X reçus est uniforme sur la surface du film utilisé, elle autorise donc une analyse quantitative de la densité du bois par exploration densitométrique de la radiographie après son développement. De plus le fil du bois est parallèle aux rayons X, et l'on obtient des images nettes de tous les accroissements annuels contenus dans l'échantillon (fig. 2). Après développement, l'enregistrement des variations de la densité se fait à l'aide d'un microdensitomètre et les valeurs sont ensuite codifiées et transférées sur un ruban perforé aux fins de calculs.

Les données principales tirées de cette méthode sont : les largeurs de cernes annuels, les composantes de la densité (densité maximum, densité minimum, la densité moyenne après calcul, l'hétérogénéité (densité maximum – densité minimum) et enfin les pourcentages de la largeur du cerne compris entre des niveaux de densité prédéterminés ou les pourcentages de la largeur du cerne supérieurs à des niveaux de densité choisis en fonction de leur importance pour les caractéristiques mécaniques du bois [3 et 4] (fig. 3).

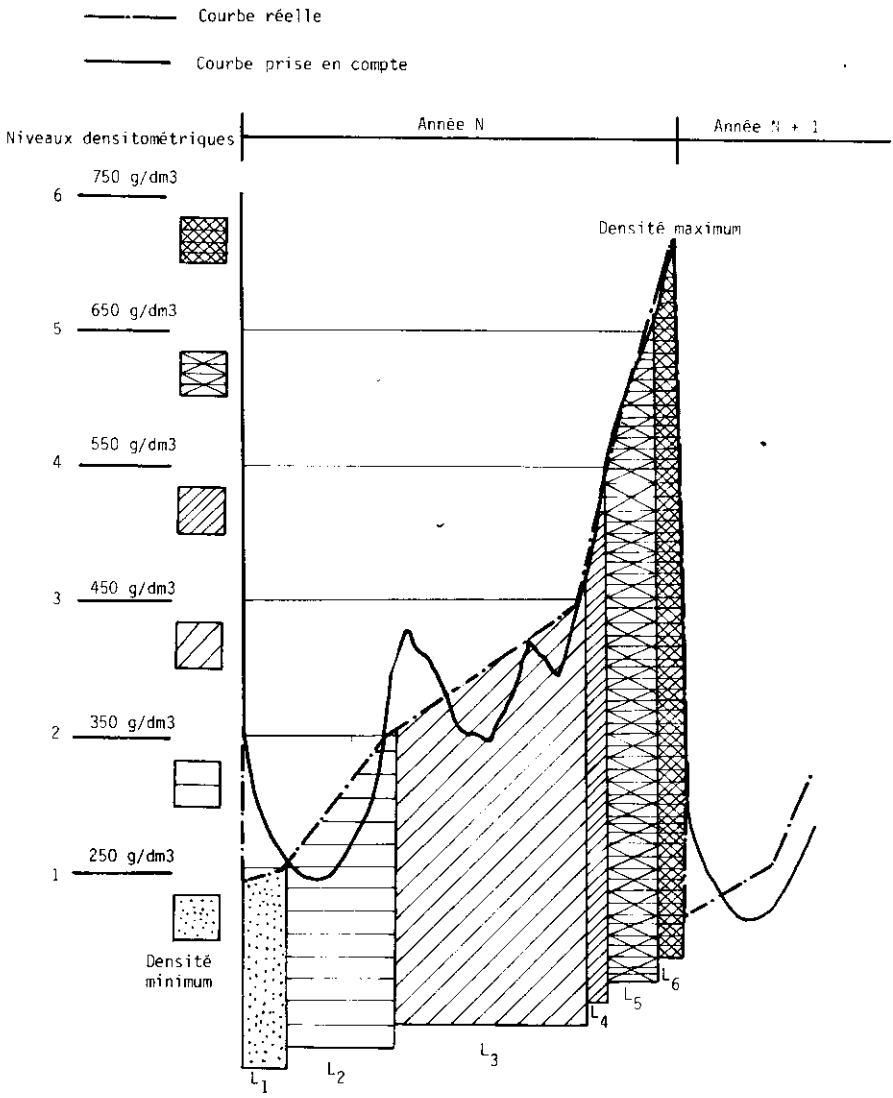


Fig. 3 – Accroissement annuel théorique :

en trait plein : profil réel; en trait d'axe : profil pris en compte dans les calculs. Les largeurs notés L_1, L_2 ... L_6 correspondent aux données du rabotage.

Cette méthode donne également des indications sur les valeurs des densités à l'état juvénile (fig. 4) ou à l'état adulte (fig. 5) dans un même arbre - mère en vue d'établir des corrélations juvéniles-adultes nécessaires aux travaux de sélection précoce chez les descendants.

Toutes ces valeurs discrètes des composantes de la densité peuvent être mises en corrélation avec les autres critères de la qualité du bois aux fins d'explication.

Un des prolongements important de cette méthode concerne la xylochronologie [5 et 6] et la dendroclimatologie [7]. En effet, chaque fois qu'une modification intervient dans l'équilibre biologique d'un arbre, il en résulte des changements de structure anatomique du bois : épaisseur des membranes, diamètre des cavités cellulaires, proportion fibres - vaisseaux, et la somme de toutes ces variations se retrouve dans une donnée physique : la densité du bois. Ainsi, les courbes d'enregistrement de la densité permettent de reconstituer les différentes étapes de la vie de l'arbre au point que certaines de leurs caractéristiques peuvent être considérées comme de véritables révélateurs des modifications de son environnement, non seulement en fonction des facteurs du climat ou du traitement sylvicole comme l'élagage [8], mais aussi suivant les nuisances auxquelles il a été exposé : attaques de parasites, défoliaisons [9] ou fumées industrielles.

MESURE ANATOMIQUE QUANTITATIVE DES CELLULES DU BOIS

Cette mesure repose sur l'analyse de l'image [10] d'une coupe microscopique de 15 μ environ donnée par un microscope, reprise par une caméra de télévision, mise en mémoire point par point avec, pour chacun des points définis, son niveau d'intensité lumineuse. Le traitement de cette image consiste à l'examiner à divers seuils de teintes grises, l'appareil indiquant les surfaces en nombre de points-image dont la densité optique est supérieure ou inférieure à un seuil déterminé ou encore comprise entre deux seuils de densité, pour la totalité du champ de l'image ou une fraction délimitée. Il est également possible d'employer d'autres critères de sélection comme la longueur, la surface ou le périmètre des particules.

L'utilisation originale d'un analyseur d'images pour l'anatomie quantitative du bois, mis au point initialement, en métallographie, pour l'étude des surfaces de différentes phases de cristallisation des alliages et des traitements thermiques des métaux, provient d'une association d'idées entre deux problèmes voisins : appréciation des rapports des surfaces des phases dans le métal et dans le bois, et détermination de la taille des ouvertures des vaisseaux, de leur proportion relative sur le plan de la coupe anatomique, et de l'application à ces deux problèmes du même procédé de mesure.

L'utilisation de cette méthode permettra dans le cadre forestier de procéder à des études sur du matériel jeune et adulte, pour un grand nombre d'échantillons afin de déterminer, le plus tôt possible, les corrélations juvénile-adulte intéressantes en vue de la sélection et de l'amélioration des arbres forestiers.

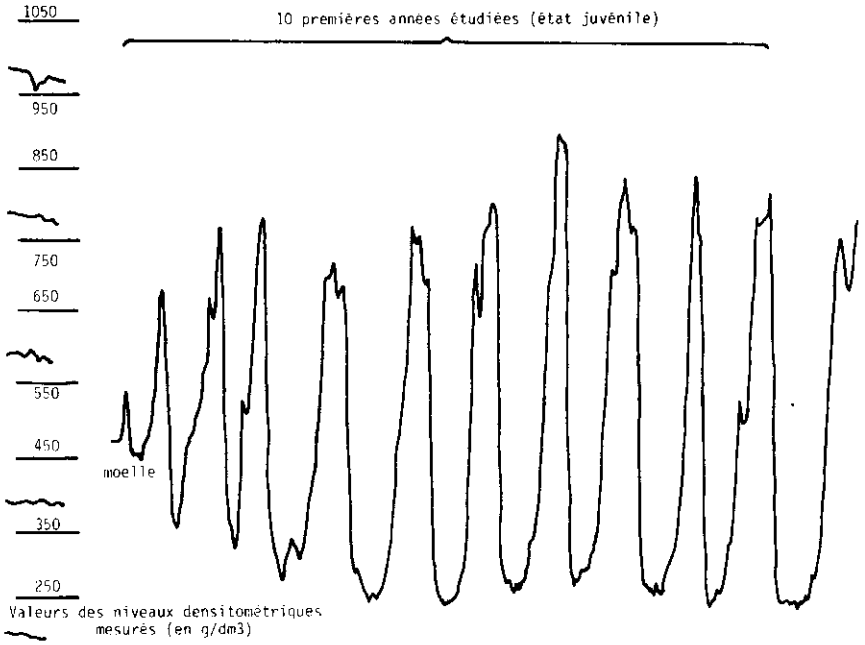


Fig. 4 — Profil de densité des 10 premières années, près de la moelle à l'état juvénile, d'un Douglas (Pseudotsuga Menziesii).

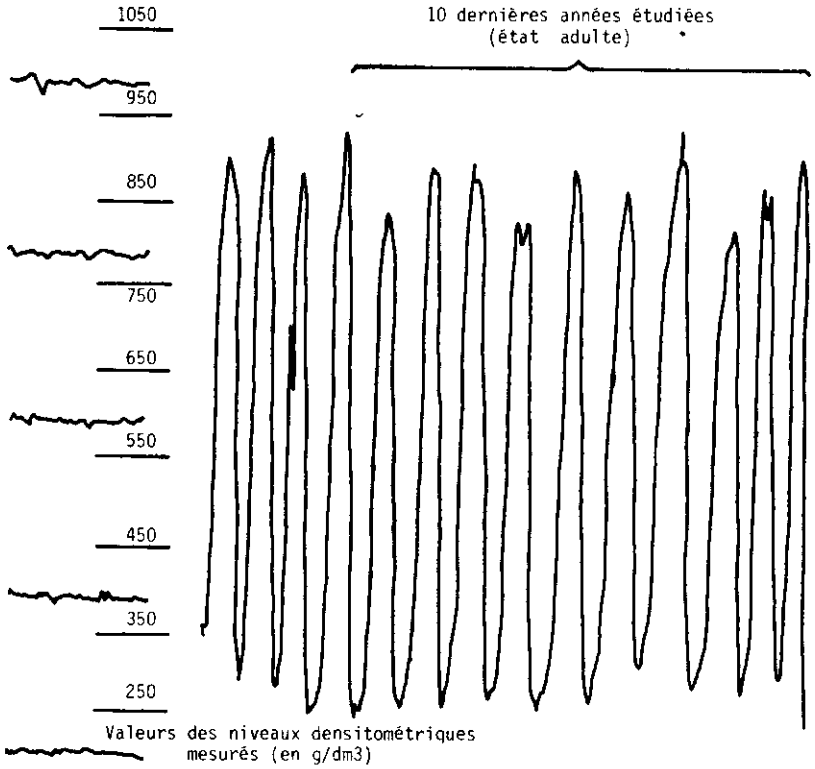


Fig. 5 — Profil de densité des 10 dernières années, près de l'écorce à l'état adulte (65 ans), d'un Douglas (Pseudotsuga Menziessi). **La figure 4 correspond à l'état juvénile du même arbre.**

167/529

METHODE D'EVALUATION DES QUALITES PAPETIERES : LA MICRO-CUISSON

La méthode de microcuisson est une technique de laboratoire qui a été mise en œuvre pour reproduire à une échelle très réduite les procédés industriels de cuisson des bois ou de tous autres végétaux pour la fabrication de la pâte à papier [11].

La cuisson papetière est un traitement du bois ou des végétaux par des solutions délignifiantes alcalines ou acides en vue de séparer les fibres en dissolvant partiellement les lignines et en conservant le mieux possible la cellulose et les hémicelluloses des membranes cellulaires.

Les qualités papetières souhaitables pour un bois sont le rendement en pâte et les caractéristiques biométriques les plus élevés pour une espèce donnée.

Le rendement en pâte de la cuisson, qui pour un traitement donné est le rapport du poids anhydre des fibres isolées au poids de bois anhydre, constitue un indice de qualité du bois pour les essences papetières car, pour une même biomasse récoltées, un rendement plus élevé signifie une production accrue de pâte à papier.

La répartition des longueurs de fibres d'un échantillon, leur moyenne, sont liées aux caractéristiques de résistance mécanique des papiers.

Les déterminations précises du rendement en pâte et des longueurs de fibres se pratiquent sur de nombreux échantillons de bois de petite taille souvent inférieurs au gramme, prélevés de façon NON DESTRUCTIVE dans les arbres vivants à l'aide de la tarière de Pressler et sont nécessaires si l'on veut tenir compte de la variabilité individuelle des arbres. Elles nécessitent donc une fiabilité et une reproductibilité des conditions opératoires des microcuissons afin de s'affranchir de toutes les sources de variations autres que celles concernant la nature et l'origine des échantillons examinés lors des comparaisons entre individus.

METHODE DE MESURE DES CONTRAINTES DE CROISSANCE [12]

En tout point de l'arbre sur pied existe un champ de forces (tension ou compression) que l'on appelle « contraintes de croissances ». La rupture de leur équilibre à la suite de l'abattage ou du débit occasionne des déformations indépendantes de celles occasionnées par le séchage. Ces déformations peuvent être très importantes notamment, pour ce qui concerne les bois indigènes, chez le hêtre.

On est parvenu à mettre en évidence des corrélations significatives entre l'importance de ces contraintes et les dimensions axiale et tangentielle de carottes de sondage extraites de l'arbre sur pied. Cette observation permet d'étudier sur un très grand nombre d'échantillons non destructifs la variabilité du phénomène « contrainte de croissance » en fonction de diverses sources de variation (variabilité à l'intérieur de l'arbre, entre différents traitements sylvicoles...).

IV. EXEMPLES D'APPLICATION D'ETUDE DE LA QUALITE DES BOIS

Le domaine de la recherche sur la qualité des bois concerne tous les aspects biologiques de la vie de l'arbre en forêt. Ces études doivent prendre en compte tous les effets des diverses sources de variation des facteurs forestiers : climat, sol, traitements sylvicoles, interventions artificielles, nuisances, ... qui influencent les caractéristiques du bois, ainsi que les aspects de l'hérédité, de l'âge, des rythmes de croissance. L'impact de ces sources de variation étant apprécié, on peut alors, dans une certaine mesure, modifier le plan ligneux dans le sens désiré.

Le développement des méthodes d'étude de la structure du bois nous a permis d'aborder, d'une part les problèmes de technologie de transformation du bois, comme le sciage, le déroulage, ou le tranchage, et d'autre part les relations existant entre la structure du plan ligneux des bois feuillus et résineux dans les cas particuliers de l'amélioration et de la sélection des chênes à bois tendre et à croissance forte, et aussi pour les aptitudes papetières.

UN EXEMPLE : PROGRAMME D'AMELIORATION GENETIQUE DE LA QUALITE DU BOIS DE CHENES (CHENES ROUVRE ET PEDONCULE) (1)

La démarche adoptée dans ce programme illustre assez bien les divers aspects de nos activités que nous venons de passer en revue de façon générale :

a) Définition de la qualité du produit :

Il s'agit de définir vers quel optimum on souhaite évoluer du point de vue de la qualité *intrinsèque* du bois (on n'évoquera pas ici les qualités extérieures du fût). Deux options très différentes pourraient être prises :

— bois à bonnes qualités mécaniques (charpente) ou de bonne dureté (parquet) : on augmente alors la densité du bois mais on aggrave son retrait,
— bois à bonne aptitude au tranchage : on s'oriente vers un bois tendre, de faible densité, dont le retrait est faible. On améliore alors le travail de l'outil de coupe au tranchage, l'état de surface des placages, d'où une économie de ponçage, ainsi que la stabilité au séchage des feuilles produites.

C'est l'option « tranchage » qui est choisie car elle est de très loin la plus valorisante pour le produit; elle répond en outre à une forte demande qui devrait aller en s'amplifiant.

(1) G. Nepveu participation au texte pour l'amélioration du Chêne.

b) Liaisons entre la qualité du produit et la structure anatomique du bois

Le bois de chêne se classe parmi les bois hétérogènes (fig. 6). Le « bois de printemps » est constitué de gros vaisseaux entourés de parenchyme. Cette zone est plus ou moins large avec des vaisseaux plus ou moins gros, ainsi que l'indique la figure 7 où sont représentés les positifs de radiographies de divers échantillons provenant de parcelles voisines d'un massif du Nord-Est de la France (à l'exception du chêne n° 2 provenant de la vallée de la Saône). La largeur de la zone de bois initial semble constante d'une année à l'autre à l'intérieur du même arbre.

La zone de bois final est beaucoup plus dense; elle peut être extrêmement réduite (n° 14) ou représenter les 9/10e de la largeur du cerne (n° 16). Cette zone est formée de petits vaisseaux, de parenchyme, mais également de plages de fibres plus ou moins importantes; elles correspondent à des zones de forte densité. Elles apparaissent en sombre sur les positifs de radiographies. Signalons un dernier type d'élément anatomique : les rayons ligneux orientés radialement : leur rôle technologique est mal connu.

Les chênes de mauvaise qualité pour le tranchage sont ceux présentant une faible proportion de vaisseaux et beaucoup de plages de fibres; ils sont denses, durs et ont une mauvaise stabilité dimensionnelle (les Nos 1, 5 et 16 sont particulièrement médiocres). Les chênes Nos 4 et 14 sont en revanche parmi les meilleurs.

On voit que les effets d'une augmentation de croissance pour un arbre donné sont négatifs : la proportion de vaisseaux décroît, des fibres apparaissent en plus grand nombre : arbres 7, 13, 17, 18.

La sylviculture actuelle des « grands crus » de chêne reste donc prudente en maintenant des cernes réguliers et très fins, d'où des révolutions extrêmement longues.

Or, des recherches conduites dans notre laboratoire sur un grand nombre d'arbres ont permis de mettre en évidence des chênes à accroissements larges et de bonne qualité [13]; un sujet remarquable à cet égard est le n° 2 qui présente des cernes trois fois plus larges que le n° 1 et une qualité bien supérieure.

La mise au point récente d'une technique de bouturage du chêne par rejet de souches [14, 15 et 16] permet maintenant la multiplication végétative de ces rejets : elle est l'outil précieux qui permet d'envisager sous certaines conditions l'amélioration de la qualité du bois de chêne par la voie asexuée.

c) Exploitation de la variabilité de la qualité du bois de chêne

On a vu qu'à l'intérieur d'une forêt, voire d'une parcelle, la variabilité de la qualité est extraordinaire et qu'il existe des individus d'excellente qualité ayant une bonne croissance : la sélection de tels individus, leur multiplication végétative permettrait d'envisager une sylviculture beaucoup plus intensive du chêne sans craindre une chute de la qualité.

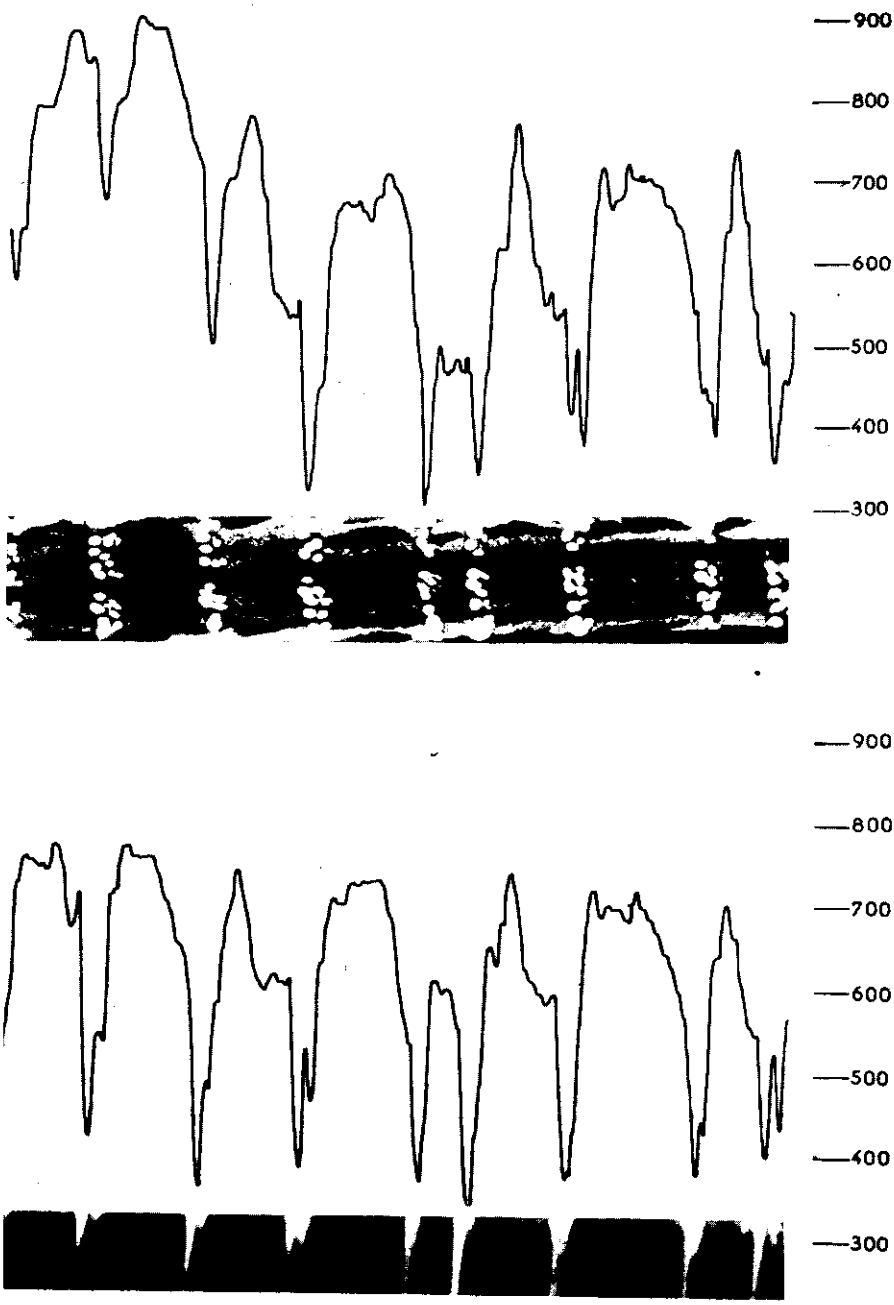


Fig. 6 — Enregistrements densitométriques caractéristiques d'un échantillon radial de chêne.

Partie supérieure : rayons X parallèles aux fibres de bois; partie inférieure : rayons X perpendiculaires au fibres de bois; échelle graduée en densité en g/cm^3.

Encore faut-il que cette faculté de produire rapidement un bois de qualité tranchage soit héréditaire (au sens large) et qu'en outre les plants issus de bouture se comportent convenablement.

C'est dans cet esprit que des études de variabilité clonale sont actuellement entreprises par notre Station (incluant l'étude du devenir des plants) avec mesures des caractéristiques anatomiques dès le plus jeune âge à l'aide d'un analyseur d'images (fig. 7). On peut raisonnablement espérer qu'elles confirmeront les valeurs assez fortes d'héritabilités observées sur d'autres essences pour d'autres critères de qualité du bois. Un élément positif militant dans ce sens est la persistance à l'intérieur d'un même individu de la qualité du bois, ce malgré des conditions climatiques variables d'une année à l'autre. Ainsi l'arbre n° 8 présente-t-il une zone initiale de largeur relativement constante et peu de fibres, quelles que soient les années. L'arbre n° 22 présente lui aussi une qualité assez stable, même si elle est médiocre.

d) Conclusion

Nous avons voulu par cet exemple montrer les étapes de notre réflexion d'un cas concret : définition de l'objectif, des caractéristiques anatomiques conditionnant la qualité du produit, des facteurs pouvant faire varier le plan ligneux : rythme de croissance, hérédité. C'est en se penchant sur le plan ligneux lui-même, et non plus sur une variable synthétique telle que la densité, que l'on pourra mieux cerner l'influence des différentes sources de variation. Le rôle de l'analyseur d'images dans ce genre d'étude pour quantifier objectivement l'importance des différents types de cellules du bois est essentiel.

LES APTITUDES PAPETIERES

Le but recherché dans l'appréciation des qualités papetières est de connaître l'influence de tous les facteurs forestiers sur ces caractères et, parmi ces facteurs, d'estimer la part de l'héritabilité du rendement en pâte et des longueurs de fibres. La variabilité individuelle de ces caractères qui ouvre la possibilité de sélection et d'amélioration oblige à pratiquer de nombreuses mesures et cette difficulté est accrue par l'hétérogénéité naturelle du bois qui se manifeste dans la technologie papetière.

a) Les facteurs forestiers de l'environnement influençant les qualités papetières

Lorsque l'on examine un caractère nouveau de la qualité du bois, on constate qu'une grande partie des facteurs forestiers exercent leur influence. Ainsi, la roche-mère, le sol, le climat imposent un fort effet sur le rendement en pâte comme on a pu l'observer pour une même espèce *Pinus brutia* sur deux roches-mères différentes : gabbros et péridotite, à deux altitudes différentes. Les variations locales de la nature du sol ont été mises en évidence dans des plantations comparatives de *Pin laricio de Corse* dans lesquelles les mêmes familles n'avaient

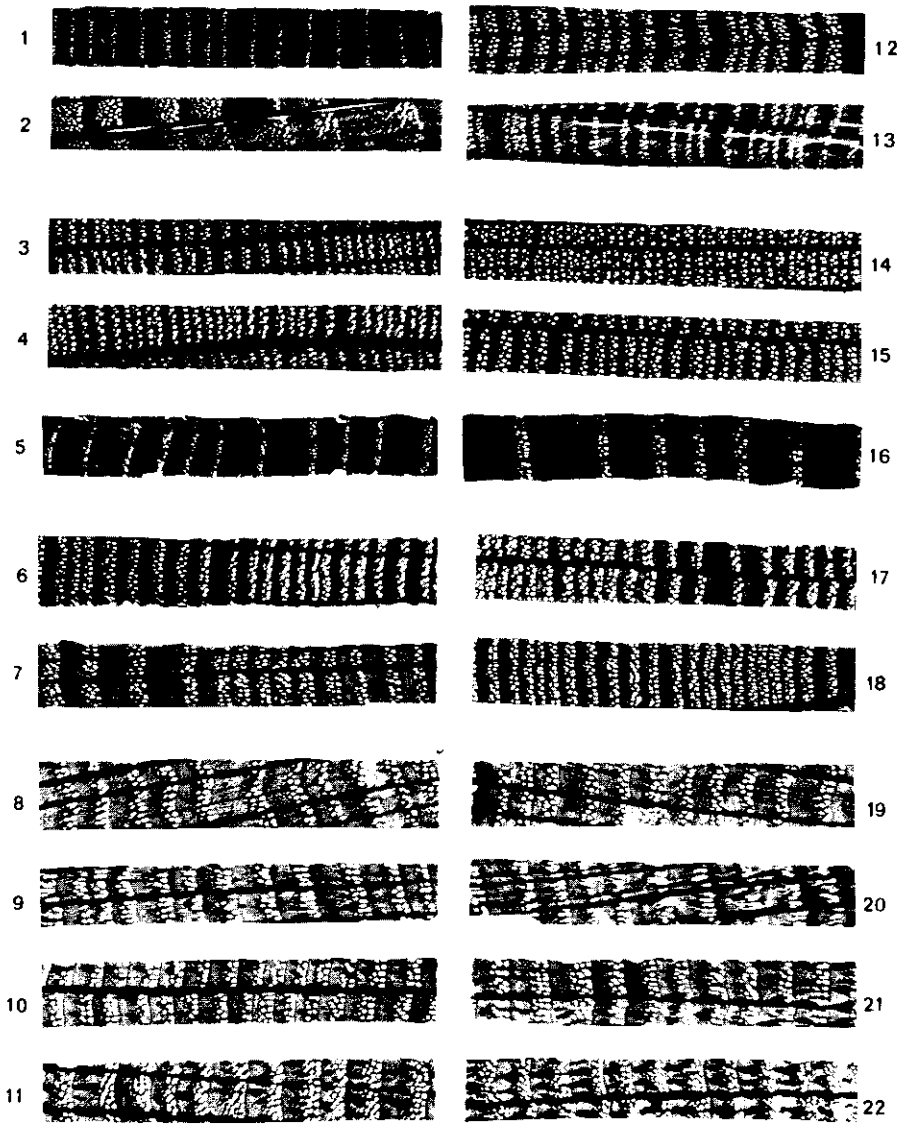


Fig. 7 — Comparaison de la qualité du bois de différents chênes : échantillons de chênes prélevés suivant un rayon (positifs de radiographie).

N° 1 — 2 — 12 — 13 variabilité de la structure du plan ligneux des chênes.
N° 3 — 4 — 14 — 15 chênes à bois tendre et accroissements annuels étroits modèle idéal de la sylviculture traditionnelle du chêne.
N° 1 — 5 — 16 chênes à bois dur et accroissements larges.
N° 6 — 7 — 17 — 18 effets de l'accélération de la croissance : zones d'accroissements successifs larges (bois plus dur) et étroits (bois plus tendre) sur les mêmes individus.
N° 2 — 8 — 9 — 10 — 11 — 19 — 20 — 21 — 22 chênes à bois tendre et à accroissements larges.

pas le même comportement selon leur situation dans le dispositif. L'âge de l'arbre, dont l'âge des differentes assises génératrices, influence lui aussi le rendement en pâte et la longueur des fibres (fig. 8).

b) Les facteurs anatomiques du bois et les qualités papetières

La présence de bois de réaction, de compression chez les résineux est une source d'hétérogénéité pour les caractères papetiers. L'anisotropie marquée au même niveau dans l'arbre suivant différents rayons dans le plan d'une section transversale (fig. 9) localise précisément le bois de compression dans les diagrammes polaires des rendements en pâte.

Le bois de compression présente des différences caractéristiques par opposition au bois normal diamétralement opposé du point de vue de la largeur des cernes et de la variation de la densité dans l'accroissement annuel. Ainsi, un pin maritime *(Pinus pinaster)* présente une dissymétrie importante sur 11 années à partir de la mœlle (fig. 10). Cette différence est aussi sensible pour les longueurs de fibres dont la valeur moyenne est beaucoup plus faible (fig. 10 et 11).

La fertilisation des peuplements forestiers par apport d'engrais phosphaté, de potassium et d'azote donne un gain de croissance élevé pour les arbres chez le Pin maritime des Landes, et si son action ne fait pas diminuer le rendement en pâte globalement, elle accuse la dissymétrie entre le bois normal opposé au bois de compression (fig. 12) en abaissant le rendement dans le bois de compression correspondant. Par ce biais, la fertilisation affecte la qualité du bois.

La structure de l'accroissement annuel décrite par les enregistrements de densité peut être mise en corrélation avec les propriétés papetières. Ainsi, le découpage de l'accroissement annuel en largeur suivant différentes zones (fig. 3) comprises entre des niveaux de densité successifs, permet de retrouver les zones de faibles densités liées négativement avec le rendement en pâte et les zones de fortes densités liées positivement avec le rendement en pâte pour l'espèce *Pseudotsuga menziesii* ou douglas. Dans les deux cas, ces liaisons sont très fortes et fournissent un moyen de sélection entre différentes provenances.

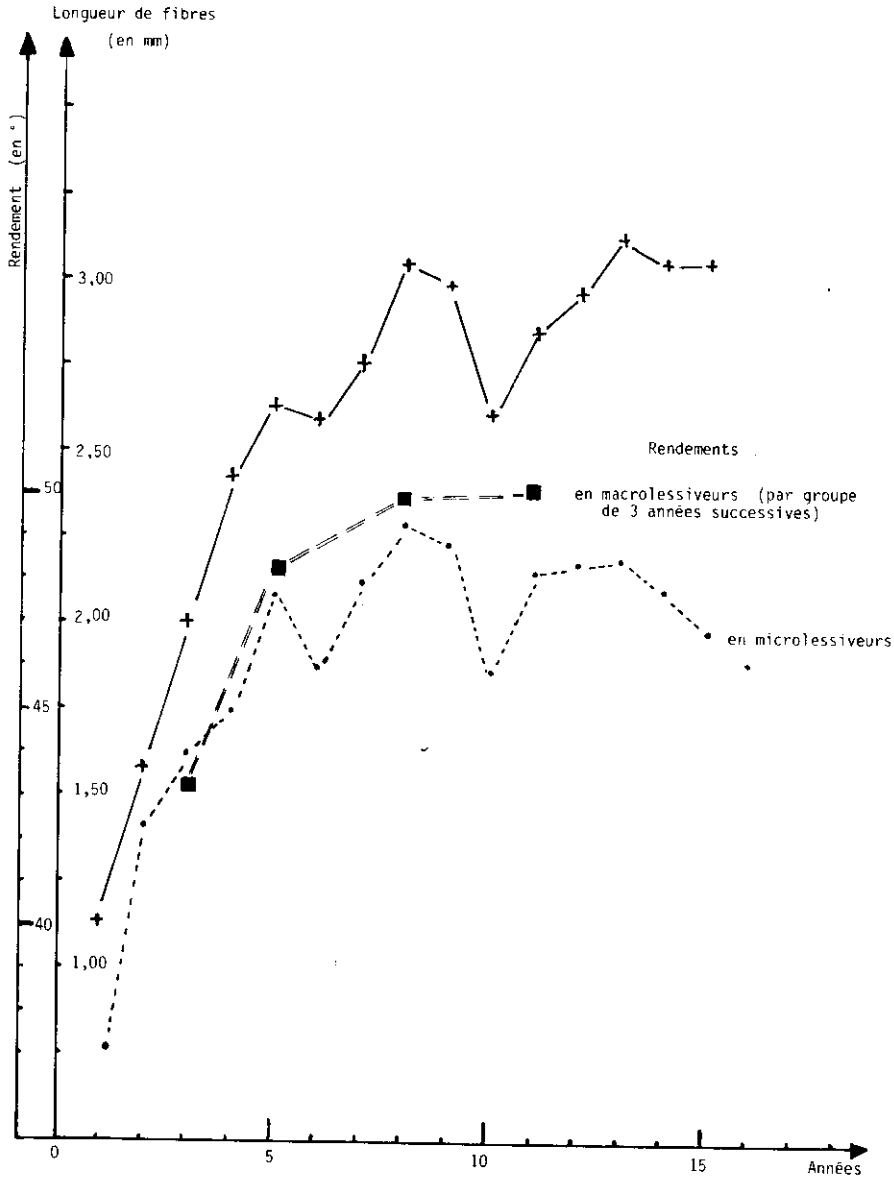


Fig. 8 — Longueur des fibres et rendement en pâte en fonction de l'âge d'un sapin (Abies Grandis).

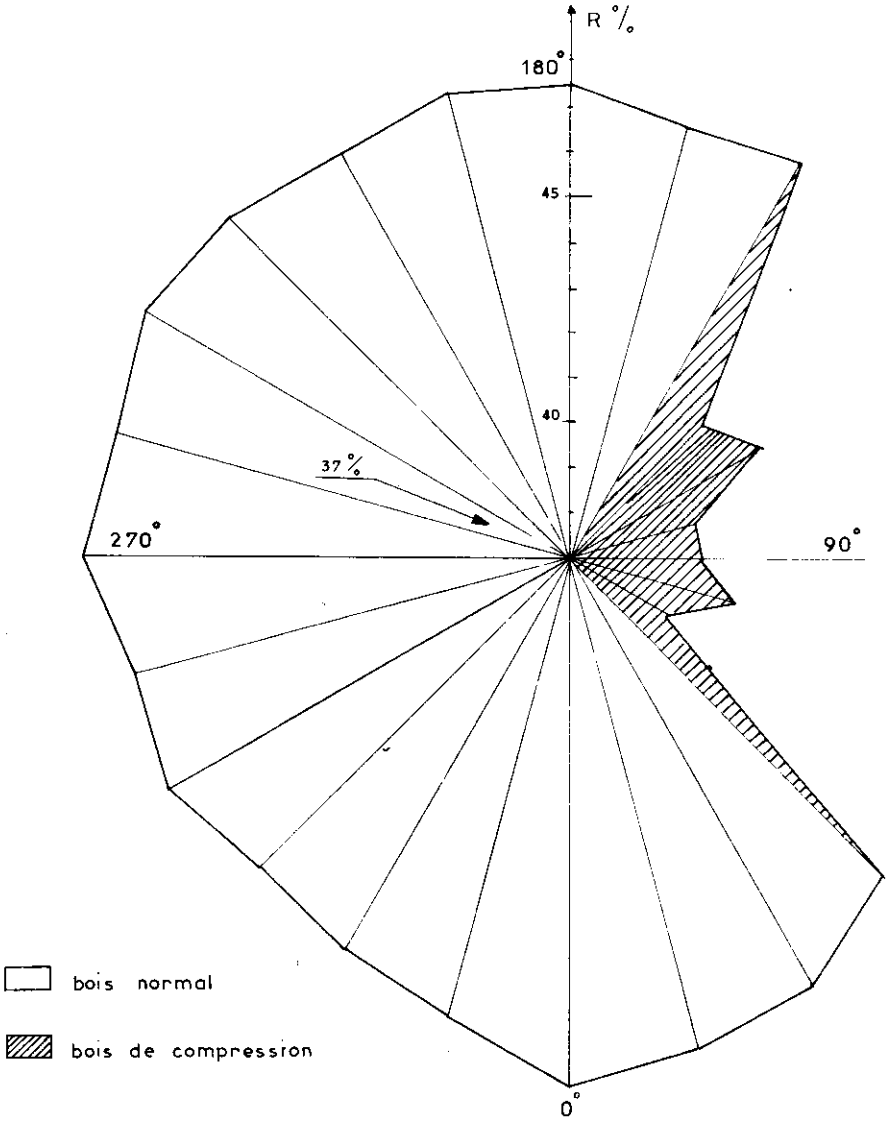


Fig. 9 – Diagramme polaire différentiel des rendements en pâte sur une section transversale d'un Douglas (Pseudotsuga Menziesii) : bois normal et bois de compression.

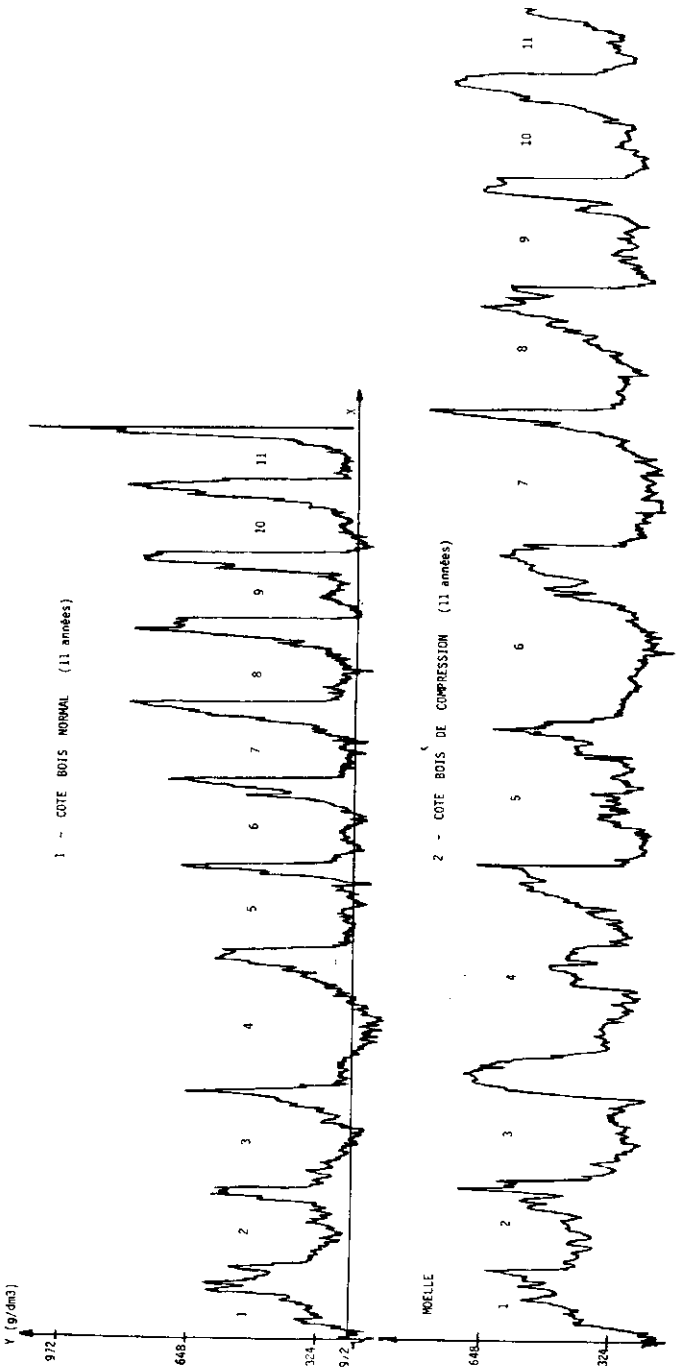


Fig. 10 — Enregistrements des variations de densité dans le bois normal et le bois de compression du Pin maritime (Pinus Pinaster) sur le même diamètre suivant 11 années de croissance.

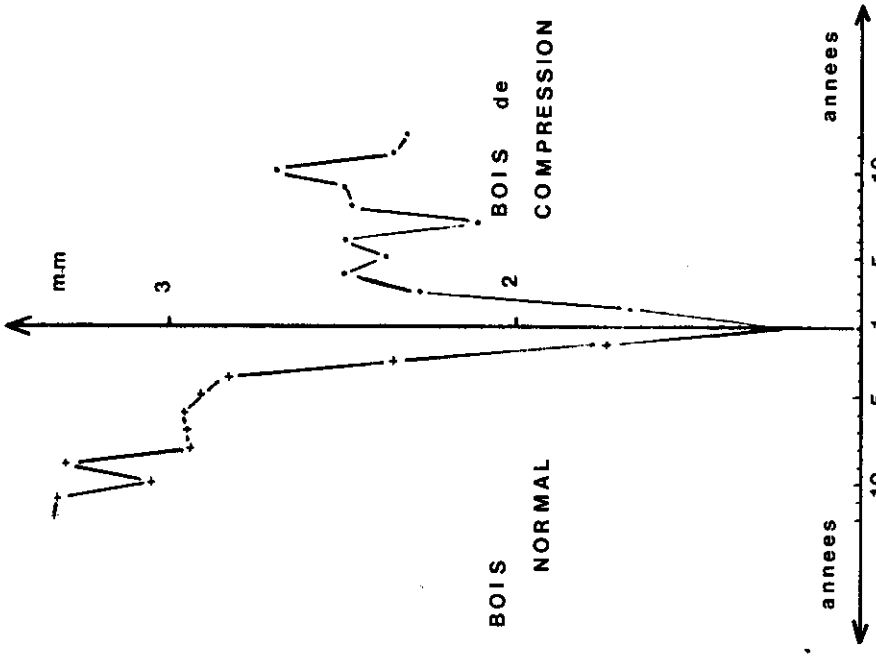


Fig. 12 – Diagramme polaire différentiel des rendements en pâte du bois normal et du bois de compression sur deux sections de Pin maritime (Pinus Pinaster) fertilisé ou non fertilisé : témoin.

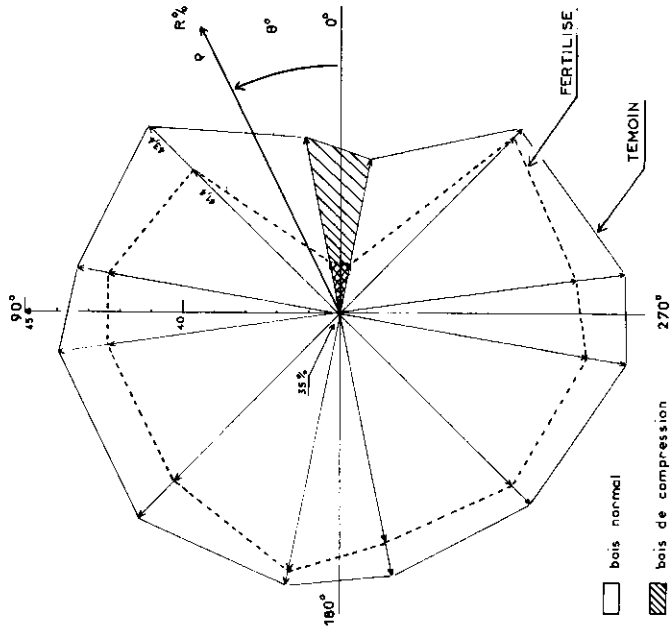


Fig. 11 – Longueur des fibres en fonction de l'âge pour le bois du côté « bois normal » et du côté « bois de compression » du Pin maritime (Pinus Pinaster).

TABLEAU I

Coefficients de corrélation existant entre le rendement en pâte et le % de la largeur du cerne entre deux niveaux de densité successifs et le % en poids de bois entre ces mêmes niveaux.

G/DM³	D mini /D 250	D 250 /D 350	D 350 /D 450	D 450 /D 550	D 550 /D 650	D 650 /D 750
% largeur	– 0,719 (1)	–0,227	–0,091	+ 0,293	+ 0,589 (2)	+ 0,789 (1)
% poids	– 0,791 (1)	– 0,357	– 0,298	+ 0,012	+ 0,517 (2)	+ 0,802 (1)

(1) Seuil de signification 1 ‰
(2) Seuil de signification 1 %.

V. CONCLUSION

L'étude de la qualité des bois tiendra toujours compte comme dans le passé de l'aspect extérieur de l'arbre rattaché aux qualités de forme du fût qui résultent du mode de sylviculture appliqué à une espèce donnée. Mais, dans l'avenir, elle portera de plus en plus sur l'accroissement annuel dans l'arbre qui est l'unité la plus cohérente et la mieux définissable.

La structure du plan ligneux, qui est une caractéristique de chaque espèce, peut être modifiée dans une certaine mesure par les facteurs naturels de la production forestière et par les interventions humaines artificielles. Les modifications peuvent porter sur la proportion relative et la répartition des fibres, des vaisseaux, des rayons ligneus et des autres éléments anatomiques du plan ligneux, et aussi sur des caractéristiques morphologiques de ces fibres : longueur, épaisseur des parois, diamètre des cavités cellulaires.

La variabilité qui existe entre individus (fig. 7) et les valeurs fortes de l'héritabilité des caractères de qualité des bois permettent de fonder des espoirs raisonnables de sélection et d'amélioration des essences forestières.

BIBLIOGRAPHIE

[1] VENET J. (1958) — *Annales de l'Ecole Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherches et Expériences,* tome XVI, fascicule 1.

[2] POLGE H., KELLER R. (1970) — *Annales des Sciences Forestières,* **27** (2), 197-223.

[3] POLGE H. (27 juin 1966) — *Thèse Docteur ès-Sciences Appliquées,* Faculté des Sciences de l'Université de Nancy.

[4] POLGE H., KELLER R. (1968) — *Annales des Sciences Forestières,* **25** (4), 237-249.

[5] POLGE H., KELLER R. (1969) — *Annales des Sciences Forestières,* **26** (2), 225-256.

[6] KELLER R., MILLIER C. (1970) — *Annales des Sciences Forestières,* **27** (2), 197-223.

[7] BAZERQUE F. (24 octobre 1974) — *Thèse de spécialité,* Université de Nancy I.

[8] POLGE H., KELLER R., THIERCELIN F. (1973) — *Annales des Sciences Forestières,* **30** (2), 127-140.

[9] POLGE H., GARROS Simone (1971) — *Annales des Sciences Forestières,* **28** (2), 195-206.

[10] POLGE H., LEMOINE M., DERET Eliane (1977) — *Annales des Sciences Forestières,* **34** (3), 285-292.

[11] JANIN G. (mars 1972) — *La Papeterie,* **3**.

[12] FERRAND J.C. (janvier 1979) — *Thème personnel Engref.*

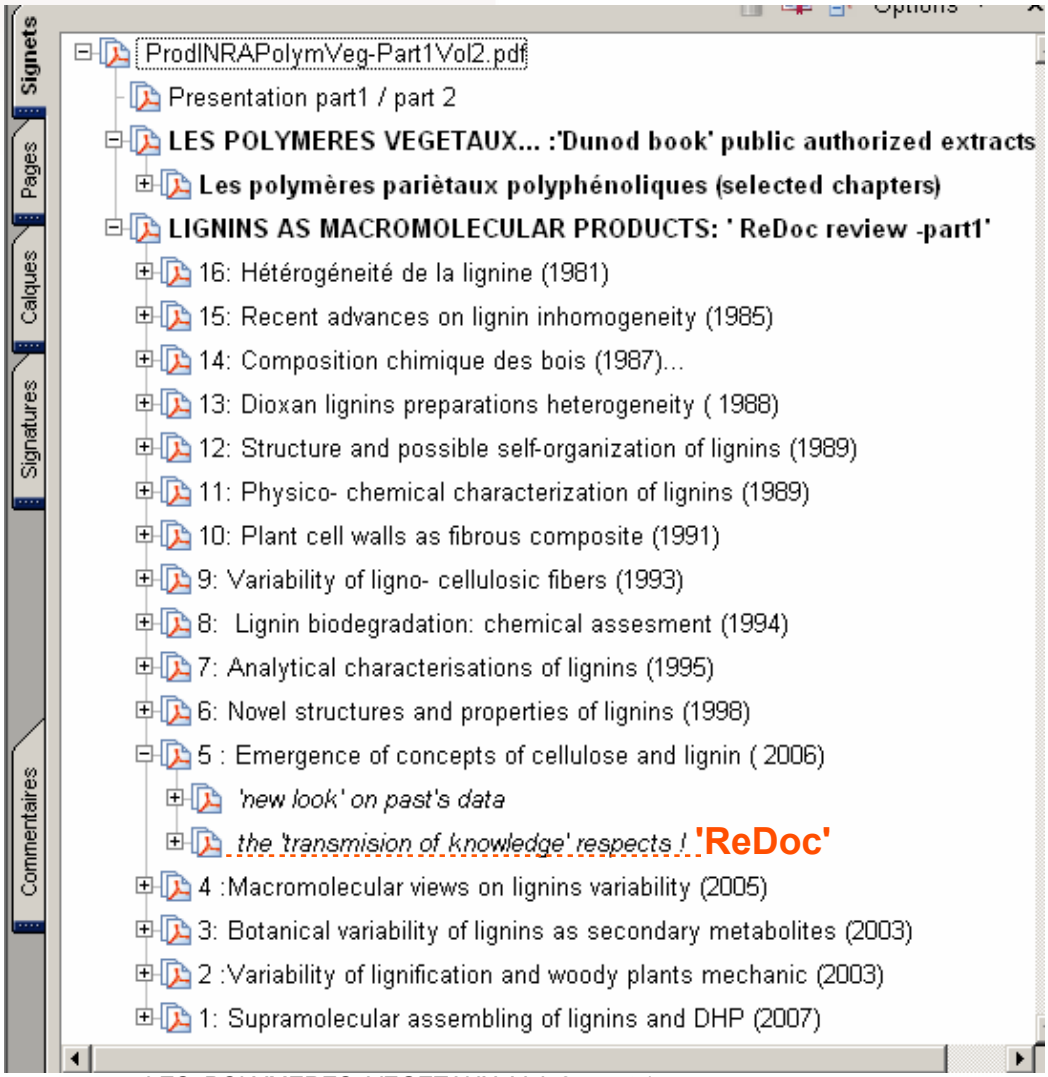
[13] POLGE H., KELLER R. (1973) — *Annales des Sciences Forestières,* **30** (2), 91-126.

[14] GARBAYE J., KAZANDJIAN B. et LE TACON F. (1977) — Développement des boutures racinées de chêne rouvre (Quercus petraea M. Liebl.). Premiers éléments d'une technique de production de plants. *Annales des Sciences Forestières,* **34** (3), 345-260.

[15] CORNU D., DELRAN S., GARBAYE J. et LE TACON F. (1977) — *Annales des Sciences Forestières,* **34** (1), 1-6.

[16] KAZANDJIAN B. (1977) — *Document interne C.N.R.F.,* rapport de 3ème année E.N.I.T.E.F.

clic here for the next



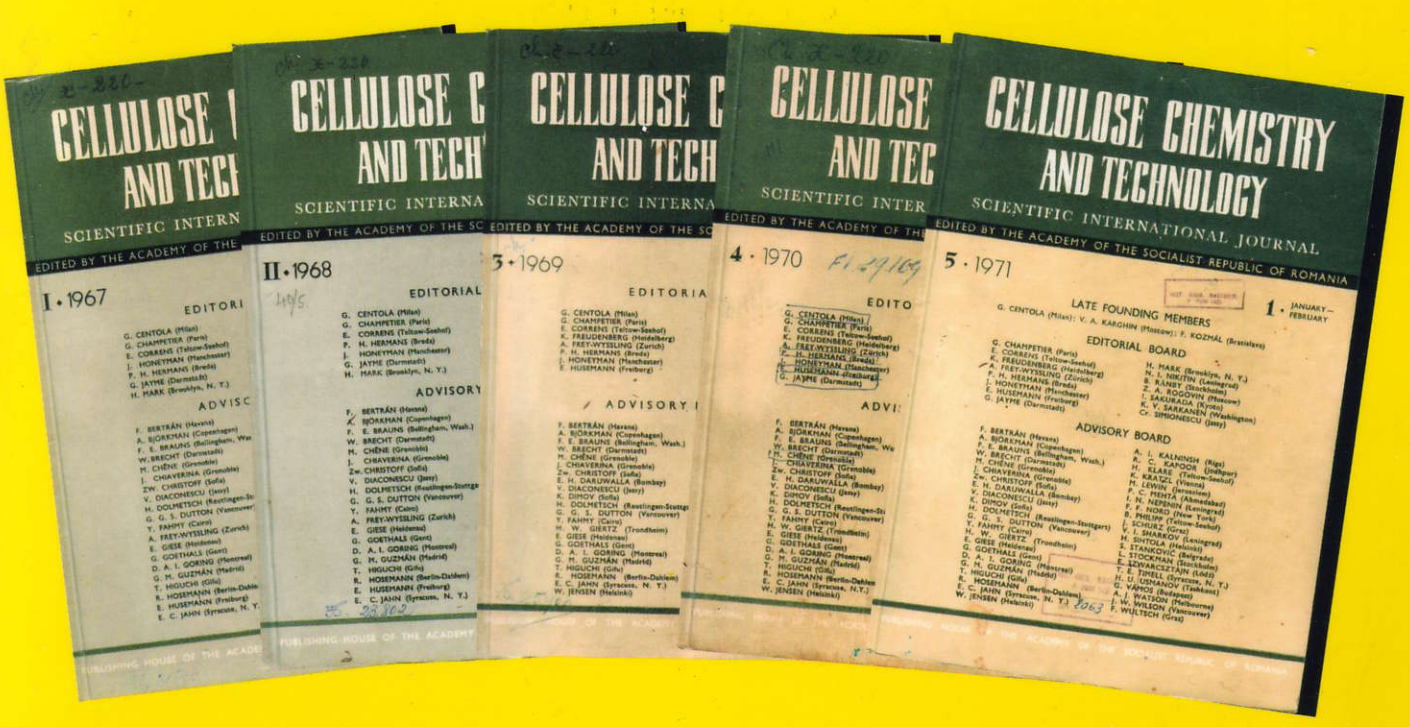
CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

ADVANCES IN THE CHEMISTRY, PHYSICS AND TECHNOLOGY OF POLYSACCHARIDES AND LIGNIN

40 • 2006

9 - 10 • OCTOBER - DECEMBER

Editor in Chief: Cr. I. SIMIONESCU
Associate Editor: V. I. POPA



40th anniversary

EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE

clic here for the next

ELECTRONIC - *VERSUS* PAPER – EDITIONS OF KNOWLEDGE, CURRENT TRUST AND FEAR: A CONTRIBUTION TO THE 40th ANNIVERSARY OF THE JOURNAL "CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY", OUTLINED BY SOME GLANCE ON THE EMERGENCE OF SCIENTIFIC CONCEPTS IN CELLULOSE AND LIGNIN CHEMISTRY

BERNARD MONTIES

INA-Paris-Grignon, Laboratoire de Chimie Biologique, 78850, Thiverval-Grignon, France

On some occasions, celebration of an anniversary unavoidably prompts to scrutinize more closely the future, on the basis of current and past events. This is indeed the case of the 40th anniversary of *Cellulose Chemistry and Technology*, with respect to the conjunction of two deep-seated social phenomena, namely the strong renewal of scientific interest for the cellulosic products as clean sources of energy and polymer materials, and the rising promises on the possibilities offered by the so called 'electronic edition', to improve the efficiency of knowledge communication.

Under such circumstances, and considering first the past developments and events, this anniversary allows emphasizing and acknowledging the lucid and independent editorial policy of the Editors, who enforced *Cellulose Chemistry and Technology* – our "CCT"' – as an indispensable international journal. As unambiguously shown by the diversity of both the national belonging of the authors, and by the extent of the professional expertises of the papers, combining academic and technological interest, this editorial policy has tenaciously responded to a scientific requirement and as such, it has strongly contributed to the development of open and free scientific exchanges in this specific domain of cellulosic compounds.

Furthermore, the past settling and the present concern of this editorial diversity, extended in the direction of, for example, the diversity of the natural resources and of the environmental cleanness of products and technologies, also exactly respond to the existing imperious need for large and *free* exchanges of scientific information, necessary for a sustainable management of our contemporary human society.

Looking then to the future, one has to also emphasize that the whole suite of the 40 *Cellulose Chemistry Technology* volumes settles a precious collection of relevant data deserving certainly future renewed interests! Such a statement could somewhat appear provocative as concerning 'old papers' and 'old ideas', most often reputed as 'out of any' of the 'today competitive ... Science'. This is absolutely not the case. In fact, as time fleets, the significance of some concepts, even of scientific nature, changes continuously, following the advances of recent observations and experimentations. Thus, the related meaning of the statements in 'older' papers has to be revisited, accounting, however, for the unchanged exactitude of the experimental observations,

Cellulose Chem. Technol., ***40*** *(9-10)*, *685-690 (2006)*

on accepting that even the understanding of the whole texts is sometime renewed. Obviously, this ought to be particularly the case when an original idea emerges as a new and steadily renewed concept. A clear illustration that both these facts and statements are not a kind of illusive funny idea, '*i.e.* une illusoire vue de l'esprit', can be found if looking back into the 'old' papers of any scientific journal and thus of course, in … CCT. This has been the case during the emergence of the 'molecular' concept of cellulose and of lignin, more than one century ago. This is currently also the case for the 'macromolecular' organisation of lignin in diverse plant cell walls; a source of thorny contemporary controversy, this last theme will be only squished here.

As a first example, the 'molecular' concept of 'cellulose' and of its 'homogeneous long chain', the 'only one page' answer by K. Freudenberg, printed in 1977 in the 11th CCT volume, is particularly relevant, as he makes clearer an eulogistic comment by Herman Mark,[1] published in 1976. In fact, Mark's statement that 'some confusion could have been avoided if the results of Freudenberg's experiments on the acid hydrolysis of cellulose around 1921' had been expressed 'with stronger emphasis'. In addition, it could be now also suggested that the even … 'scientific' minds were not ready to 'understand', 'combine' or 'comprise', (*i.e.*, to etymologically 'clearly take and bind together'), some of the original experimental 'data' and the new meaning of the corresponding term of 'knowledge', as the concept of 'cellulose' as large molecule, to be later on systematized by Herman Staudinger.

Resuming now to the 'macromolecular' concept of lignin as a second and last example, it is amazing, but certainly not surprising, to find a similar illustration in CCT, again and again, from the part of K. Freudenberg, in 1978 volume 12, who presented some retrospective views on solved and open questions concerning lignin and ... polysaccharides! On one hand, looking again into the history of cellulose chemistry, Freudenberg wisely recalled a spectacular diatribe, *i.e.* "sehr hohgespielte Kontroverse", between two well-known experts in the field, strongly stating that, as previously emphasized here, 'a proper study of the literature soon published could had avoided such a controversy and the related cumbersome publications'. On the other hand, looking into the future of lignin chemistry, Freudenberg then stated, with regard to its macromolecular structure organization, that 'perhaps lignin would be not so much macromolecular as previously admitted' on the basis of synthetic models studies,[2] a view also clearly expressed by H. Staudinger.[1] It is however still possible to find, in some recently published 'current opinion' publications, papers challenging with strong emphasis this late statement of Freudenberg, starting from the contradiction of his earlier, so-called 'assertions' and/or 'claims' with references to 'older' 1965, 1968 and 1969 papers. Determined to avoid here any new controversy, it is enough to suggest that such an unexpected challenging could well result from the difficulty to explain 'new' specific concepts by using 'old' generic 'words', as later discussed here, as well as, again, from a lack of 'a proper study of the literature', mainly due to the difficulty of extensively exploring, in a limited period of time, an ever increasing number of more and more specialized publications in different thematic domains. Obviously, this type of difficulty is particularly characteristic to any multidisciplinary scientific domains and related themes; it is of course particularly provoking not only the chemistry and technology of cellulose- and lignin-based products but also lignocellulosic plant cell walls.[3]

Clic here for the next !

ReDoc

This is therefore the main reason why the question of the 'transmission of knowledge' was stated here in the title, on this anniversary occasion. This question can be now more exactly expressed as focussing on the 'current query of new possibilities of optimisation by mixed use of paper- and electronic-tools for the transmission of knowledge', that is, with the aim of sharing, and not monopolizing knowledge, as common 'know - what, - how and - why'.

Remembering that the complexity of this difficult question has been debated, at least since the invention of writing,[4] only one

suggestion will be here expressed as 'Good Anniversary Wishes', which has to be necessarily concise, namely: to have a 'new look' at the whole collection of the 40 volume of CCT 'papers' as a 'precious deposit', etymologically a kind of sleeping 'treasure', *i.e.* a 'thêsauros'.[5] It is thus wished to look now this collection also as a potential source for a fresh documentary 'recollection', 'recueil' *in French*, by a conversion first as a 'data-' and then as a 'knowledge-' electronic base. Of course, these two wishes are established following some of the contemporary fascinating 'trusts' on the outlooks of the possible electronic editions, transmissions and exchanges of numeric documents through informatic networks.[6]

As a 'data-base' source, this conversion would require a 'simple direct' re-edition of the entire set of publications deposited 'on paper', as CCT documents, from the 'alphabetic' printed book form into a set of 'numeric' electronic files, as it has already been done for some other scientific journals. This conversion could be either 'complete', concerning the entire papers, or 'limited' to short extracts, including, for example, only the summary, standard bibliographic references and the list of the cited references. Following the idea that everyone becomes soon experienced when simply searching selected items in such data bases, one has nevertheless to stress the essential difficulty of 'catching' the right data and names related to 'new' or 'partially known' concepts by means of 'previously-well-defined-words and -key-words', which remain necessarily unclear in this respect, once they express only 'old' concepts.[7] Specific to such type of research, this difficulty could express the major fear of such endeavour, namely appearing as trivial for the 'established' concepts, but certainly not for the 'emerging' one.[8]

As a source of a 'knowledge basis', this conversion would require, in addition to the conversion of 'numeric editions' as 'electronic files' just previously discussed, a systematic and specific construction of a classification of each of the published 'papers' according to a hierarchical arborescence of 'topics', corresponding to: 1- scientific and technical domains, 2 - speculative and scientific, 'pure', generic themes, and 3 - empirical and technical, 'applied' sub-themes, such a classification bringing thus closer, both materially and conceptually, for example, an 'archive-box' as a sub-theme, along with 'set of boxes' as themes.[9] Allowing a simpler systematic construction of implicit and explicit links and hyperlinks between 'words', 'data' and 'concepts', this type of construction is expected to favourize a more exhaustive, crossed and cyclic exploration of any collection of publications organized as networks of knowledge, again by using 'old' words to find 'new' concepts. On leaving aside the type of support – printed *versus* electronic –, such a network, designed to crossed cyclic exploration, is thus formally and etymologically 'encyclopaedic' and thus generally applicable to any system of knowledge. Focussed on lignin and plant cell walls chemistry and technology, a corresponding illustration can be found in a set of 'documentary recollection', named ReDoc for 'Recueil documentaire' *in French*, recently developed at INRA.[10]

To conclude with, looking back to the 'thesaurus' of the 40 CCT volumes already published 'on paper', it is whished that both the courageous actual editorial policy and the paper edition format will be safely continued, suggesting, for the future, launching of some 'electronic' edition, based on full 'papers' or 'limited' to short extracts of theirs, thus better supporting the indispensable free exchanges of scientific and technical knowledge, preparing the future, extended utilization of cellulose- and lignin-based compounds as environmentally safe biological and agroindustrial products.

REFERENCES AND COMMENTS

[1] K. Freudenberg, *A glimpse on the early chemistry of cellulose*, *Cellulose Chem. Technol.*, **11,** 127 (1977); see also '*Von Emil Fisher zur molekulare Konstitution der Cellulose und Stärke*' by K. Freudenberg, 1967, *Chem. Ber.*, **100**, CLXXII- CLXXXVIII, concerning some similar 'meanders' during the emergence of the concept of cellulose as a 'macromolecule', also later revisited by Herman Staudinger in his Nobel lecture, *www/Nobel site*.

[2] K. Freudenberg, *Rückblick auf gelöste und offene Fragen der Chemie der Polysaccharide und Lignin*, *Cellulose Chem. Technol.*, **12**, 3 (1977); in agreement with Freudenberg's well predicted interest on the 'synthesis of model lignin compounds' as a method to explore the variability of lignin macromolecular organisation; see also Lairez et al., *Biomacromolecules*, **6** , 763 (2005), and B. Monties, *Cellulose Chem. Technol.*, **39**, 341 (2005), for the corresponding hypothesis on the self-organisation of the enzymatically-induced but thermodynamically-driven mechanisms, during chemical synthesis and biosynthesis.

[3] Concerning the 'lignified plant cell walls' concept, a convincing illustration of the present need and interest on multidisciplinarity can be found in 19 papers, from 'biomimetic composites' to 'polymorphic genes molecular biology' including both '*in vivo – situ'* and '*in vitro*' cytology, physic and chemistry, and especially in the foreword written by A.-M. Catesson, on a 'thematic issue' of the Comptes Rendus à l'Academie des Sciences (Paris), *C. R. Biologies*, **327**, 775 (2005). Looking more into the past may also provide similar illustrations in addition to some amazing views on the time taken for the emergence and clear acknowledgement of concepts such as 'lignin'. For example, limiting here the choice exclusively to 'old' papers included in these 'Comptes Rendus', the comparison of Reports and Communications by Payen (*C. R.*, **8**, 51 (1839)), Fremy (*C. R.*, **48**, 862 (1859)) and Bertrand (*C. R.*, **114**, 1492 (1892) and *C. R.*, **209**, 733 (1939)) is more than sufficient to follow the progressive identification of the chemical composition and heterogeneous properties of the 'compounds now called lignins'. The two headings of C. R., by E. Fremy '*Chimie appliquée à l'anatomie végétale*' (*C. R.*, **83**, 1136 (1876)) and '*Chimie appliquée à la physiologie végétale*' (*C. R.*, **48**, 862 (1859)) are particularly clear with respect to the need of multidisciplinarity, as well! Obviously, similar illustrations could be found in the German, English, etc., literature, which can not be presented here. Some recent brief 'historical outlines' can be found in the chapters elaborated by Brunow, Dean, Hatakka and Monties for the volume 'Biopolymers', (vol 1: *Lignin, humic substances, and coal*, edited by M. Hofrichter and A. Steinbüchel, 513 p., Wiley-VCH, 2001), citing 'older' books and reviews.

[4] As to the invention of 'writing' during the mythic Egyptian high antiquity, of 'written works' which should, according to their inventor, 'increase the knowledge and the remembrance of Egyptians', Plato soon emphasized, at least two times, in a Letter (VII, c°: 341c) and a dialogue, Phaidro (c°: 274), the fear of the written documents, deploring more the 'fixed, static form of the written text' than the fear of 'forgetfulness, due to a too large confidence to writing, leading thus to neglect the resort of remembrance'. Even more, a third type of fear explicitly concerning the 'mercantile operations in private education by sophists', and thus, implicitly, 'the merchant use and the civic bases of the rights of knowledge-property', is intensely discussed in at least two other dialogues of Plato (Sophist: c°: 224b; Menon: c°91 c-d).

[5] With reference to the current common sense of the term 'words' and of its evolution *versus* some related concepts, it is funny to recall that, to the best of our knowledge, even the origin of the word 'treasure' still remains unexplained! The concept has been tentatively related, at least in the case of hypothetical classic Greek etymology, to a 'place of deposit' (Chantraine, *Dictionnaire etymologique de la langue grecque*, p. 436, Klincksieck (Paris), 1999) but, apparently, it is not currently associated with the concept of 'value', now occurring in the 'documentary thesaurus' and more likely in the merchant use[4] of some 'data' bases.

[6] Concerning this 'trust *versus* fear balance', it is first assumed as 'trusts': 1 - any numeric document, 'new', original or 'old', converted from 'on paper' editions, will be then much more easily stored in more compact and durable supports; 2 - these new supports will allow, by means of informatics automated research 'motors', more extended, exhaustive and rapid identification and location of the searched 'topics', as follows: a - images as 'whole symbols', and b - keywords as 'sequences of numeric characters': letters, truncated and entire words, combinations of words…; 3 - the three ingenuous 'Socratic' fears just cited before[4] may became temporary; 4 - a last dilemma, on the possible identification of some 'new' concepts on the basis of 'old' words could be solved when, for example, converting and reorganizing 'data-' into ' knowledge-' as documentary bases, as later discussed here.

[7] Some diverse, recently published 'current opinions', based on the keyword 'lignin', now used under different meanings in various domains of molecular and polymer chemistry, biochemistry, biotechnology, biomechanics and wood- or pulp – paper- technology, could easily elucidate such cases. As, however, they sometime seem expressed in self-willed conflicting forms, as earlier,[2] they are not considered here any more.

[8] Most of these questions result from the fact that the 'meaning' of the words is progressively adapted according to the specific advances in each of these domains and thus it is changed in a

way unperceived by most of the non-specialists, and even more by the electronic 'automates' which collect the corresponding old 'words' either as such or as a highly elaborated, but *irrelevant* corresponding chain of numeric symbols and characters. An even worse situation could occur when, simultaneously, the significant word itself changes. This happened only few decades before, when mainly biochemists and botanists simply started to use the plural 'lignins', which is now the case of the macromolecular organisation of lignins in secondary plant cell walls (see for example, the commented references ([2]) and ([3])). The situation can be even worst, becoming an automated nightmare, in the case of the emergence of a concept under quite different 'names', selected according to their generic characters. Looking back again, a wiser and more clear illustration can be provided with the concerted emergence of both the word and concept of 'lignin', as found in some 'at least one century old' French 'papers'. The word 'lignine' was indexed as early as in 1819 by the botanist de Candolle (*Théorie élémentaire de la botanique*, p. 454 - *glossologie*, Deterville (Paris)) who enumerated the rough solubility and fractionation characters, much more precisely reported later in 1832 by a chemist (*Physiologie végétale*, § 5: *De la lignine*, p. 194, Bechet J. (Paris)) with reference to the 1796 study by Fourcroy and Vauquelin on the 'spontaneous effect of concentrated sulfuric acid on plant and animal substances' (*Annales de Chimie*, XXIII, p. 186 (1795)). Thinking as a physiologist, de Candolle explicitely stated in 1832, possibly without an enough 'strong emphasis' ... , that under the name of 'lignine'or 'ligneux', chemists 'confused two physiologically distinct compounds'; he also denominated the concept of 'matière ligneuse', suggesting the occurrence of botanical differences and physiological variations. This 'heterogeneity' was later on experimentally established by Payen and described in a suite of commented reports and memoirs (Payen, *Mémoire sur la composition du tissus propre des plantes et du ligneux*, *C. R. Acad. Sci.*, **7**, 1052 (1838), Dumas et al., *Rapport sur un mémoire de M. Payen relatif à la matière ligneuse*, *C. R. Acad. Sci.* , **8** , 51 (1839) and also *Ann. Sci. Bot.*, 2nd Ser., **13** , 305 (1840)) in which, according to the C-, O-, H- atomic ratio, the concept and name of 'cellulose' was clearly established; this was not the case of the word 'lignine', not used as such, even when exactly conceived from its atomic composition! Ironically, the same story could be told for the other later created 'names', such as 'lignose', 'lignol', 'lignone', ... now unused and already forgotten, similarly with 'fibrose' and 'vasculose' of E. Fremy, exactly conceived however. Even when the significance of the corresponding concepts was relevant, still remaining scientifically sound, the semantic diversity of such names, perceived only as 'data', were viewed and are still felt as highly stressing, strain and time consuming, once their detection assumes automatic devices based on 'simple' and even 'combined signs' – letters, words, keywords,... included in 'data' bases. As later outlined here, a potential solution of this 'fear' could be the possible identification of these 'names' not according to their 'signs' only, but also according to their 'sense', to be grasped on the basis of related 'concepts' and thus, as expressed in the literature, according to the 'scientific' links to their specific properties or 'generic characters', up to their expression in 'one-word-only', according to the 'knowledge' indexed in the corresponding 'data' base.

[9] As a mater of fact, each 'sub-theme' of this classification corresponds to the smallest set of diverse 'papers' perceived as sharing a sufficiently large generic sense. Materially, in a large book stand, a sub-theme may correspond to the title and heading given to one of the archive-box, where the sets of collected 'papers' have been logically or intuitively arranged. The definition and determination of the hierarchical position of sub-themes, themes and domains, has to be first viewed as relative to both the state of knowledge of the authors and to the place and date of base elaboration. In time, they should be changed as a function of the technical and scientific advances recorded. Roughly speaking, with respect to these unavoidable changes, the electronic edition would allow unexpected possibilities to quickly and exactly express original ideas, inventions and new concepts by 'copy-and-paste' re-organisation of parts of both 'new' and 'old' documents. Here involved is the other fascinating trust which remains, however, to be reconciled with the fearsome question of the 'property' and 'merchant' uses of knowledge, soon recalled.[4]

clic here for the next

ReDoc

[10] This type of 'recueil' has been recently developed at INRA, on the basis of a collection of 'papers', more than 8000, concerning the lignified plant cell walls, which were classified into 4 main domains: biological chemistry (C), metabolic biology (B), physical organisation (O) and lignocellulosic products (P). Of similar size, each domain was organized according to a hierarchical list of 10 themes and 60 sub-themes, each one corresponding to an archive-box, as described in the text. Also, the headings of these 260 thematic lists, the indexed lists of references and the hand-annotated copies of the first page of the 8000 'papers' were printed under 'exchangeable' formats, such as PDF or HTML,

using the commercial current software adapted to the conversion of texts and images as numeric files. These files were then assembled as electronic PDF 'file of files' under the acronym 'ReDoc', for 'Recueil Documentaire', *in French*, or documentary recollection (see above). Finally, they were organized as knowledge bases, by insertion of re-adaptable hyper-links between the data, keywords, images and thematic concepts. Several types of ReDoc have thus been constructed by hyper-linked combinations of relatively 'big, medium and small' files, of around 200, 50 and 10 Mb, corresponding, respectively, to the lists of 'annotated images of the first pages', 'indexed bibliographic references' and ' hierarchized thematic concepts'. Such a distributed organisation of files was set in order to more easily keep 'up-to-date' and/or reorganize these individual files. Characteristic of ReDoc, this construction also allows a more 'dynamic', evolutive possibility of collection, transfer and exchange of knowledge with such 'electronic' recueil, comparatively with the 'written or printed on paper' ones, soon considered as more 'static'.[4] Each ReDoc has been arranged as a triple set of files resuming, respectively, the thematic order, the reference lists and papers extracts, an arrangement which, for example, leads to a triade of files of about 500 Mb for 1000 pages, when describing each domain, a real Enneade, in the case of the four previously cited domains (C, B, O and P) of about 2 Gb.

As expected, such constructions allow an automatized exploration, using keywords and current research motors, in only a few minutes. Each ReDoc can be further 'renewed' as a conceptually new ReDoc by insertion under PDF format of files of new topics and 're-organized' versions by the copy-and-paste procedure of the selected parts. In this respect, the 'Socratic' fear[4] on the limited advantages of the transmission of knowledge 'written on paper 'could perhaps be erased? At the moment, however, a still in force constraint of the 'properties rights' still impedes any public diffusion of these ReDoc; by chance and necessity, any transmission 'for private use only' is however possible, and can be done 'on request'. Such type of construction has thus to be generically perceived as a model tool allowing a more rational driving and programming the *research* activities but, certainly, not the expected corresponding discoveries and inventions, which as obviously unknown ... remain 'not predictable'... , and thus imperatively require entirely free exchanges and transmission of knowledge.

clic here for the last,
then help yourself,
et donc 'Au revoir' !

clic here for
the next

VARIABILITÉ BIOLOGIQUE DES LIGNINES

BERNARD MONTIES

INRA: Equipe Parois Végétales et Matériaux Fibreux, CRA, 51686, Reims
INA P-G: Chaire de Chimie Biologique, Campus de Grignon, 78760, Thiverval-Grignon, France

This paper is dedicated to Prof. Cr. I. Simionescu to greet his tenacious and steady contribution to the development of open and free scientific exchanges, '*dans le respect de la diversité culturelle de chacun*'.

Received February 24, 2004

This review is strictly focussed on macromolecular chemistry views concerning the relations between the molecular structure of lignins, the possible self-organisation of lignin networks during plant cell walls lignification and the mechanical properties of woody plants and of their related products (pulp and papers, wood as composite material). Recent advances in genetic manipulations and biotechnological improvement of lignification cell walls and related products is emphasized as introduction. Then, the molecular organisation of lignins, the supramolecular aspects of lignification and, finally, some mechanisms of chemical morphogenesis and biomimetic synthesis are reviewed. A spatial-temporal model, combining activation and inhibition effects, is proposed to account the formation of lignin clusters observed during *in situ* lignification and *in vitro* synthesis of lignin polymers (DHP). This model and the corresponding molecular organisation hypothesis are discussed in relation to the so called 'self-organisation' effects, as depending on the cooperative interactions between cell wall components, including water, on autocatalytic initiation of lignin polymerisation by peroxidases, and on some physical and chemical intermolecular chain arrangement and rearrangement observed or suggested to occur during chemical pulping and mechanical deformation of wood. An English translation of this paper, more exactly expressed here in French, is in preparation for 'Internet open access', as the last of three reviews concerning the 'biological variability the states and processes of lignification' and the corresponding 'mechanical behaviour of woody plants and products'.

Key words : plant cell wall, xylem, morphogenesis, self-organisation, cooperative interactions, metachromatic behaviour, paper, wood material, cellulose, hemicellulose, pectin, lignin, lignin polysaccharide complex, LCC, DHP, fibre.

Cellulose Chem. Technol., **39**, *5–6, 341–367 (2005)*

INTRODUCTION

Durant ces vingt dernières années, les progrès significatifs en matière de biologie moléculaire végétale ont permis de mieux connaître la multiplicité des voies de métaboliques ainsi que la complexité des mécanismes génétiques qui contrôlent la biosynthèse des unités monomères constitutives des lignines. Complémentaires des connaissances établies déjà par les chimistes, polyméristes et mécaniciens des tissus de soutien végétaux, des bois, des pâtes et des papiers, ces avancées ont suscité de grandes espérances en matière de valorisation de ces composés lignocellulosiques naturels et de leurs produits dérivés : bois, papiers. De nombreuses publications et revues détaillées ont illustré cet engouement et les espoirs suscités par la possibilité de manipulation génétique de la lignine et des propriétés de ces produits lignifiées : seulement quatre d'entre elles, parmi les plus récentes et exhaustives, ne sont citées ici qu'à titre d'exemples,[1-4] faute de place.

Dans les domaines moléculaires de la biologie, des manipulations génétiques avancées ont, en effet, contribué à faire mieux identifier la diversité des 'lignines transformées', la variabilité des parois lignifiées correspondantes ainsi que la plasticité génétique et épigénétique des états et des processus de lignification. Par contre coup, elles ont aussi conduit, à retrouver plus exactement et à reconnaître plus généralement, certain des aspects caractéristiques des 'lignines naturelles' déjà bien identifiés et définis[1] dans les végétaux non transformés. Telles sont par exemples, dans les domaines de la biochimie, la variabilité de leur composition monomérique et des types de liaisons entre monomères des diverses lignines [1,5] ainsi que, dans les domaines de cytochimie et biologie générale, leurs différents types de localisation subcellulaire et de morphologie tissulaire observées entre les cultivars, les variétés, les espèces, les écotypes et les mutants.[3,6] Ces caractéristiques originales étaient pourtant déjà très clairement envisagée et discutée en détail dans les ouvrages 'anciens', édités respectivement dès 1952 et 1971 par F.E. Brauns et par K.V. Sarkanen,[7,8] par exemple.

Dans la perspective actuelle de valorisations des composés lignocellulosiques évoquées plus haut, la situation est pourtant devenue plus compliquée en terme de l'interprétation des résultats de ces transformations et donc de la prévision des effets de ces manipulations génétiques.

Ainsi, au plan de la prévision des résultats tant mécaniques que papetiers, des effets spécifiques et parfois très spectaculaires, d'ingénierie génétique ont été prévus et obtenus quand à la composition en monoméres et leurs modes de liaisons entre monomères.[2,4] Concernant des gènes particuliers à la biosynthèses des monomères, ces transformations pourtant bien ciblées, ont cependant permis de constater l'existence de multiples 'autres effets imprévus' sur les lignines en tant que polymères,[9a] ainsi que sur les parois végétales en tant que systèmes macromoléculaires organisés.[9b] Ces effets inattendus sont en général globalement expliqués en termes d'interactions et régulations métaboliques[10] et génétiques.[3] Des effets comparables, de types pléiotrope et épigénitique ont été d'ailleurs rapportés

aussi chez des mutants et cultivars de plantes non manipulées.[11-13] Affectant la structure et la biosynthèse et donc l'organisation pariétale non seulement des lignines, mais aussi des celluloses et des autres polymères osidiques, ces observations ont rendu plus difficile l'analyse moléculaire de ces effets, et donc la prévision fine des propriétés ultimes des parois végétales et des produits dérivés. Elles confirment encore,[9a, 9b, 11, 12] la nécessité de prendre plus finement en compte les mécanismes physico-chimiques d'organisation macromoléculaire 'spontanée' de ces systèmes, dont la diversité est souvent encore dissimulée sous le concept unitaire de 'autoorganisation'. De plus, ces observations laissent souvent sans réponse, la question du contrôle et de la régulation, par un ou plusieurs facteurs, de ces processus et des états correspondants de lignification. Bien que essentielle[3] en vue de la maîtrise ultime de la qualité des parois et produits lignocellulosiques, cette dernière question n'est pas considérée dans cette revue qui concerne surtout le domaine de la biochimie structurale. En dépit de ces limites, des relations originales et significatives ont été mises en évidence entre les 'propriétés de produits lignifiés' et 'les variations d'organisation moléculaires, au sens large, des lignines'. La grande variabilité de la lignification est maintenant ainsi bien démontrée[1-6] tant au plan de la production biologique que de celui des transformations technologiques. Dans le domaine de la papeterie, ce fait a été clairement exprimé par D. Dimmel et col.[13a, 13b] qui ont souligné, que '*la composition et la structure des lignines peuvent être manipulées bien au delà de ce qui avait été anticipé autrefois*' et que '*certaines qualités inusuelles des produits pourraient résulter de modifications du mode de dépôt des composantes des parois végétales en réponse à, et en compensation de, l'altérations de la structure de la lignine*'; ces deux aspects sont précisés par la suite.

Dans le domaine de la mécanique des parois végétales et de la technologie du 'bois-matériau', ces deux remarques sont tout autant applicables. Cependant, concernant l'interprétation des observations et la prévision des effets de transformations biotechnologiques, l'analyse des relations entre 'structure moléculaire' et 'propriété mécanique' est plus compliquée encore puisque les connaissances macromoléculaires des lignines sont beaucoup moins avancées que dans le domaine papetier. En matière d'effets moléculaires mécaniques de 'la' lignine, les analyses n'étaient qu'a peine ébauchées il y a quelques décades.[7,8] Elles ne sont encore actuellement que rarement pratiquées et interprétées en termes d'interactions moléculaires, de structures macromoléculaires et surtout d'organisation spatiale[14,15] des constituants des parois végétales. Actuellement, les comportements macromécaniques des bois et composites lignocellulosiques peuvent pourtant être représentés précisément au moyen de relations mathématiques multivariables prédictives des comportements des couches subcellulaires ;[16] ils sont aussi analysés au plan micromécanique, en termes d'ultrastructure orientée des fibres végétales dans les couches pariétales et des interactions entre les polymères constitutifs des bois.[9b, 16, 17] Parallèlement, le

comportement mécanique des composantes fibreuses de celluloses amorphes, soit indépendantes soit réticulées, peut être fidèlement simulées[18a,b] grâce aux procédures de mécanique moléculaire qui permettent de prévoir quantitativement l'importance des effets de déformations, de glissement et de fluage entre les chaînes polymères cellulosiques. Ces modélisations ont conduit à souligner l'importance mécanique générale des dimensions des interfaces, 'interphases polymères', dans les parois cellulaires des bois.[19] De plus, l'importance mécanique de tels effets aux 'interphases' est en accord avec les observations résultant de synthèses biomimétique récentes de composites mécaniquement résistants, comparables aux complexes lignine-polyosides naturels, et réalisés autant après modification de la surface de fibres cellulosiques[20] que après des mélanges avec des polymères naturels, amidons, que artificiels.[21] L'ensemble de ces données ouvre donc, malgré tout, des perspectives encourageantes de modifications tant biomimétiques que biotechnologiques des propriétés mécaniques et de l'organisation dite 'spontanée' des systèmes lignocellulosiques.

En fait, il s'agit là d'effets généraux d'auto-organisation, reconnus largement par ailleurs en biochimie[22a,b,c] et plus récemment en génomique appliquée.[23] Au plan strictement macromoléculaire de l'organisation des parois végétales secondaires et de leur lignification, ces potentialités peuvent être par exemples, déjà clairement illustrées: 1) au niveau organisation, par l'agencement hélicoïdal préférentiel de xylanes et de microfibrilles cellulosiques ensuite consolidé par lignification,[14]: 2) au niveau morphogenèse, par l'organisation progressive dans la paroi végétale *in vivo* de complexes lignine-hémicellulose sous forme de 'modules tubulaires' constituées de stuctures ressemblant à billes alignées, 'grains en chapelet'[15] et enfin: 3) au niveau biomimétique, par l'organisation spatio-temporelle *in vitro* de dehydropolymères modèles de lignines (DHP) tant à l'interface air/eau 'liquide'[24] que en phase 'solide' pecto-cellulosique;[25] ces trois aspects sont précisés par la suite.

OBJECTIF DE LA REVUE

Orientée par des perspectives de chimie macromoléculaires applicables aux propriétés mécaniques des parois et produits lignifiées, cette revue concerne avant tout les points de vue envisagés plus haut d'organisation et de morphogenèse chimique et biomimétique. Appliquée aux domaines papetiers et bois-matériau, elle vise les aspects moléculaires d'organisation et de morphogénèse des lignines tant *in vitro* que *in situ*, en prenant pour base quelques articles 'choisis' en complément des références citées en Introduction. En aucun cas, cette revue ne prétend donc à exhaustivité. Elle correspond plutôt à une version détaillée d'hypothèses présentées oralement par ailleurs, avec résumé,[26] concernant la 'Variabilité chimique et biologique des états de lignification' qui à fait suite à des revues plus biologiques.[9,11,12]

L'accent est donc mis ici sur la possibilité d'effets d'autoorganisation, impliquant des interactions moléculaires 'coopératives', susceptibles de conduire par autocatalyse à la formation de structures organisées,[15,25] d'agrégats résultant d'associations intermoléculaires 'colloïdales'.[7,8,22] C'est dans la perspective d'identification d'interactions moléculaires internes et externes à des complexes lignine-polyosides que sont envisagées par exemples ensuite, l'organisation des lignines d'échantillons de bois déstructuré par contrainte mécanique,[27] celle de structures fibreuses lignifiées tant *in situ*[14,15] que *in vitro*[24,25] et celle de tiges de mutants d'Arabidopsis[28a] et de Riz[28b,c] dont la déficience en cellulose est corrélée à des augmentations de teneurs globales en hémicelluloses et lignines sans que le déterminisme de ces 'effets de lignification' soit encore expliqué en termes de génétique appliquée aux particularités macromécanique du végétal.[9b,12]

ORGANISATION ET PROPRIETES DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES

Une des difficultés majeures rencontrée au plan structure moléculaire lors des tentatives d'explication des relations 'structure-propriétés' des composés ligno-cellulosiques est classiquement représentée par l'emboîtement hiérarchisées d'éléments, allant de 'l'échantillon de bois' aux 'molécules' tout en passant par les 'fibres végétales'et les 'couches subcellulaires'. Les figures 1 de deux articles cités[17,23] illustrent bien cet aspect. En effet, elles présentent ces 'éléments' constitutifs des parois végétales, rangés par ordre de taille, depuis la tige à la molécule. Au risque de devenir 'illisibles' de telles figures ne peuvent cependant pas rendre compte aussi, des interactions multiples, inter- et intra- éléments, qui font de la 'structure composée' représentée un '*système*', c'est-à-dire un '*ensemble dans lequel du fait de ses interactions, chacun des éléments perd toute ou partie de l'individualité symbolisée par l'image individualisée, artificielle et donc parfois artéfactuelle, qui spécifie chacun de ses éléments*', et qui ne leur est conférée que par le mode même de représentation. Outre l'énorme disparité d'échelle des tailles entre ces éléments, du nanomètre au centimètre, c'est surtout par la prise en compte de ces interactions, que sont donc abordées ici, les relations entre propriétés mécaniques et l'organisation macromoléculaire des composés lignocellulosiques.

Dans le domaine papetier, le caractère réussi, original et très significatif de certaines transformations génétiques réalisées a déjà été souligné en Introduction. Dans le cas de Peupliers 'transgéniques' pour la biosynthèse de différents monomères de lignine,[2,30] il a, par exemple, été possible d'expliquer les avantages techniques des conditions de mise en pâte, 'pulpage' chimique et de blanchiment, par des variations de 'simple' composition moléculaire des lignines (teneurs en liaisons α- et β-aryl-alkyl-éther labiles ainsi que en fonctions phénoliques ionisables) sans avoir à prendre en compte leur 'complexe' organisation supramoléculaire. Par

contre, dans le cas des performances macromécaniques, résistance à l'éclatement, à la traction de formettes des pâtes chimiques et surtout des pâtes mécaniques correspondantes, le degré de condensation des lignines s'est avéré bien moins discriminant et des propriétés physiques macromoléculaires telles que la transition vitreuse des lignines et le gonflement des polyosides ont du être impliqués, surtout dans le cas des pâtes mécaniques.[30] Un type d'effets semblable a été rapporté dans le cas cette fois de mutants 'naturels' de Pin, [13a,b] dont les caractéristiques macromoléculaires des lignines ont été analysée avec plus de détails, isolement et mesure de 'masses moléculaires' et de volumes hydrodynamiques de fractions de lignine, comparaison des cinétique des trois phases de cuissons alcalines et kraft, indice χ de permanganate des pâtes, formation et aspects de feuilles et formettes. Des différences significatives de qualité de ces produits ont été décrites et rapportées non pas seulement à la composition moléculaires des lignines et des polyosides mais aussi aux modifications correspondantes de leurs propriétés macromoléculaires et des interactions entre ces polymères ainsi qu'à l'arrangement spatial des 'fibres' dans les formettes de papiers. Bien que établies pour le moment sur la base de comparaisons d'un nombre limité d'arbres, ces données démontrent, sans ambiguïté, l'importance des modifications du mode de dépôt, morphogenèse, des divers polymère dans les parois végétales en réponse aux modifications génétiques et épigénétiques,[12] corrélatives à l'altérations de la 'structure' de la lignine' ; tel est certainement aussi le cas des mutants d'Arabidopsis et de Riz 'à tiges cassantes', cités plu haut. De nettes différences ayant été de plus observées sur ces effets en fonction de l'age, du génome et de la provenance de ces Pins mutants, ainsi que des Peupliers transgéniques, l'ensemble de ces résultats conduit à souligner l'importance des conditions biologiques de développement et donc des modalités de leur morphogenèse, tant biologique que chimique, envisagée ici ensuite.

A ce titre, l'importance relative des mécanismes de déformation entropiques des fibrilles élémentaires de cellulose, qui sont susceptible d'expliquer le retrait longitudinal des fibres papetières pendant leurs délignifications industrielle,[30 a-c] mérite une évaluation beaucoup plus fine. Il en va de même pour l'application de théories plus 'modernes', percolation dans les réseaux polymères par études de diverses délignifications papetières en réacteur à écoulement, qui ont confirmé l'existence d'au moins deux 'types de lignines' suggérée bien avant.[7-9a-b,12] Ces études ont permis, en effet, d'identifier deux sortes de fractions de réseaux polymères, 'gel de lignine', de polydispersités et dimension fractales différentes et qui proviendraient respectivement de la lamelle mitoyenne et de la paroi secondaire cellulaire.[31]

Dans le domaine du bois matériaux, le récent compte rendu de conférence de la Société Européenne de Mécanique du Bois édité par L. Salmen, l'ensemble des communications sur le thème 'Micromecanics'et les publications plus spécifiques de cet auteur[17,32] ainsi que d'autres déjà cités[12,16,19] ont montré sans ambiguité l'importance de l'orientation préférentielle des diverses composantes polymères fibreuses et amorphes, y compris des lignines[16,17,20,32 b,c] dans l'explication des

performances mécaniques statiques et dynamiques des bois 'natifs', non transformés, et des matériaux dérivés. La situation est tout aussi clairement illustrée dans les cas de plantes transgéniques et de mutants, déjà évoqué plus haut. Dans le cas des mutants à tige cassantes d'Arabidopsis,[28a] de très significatives réductions de la contrainte maximum et du module de flexion trois points, des tiges ont été observées et mises en corrélation avec une forte réduction de leur teneur en cellulose, sans que soit cependant observée de nette variations des teneurs globales en hémicellulose et lignine, ce qui n'est cependant pas le cas chez les deux mutants de Riz.[28b,c] Pour expliquer la faible résistance relative des tiges d'Arabidopsis mutants à la compression, en absence de variations claire de lignification et alors que les teneurs en lignines sont couramment corrélées à ce mode de résistance, dans les bois de compression par exemple,[27, 33] il est raisonnable d'admettre avec ces auteurs que c'est l'organisation spatiale même des lignines, qui est modifiée en conséquence de la déficience correspondante de la structure cellulosique. Dans le cas des Riz mutants, par contre, une 'compensation' mécanique par lignification est envisable; elle pourrait résulter non seulement d'un effet 'quantitatif' de masse de matière mais aussi 'qualitatif' de réticulation, d'organisation spatiale et de réarrangement spatial des enchaînements polymères pariètaux. Cette hypothèse, qui mérite cependant validation, est cohérente avec de nombreuses autres observations biologiques, concernant a: l'orientation anisotrope des monomères des lignines au contact des fibres cellulosiques, b: la réorientation de fibres cellulosiques des parois secondaires en cours d'épaississement lors de leur lignification, c: la modification par des inhibiteurs de la biosynthèse des celluloses, des modalités de dispersion des lignines dans les trachées vasculaires de Zinia, et enfin d: la similitude de comportement avec d'autres mutants à tige cassantes, Riz et Fétuques, qui ont déjà été revus par ailleurs.[9a,b,11,12]

De plus, toujours dans la perspective de la caractérisation fine des propriétés mécanochimiques des assemblages lignocellulosiques, il est important de considérer aussi l'existence d'effets de solvatation *in situ* des composantes polymères par des molécules 'simples', de l'eau en particulier. L'existence d'intenses effets mécaniques de plastification de systèmes polymères par solvatation et hydratation a été clairement décrite et précisée depuis longtemps de façon générale[34] ainsi que dans les cas spécifiques de fibres papetières[30a,b] et des bois.[17] Une illustration complémentaire est fournie par les modifications des propriétés viscoélastiques de tiges de Tabacs pourtant peu lignifiées,[35] induites par manipulation génétique de lignification. Comparant les modes de relaxation des contraintes et les composantes des modules viscoélastiques dynamiques des xylèmes normaux et manipulés de ces tiges à différentes vitesses, humidités et températures, les auteurs ont observé des comportements reproductibles, mais différents de ceux de bois mature. Ces comportements rappellent ceux de gels peu réticulés ou de solutions de polymères très enchevêtrés. L'existence d'importants effets de déformation permanente, observés surtout chez les plantes modifiées

conduit donc à admettre, avec ces auteurs, une réduction du degré de réticulation des polymères pariétaux dans les transformants, en particulier celle de leurs éventuels complexes lignine-hémicellulosiques. Comme de plus ces effets dépendent de la température et sont accentués à l'état humide, il est justifié d'admettre aussi, au niveau moléculaire, l'existence d'un déploiement par fluage sous contrainte des chaînes polymères, 'désenchevêtrement', facilité par l'hydratation, 'plastification', de ces enchaînements. Ces chaînes et complexes polyosidiques éventuellement lignifiés, seraient ainsi préalablement repliés en 'pelote', dans l'état 'natif' du xylème. Alors que nombre d'autres possibilités d'explications sont évoquées par les auteurs, un tel modèle par 'déploiement – repliement', classique[34] et simple, semble suffisant et cela, même si les interprétations proposées par ces auteurs des résultats d'extraction, d'identification et de plastification chimique d'une 'fraction' de lignine, dites 'soluble', exige absolument validation.

Au total, et quelles que soient donc les interprétations sur ces derniers points, ces observations, jointes aux précédentes, confirment l'intérêt de tenter de formuler plus en détail , *au niveau moléculaire*, des '*possibilités d'interactions susceptibles d'affecter les propriétés supramoléculaires des systèmes lignocellulosiques*'. A ce titre, trois aspects structuraux, évidemment non exhaustifs, sont donc abordés par la suite; ils concernent, respectivement, l'organisation supramoléculaire puis la morphogénèse chimique et biologique d'agrégats de lignines et enfin, pour terminer, des aspects plus biologiques, hétérogénéité correspondante des fractions de lignine et mécanisme de peroxydasiques amorçant la polymérisation des précurseurs phénoliques.

STRUCTURE ET ORGANISATION DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES

Concernant d'abord, l'organisation supramoléculaire des lignines *in situ* tout en restant dans le domaine de la macromécanique des bois, des observations cytochimiques faites après coloration métachromatique de faciès d'organisation d'échantillons de fibres papetières isolées[36] et de bois avant[37-39] et après contrainte mécanique[27] permettent de préciser le première aspect. En effet, des travaux parfois relativement anciens et confirmés ont démontré de nettes différences, 'séparations de couleur', de coloration induites par des colorants définis en présence de différents substrats. Ces séparations sont dépendantes à la fois de la concentration en colorant cytologique, de l'état du 'milieu solvant' environnant et du traitement physico-chimique préalable des substrats observés et, ici lignifiés. Ces observations ont été interprétées en terme d'association-dissociation des molécules de colorants au contact de ces objets, donc en fonction de la réactivité de surface des interphases correspondantes, et donc aussi en particulier ici, de celles des lignines. Ainsi, dans

le cas de fibres papetières isolées,[36] des variations de couleurs du rouge au vert clair, 'métachromatisme', d'acridine orange adsorbée sur des fibres, thermo-mécaniques et chimiques, ont été attribuées à la présence de lignines parce que la fraction 'cellulosique' n'est pas alors affectée. L'intensité de ces variations a été corrélée aux quantités de lignine résiduelle liée à ces fibres papetières purifiées. Ces effets métachromatiques sont donc attribuées à l'adsorption du colorant sous formes respectivement de monomères pour la couleur verte et de dimères et oligomères pour la couleur rouge. Dans le cas de désorganisations mécaniques par contrainte délibérée[27] ou accidentelle lors de coupes cytologiques[37,38b,39] ou de prétraitement chimiques,[38a] des effets métachromatiques analogues, qui peuvent être aussi envisagés comme des artéfacts analytiques,[9b] ont été décrits avec d'autres molécules simples colorantes et/ou fluorescentes. Spécifiquement rapportées à l'état local de la lignification et non pas seulement aux quantités globales de lignines, ces changements de colorations ont été aussi attribués à la rupture de liaisons entre lignine et cellulose démasquant cette dernière.[27] Attribuables aussi à l'existence d'associations réversibles entre molécules adsorbées de colorants, elles semblent donc résulter d'interactions plutôt supra- et macro-moléculaires colloïdales, impliquant des complexes ligno-cellulosiques pariétaux au sens large. Dans la premiere perspective, la possibilité de rupture mécanochimique de liaisons de valence, avec formations de radicaux libres et désorganisation de la phase lignifiée supportée, ne peut être exclue à priori.[40] La possibilité et même l'activation de tels clivages de liaisons covalentes lors de confinement de sites réactifs aux interphases est en effet démontrée expérimentalement.[41,42] Cependant, la possibilité de modification des modalités d'interactions non covalentes, de type ioniques, hydrogène et surtout dipolaires à courte distance, dites 'hydrophobes', semble au moins tout autant à prendre en considération dans la mesure ou chacune d'elle est susceptible de faciliter l'organisation de systèmes supramoléculaires stabilisés par interactions de coopérativité lors de la formation de ces liaisons. Cette dernière modalité conférerait ainsi au processus moléculaire global d'organisation le caractère spontané d'autoorganisation observé. Dans ces conditions, la possibilité d'intercalation de molécules monomères de colorants par 'face à face' entre les cycles aromatiques des lignines dans les agrégats préexistants des réseaux polymères de lignine reste possible ; elle été clairement démontrée.[43] Ce dernier mécanisme est suffisant pour rendre compte des différents effets métachromatiques cités plus haut, par un effet non covalents, dit 'monomérisant', attribuées aux lignines 'natives'. Déplaçant les équilibres d'associations, dimérisation non covalente, établis en phase aqueuse entre molécules monomères de colorants, la combinaison de ces interactions provoquerait la recomposition d'associations stables inhibant le métachromatisme, même en milieu aqueux concentré. Cependant, il est vraisemblable que le processus de 'monomérisation' soit en fait plus compliqué comme semblent l'indiquer quelque observation spectroscopique des interactions

entre des colorants et des complexes lignine- hémicelluloses pectiques, des lignines et même des acides phénoliques.[44a,b,c,45] Ces dernières observations suggèrent, en effet, l'existence de transferts électroniques et complexes par transfert de charges dont les particularités ne peuvent être discutées davantage ici. Visant surtout les aspects mécano-chimiques des parois lignifiées, ces données et hypothèses conduisent à expliquer, au moins en grande partie, ces effets métachromatiques mécaniques[27,37,38b] par des modification de l'organisation même des lignines déposées au cours de la biosynthèse au contact du 'réseau fibreux cellulosique', au sens large. Une telle réorganisation serait ainsi induite en conséquence de la déformation par 'déploiement–repliement', des structures fibreuses lignifiées qui seraient donc ensuite susceptibles de stabilisations ultérieures, biologique et/ou technologique, évoquée en Introduction.[13,14,19,28] Les facteurs, 'moteur moléculaires', en seraient donc surtout la réorganisation sous contrainte des interactions hydrogènes et à courte distance consécutives au dépliement par fluage relatif des chaînes polymères en particulier polyosiques,[34,18a,b] mais aussi très vraisemblablement des fractions les plus souples, peu réticulées et plus linéaires, des réseaux lignines.[12,31,35] Le mécanisme mis en jeu serait alors analogues à ceux déjà analysés et bien admis dans le cas des acides nucléiques[46] et plus récemment étendu à des stuctures composites d'hétéroglycanes, de protéiques fibreuses[63] mais aussi globulaires plus ou moins repliés des ARN et ADN.[47] Les effets métachromatiques observés après désorganisation mécaniques du bois[27] résulteraient alors de la désorganisation des agrégats de lignines induite par la déformation par extension irréversible des chaines polyosidiques non cristallines pariétales. Ces dernières seraient auparavant statistiquement repliées en pelote dans leur état biosynthétique 'natif'. Les molécules de colorant adsorbés auraient d'autant plus de possiblité d'interactions stables que elles seraient supportées à distance et donc encore 'monomérisées' par les chaînes plus souples des 'pelotes repliées' polyosidiques, à la stabilisation des quelles elles contribueraient de plus. Sur cette base, il semble raisonnable d'admettre l'existence d'une '*organisation supramoléculaire concertée*' entre les réseaux de lignines et ceux des structures fibreuses non seulement glycosiques et hémicellulosiques mais aussi protéiques qui préexistent dans les diverse couches des parois primaires végétales. De tels effets concertés pourraient avoir lieu autant durant le 'dépôt' des lignines par biosynthèse, que après lors du vieillissement et les transformations industrielles technologiques par voies mécaniques et ou chimiques des produits lignocellulosiques. Seul, le premier de ces aspects est envisagé par la suite.

Enfin, et toujours en terme d'organisation, la présence d'importantes quantités relatives d'eau, déja envisagée plus haut, eau dite 'libre', de 'solvatation', de 'structure', etc. ..., dans tous ces produits mérite d'être soulignée, l'eau devant être de ce fait considérée, au même titre que les polymères majeurs en masse, comme une des quatre 'éléments' qualitativement majeurs et intégrants des

'systèmes' ligno- hémi-cellulosiques. Extrapolant aux monomères et surtout aux oligomères phénoliques moins polaires des lignines, une des relations formulée récemment à propos du comportement des colorants métachromatiques,[47] il semble possible de représenter le comportement associatif des complexes solvatés entre 'les' lignines : L, et 'les' fibres cellulosiques : C, en milieu solvant : S, ici l'eau, par la relation (1):

$$(1) \qquad (L - S) + (P - S) = (LC - S) + (S - S)$$

dans laquelle S représente non pas la seule molécule d'eau mais ses agrégats supramoléculaires. Une telle relation suffit pour exprimer ici, le fait que des réarrangements du 'solvant' aux interphases de ces composantes, interviendraient tout autant en terme d'organisation, structurale et thermodynamique, qu'interviendraient aussi des réarrangements des polymères, eux même solvatés, lors des transitions d'état et de déploiement – repliement de leurs chaînes sous contraintes, envisagés plus haut. Faute de données quantitatives plus précises sur ces complexes LC, il n'est pas possible d'en prolonger davantage la discussion. Au total , il suffit alors de souligner que de nombreuses publications peuvent dés à présent servir de base pour aborder, sous ces aspects d'organisation moléculaire, les mécanismes chimiques et biologiques qui déterminent la mise en forme des lignines en présence de polymères osidiques. C'est le cas pour des polyosides plutôt 'acides', hémicellulosiques et riches en pectine,[14,25,44a,b] de ceux plutôt 'neutres', à base de celluloses,[13, 17, 18, 20, 21, 29] tous considérés comme 'hydrophiles' alors que la polarité des lignines serait de l'ordre de celle d'alcools à courte chaîne: propanol,[25] et cela, sans oublier l'existence de fonctions ionisables de type carboxyles et surtout phénoliques dont l'acidité activée par des effets de confinement[42] justifierait les effets métachromatiques de 'la' lignine avec les 'colorants basiques'.[9b,36-39]

STRUCTURE ET MORPHOGENESE DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES

L'existence d'arrangements structuraux caractéristiques de 'la' lignine dans les parois végétales à l'échelle du micromètre est établie depuis longtemps.[7,8,14] Des données précises concernant la morphogénèse des parois lignifiés et la mise en forme des lignines en présence des microfibrilles cellulosiques, à l'échelle supramoléculaire du nanomètre, n'ont pu être obtenues que récemment.[14,15,51] Elles montrent que, en présence de fibres cellulosiques, la lignification est distribuée, parfois très régulièrement, sous forme d'agrégats, de granules de lignine, de tailles diverses de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, et qui suivent l'orientation des microfibrilles. En accord avec les publications moins récentes, ces observations

sont interprétées, comme indiquant que l'organisation et donc la polymérisation des lignines est affectée mais affecte aussi celle des polyosides pariétaux préexistants. A ce titre, les données et conclusions de N. Terashima et de ses collaborateurs[15] sont très significatives au plan de la formation de 'lignine macromoléculaire'. Dans le cas du xylème d'un type de conifère, *Gingko*, ces auteurs ont montré l'existence de dépôts granulaires, alignés en chapelet au long des microfibrilles de celluloses qui sont elle même engainées de diverses hémicelluloses. Ils ont fourni une estimation des dimensions respectives de ces grains, 'modules de lignine', et de la part relative des ces composantes en suggérant des possibilités d'un contact 'intime' entre hémicelluloses et lignines. Ces dernières seraient ainsi synthétisées et réparties de façon hétérogène. Soulignant aussi l'existence, en cours de lignification, d'un alignement relatif et régulier de ces 'grains de lignine' dans les couches de la paroi secondaire, mais non pas dans les coins plus lignifiés des même cellules, ces auteurs ont de plus admis l'existence de sites de 'nucléation', point d'amorçage localisé de la polymérisation des lignines, qui serait dans ces conditions, déterminée par la structure moléculaire répétitives d'hémicelluloses spécifiques, en accord à d'autres publications.[4,51b]

Significatives et importantes au plan expérimental, les observation de ces auteurs concernant la morphologie et la variété de répartition des 'grains de lignine' *in situ* méritent aussi commentaire au plan méthodologique. Bien que établies et discutés de façon extrêmement précise et rigoureuse, ces interprétations et hypothèses ne sont fondées, pour le moment en effet, que sur des observations cytochimiques d'un seul type de bois mature. Très encourageantes, elles méritent cependant validation en terme de structure moléculaire par d'autres méthodes et d'autres plantes. Par exemple, elles pourraient être parallèlement validées par une approche 'plus biologique' de cette 'mise en forme structurale' au cours de lignification, en utilisant, en particulier, des mutants ou plantes transgéniques, évoqués en Introduction. Ce type d'étude systématique de morphogenèse *in vivo*, n'a pas été encore rapportée à notre connaissance. La complexité d'interprétation des résultats envisagée en Introduction suggère même qu'elle serait aussi lourde à conduire que délicate à contrôler et surtout à interpréter. Ces contraintes nous ont ainsi encouragé à poursuivre une approche plus 'chimique' de la mise en forme macromoléculaire des lignines, par modélisation et synthèses de types biochimiques[52a,b] et enzymologiques[52c] qui ont déjà permis de confirmer la possible '*hétérogénéité moléculaire*' *in vivo* des lignines.[9a,11,12]

Artificielle, simplifiée mais classique car depuis longtemps reconnue comme source d'hypothèses et d'informations pertinentes dans le domaine de la biosynthèses des lignines, la synthèse *in vitro* de DHP, modèles de lignines par dehydro-polymérisation oxydative, a donc été conduite avec B. Cathala, en équipes, par analyses des aspects physico-chimiques de la formation de DHP en phases aqueuses hétérogènes, 'morphogenèse chimique', tant aux interfaces, qu'en 'solution' et 'phase colloïdale' à base de pectines avec présence éventuelle de fibres de cellulose bactérienne.[52,5 3a,b,c]

Premièrement, concernant des synthèses réalisées aux interfaces[24c, 53a] les analyses ont montré des effets sur la composition moléculaire, structure primaire,[6] des DHP par modifications de la fréquence relative des types de liaisons intermonomères,[24a] mais aussi sur les structures secondaire et tertiaire, organisation intra- et supra-moléculaire, avec augmentation des tailles moléculaires, rayons hydrodynamiques,[24b] ainsi que de la fréquence relative des liaisons aryl-alkyl-β-éther, en présence de pectines.[24c] En accord avec de précédentes observations,[52] ces résultats confirment en particulier, la possible existence *in vivo,* de deux types extrêmes de fractions de lignine à structure secondaire de type soit plutôt ramifié, en bloc, soit plus linéaire et enrichie en liaisons aryl-alkyl-β-éther déjà décrites par ailleurs (Figures 1[9b,11,12]) et qui, elles même seraient finalement agrégées *in situ,* 'cluster'. [7,12] Il convient de souligner à ce propos que la biosynthèse du second type de lignine, enrichie en liaisons β-aryl-alkyl-éther, a été suggérée aussi en fin de lignification dans la parois secondaire du *Gingko* par N. Terashima *et al.*[15] Ces auteurs ont proposé en effet, qu'il y ait formation de ce type particulier de liaison à l'extrémité même des lignines en croissance pour expliquer le fait que les structures granulaires ne soient plus observées et donc moins bien individualisées en fin de différentiation des parois secondaires. Ils ont rappelé à ce propos la possibilité d'une organisation macromoléculaire 'modulaire', selon M. Waymann qui est discutée ici par la suite.

Secondement, concernant la morphogenèse de lignines en présence de solutions aqueuses de pectines, des synthèses de DHP ont été faites avec polymérisation peroxidasique, par addition lente, durant 10 heures, du monomère alcool coniférylique et de peroxyde d'hydrogène dans une solution aqueuse de pectine.[25a] Dans ces conditions, il y a formation d'une solution colloïdale stable de complexe LC, DHP–pectine, à l'opposé d'addition plus rapide qui entraîne leur précipitation.[25b] Leur caractérisation physique a révélé trois principaux ensembles de résultats.

D'abord, **A**, la formation progressive en solution colloïdale, de microdomaines de faible polarité relative, 'hydrophobes', mise clairement en évidence après moins d'une heure de réaction par la modification caractéristique des bandes de fluorescence du pyrène moléculaire, utilisé comme sonde monomoléculaire,[25a] et cela sans évidence de localisation macromoléculaire confondue des DHP et des pectines.

Ensuite, **B**, confirmant la possibilité d'hétérogénéité locale des ces complexes LC, des observations par diffusion de lumière visible ainsi que de neutrons,[25b] ont permis de décrire la dynamique d'organisation spatiale de ces complexes sous forme d'agrégats, de forme globalement semblable à celles des 'grains modulaires' du xylème de Ginkgo.[15] Dans le cas de ces DHP, les agrégats hydrophobes et restant stables lors de dilutions, présentent une organisation très hétérogène en trois phases avant tout aqueuse puis pectique et polyphénolique, DHP. Ces deux dernières phases sont denses et homogènes à l'échelle de 5 nanomètre alors que les

agrégats qu'elles forment ont une dimension caractéristique, en diffusion des neutrons, de la dizaine de nanomètres, voisine de celle des 'grains de lignine' déjà rapportés *in situ*.[15] De plus, et alors que ces phases sont séparées, la croissance relative de leurs interfaces a lieu cependant de façon parallèle, observation qui conforte les suggestion de '*compensation concertée*' entre dépôts de cellulose et lignines de plantes modifiés par transgenèse.[13,28]

Enfin, **C**, au long de ces dix heures de réactions morphogénétiques, la densité locale moyenne globale des agrégats est multipliée sensiblement par un facteur 3 alors que la quantité relative en interfaces varie en sens opposé.[25a] Cette évolution est corrélative à une forte densification nette de la phase pectique (300 %) mais, à l'opposé, très faible pour la phase DHP, qui de façon inattendue diminue même légèrement (40 %) et cela, d'abord de façon monotone puis avec des oscillations significatives après 6 heures de réaction. Conduisant ainsi à la formation d'agrégats complexes pectino-ligneux, hétérophasiques d'abord très fortement gonflés d'eau puis devenant plus 'hydrophobes' et rétractés au cours du temps, cette évolution correspond à un processus de 'morphogenèse chimique'[56b] qui se traduit par une perte progressive d'eau liée à la phase pectique des agrégats et qui correspondrait vraisemblablement à un repliement, 'en pelote', des chaînes pectiques en conséquence du '*dépôt de lignine exerçant dans ces conditions un rôle moteur et déterminant dans ce processus par la mise sous contrainte mécanique de l'ensemble*'.

Troisièmement, concernant la morphogenèse en présence de fibres cellulosiques incorporées de pectine, des synthèses de DHP ont été réalisées dans un réacteur comportant une cellule à membranes semi perméables, séparant des solutions d'alcool coniférylique et de peroxyde d'hydrogène, par diffusion et polymérisation peroxidasique durant 10 jours.[53a] Par référence à la synthèse sur cellulose seule, la pectine, pourtant présente en faible teneur relative de 10%, exerce dans ces conditions un effet de compatibilisation entre DHP et cellulose, qui est particulièrement bien révélée par la 'forme' même des agrégats de lignine observés en surfaces des fibres composites (Fig. 1). De forme ovoïde et de taille variée en absence de pectines, les agrégats visualisés par microscopie électronique à balayage sont répartis de façon plus uniforme en présence de pectine en surface du matelas fibreux; ils sont d'une taille moyenne plus faible, de l'ordre du micromètre et ils recouvrent plus uniformément les fibres, 'compatibilisation'. De plus, alors que seulement une faible fraction, environ 25%, de DHP reste insolubilisée sur le matelas fibreux, cette fraction de DHP est significativement enrichie en liaisons β-aryl-alkyl-ether. Cette dernière constatation d'une variabilité de la structure primaire des DHP, et donc vraisemblablement des lignines, concorde bien avec celles déjà rapportées lors de synthèses analogues conduites en 'solution concentrée' de pectine[52a] mais non en conditions différentes, plus diluée.[25b] Déjà mentionnées plus haut et discutés aussi par ailleurs,[53a] cette variabilité ne peut être davantage discutée encore ici du fait du nombre élevé de facteurs, '*complexité*', qui semblent la déterminer.

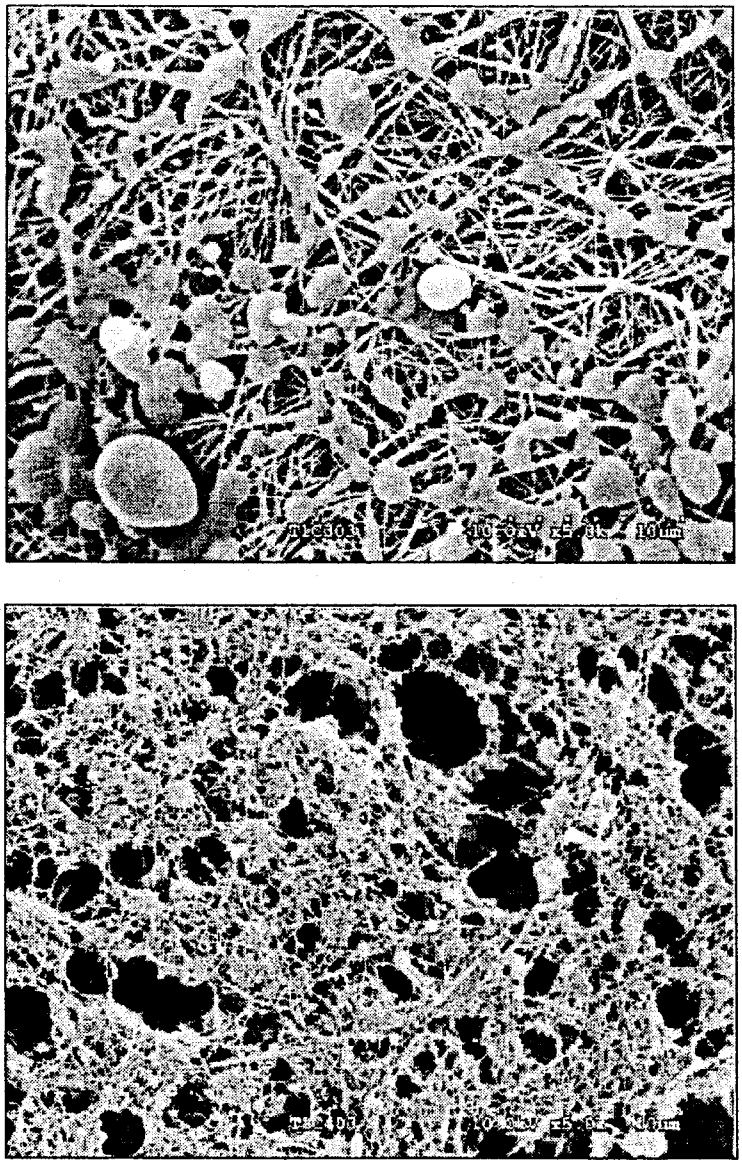


Fig. 1. – Organisation spatiale de DHP, vue par microscopie électronique à balayage, en surface des matelas composites fibreux formés au contact de la membrane semi perméable du réacteur à diffusion du coté H_2O_2, en surface des fibres de cellulose bactérienne, en absence (**vue de gauche**) et en présence de pectine (**vue de droite**); *la largeur totale de chaque vue correspond à 25 micromètres.*
(DHP spatial arrangement, shown by scanning electron microscopy, at the surface of fibrous composite mats in contact to the hydrogen peroxide side of the semi permeable membranes reactor synthesized along the bacterial cellulose fibres without (**left view**) or with (**right view**) of pectin occurence; *the total width of each view correspond to 25 micromèter.*)

Au total, ce triple ensemble d'observations montre donc, sans ambiguité, la possibilité de morphogenèse chimique de LC tout en confirmant la valeur descriptive et prédictive de l'approche expérimentale de la variabilité des processus de lignification par synthèse chimique modèles. Elles conduisent de plus à envisager aussi de façon plus fondamentale, ici en termes d'effets thermodynamiques

d'organisation spontanée et d'auto-organisation, cités en Introduction, l'ensemble de ces mécanismes moléculaires, simplifiées, mais cependant 'complexes', qui déterminent les particularités structurales et la dynamique de mise en place de ces modèles LC. En effet, prenant base les formulations théoriques dues à I. Prigogine et son école,[55] les termes 'simple', 'complexe' et 'auto-organisation' signifient ici que les modèles LC, de synthèse, sont relativement plus simples que les parois biologiques, car ils impliquent moins de facteurs explicatifs, mais qu'ils sont cependant encore suffisamment 'complexes', voir ici aussi la variabilité primaire des DHP, pour permettre l'existence d'états stationnaires de non équilibres[55a] et donc pour pouvoir, '*donner naissance, sous certaines conditions, à des phénomènes d'autoorganisation à l'échelle macroscopique sous forme de rythmes temporels et de motifs spatiaux*'.[55b] D'après ces principes, les processus d'organisation spontanée sont initiés à l'échelle moléculaire, microscopique[55c] par des 'fluctuations', évènements thermodynamiques localisé à l'échelle microscopique.[55a,b] Au plan de la chimie macromoléculaire structurale, la proposition faite ici n'est pas fondamentalement originale ; la formation de structures organisées discontinues dans des réacteurs à diffusion, par 'morphogenèse chimique', a été décrite depuis longtemps,[56a] selon ces principes, et elle est largement et clairement confirmée.[56b] Par contre, au plan de la biologie générale[55c] et plus particulièrement ici, des processus de lignification tant *in vivo* que *in vitro*, cette possibilité ne semble avoir été envisagée que récemment.[11,12] Dans le règne animal cependant, la différentiation de structures ainsi que des cas spécifiques de morphogenèse chimique ont été analysés depuis plus longtemps et dans cette même perspective par H. Meinhardt et A. Gierer.[57] Soulignant l'insuffisance des effets d'inhibition à distance pour expliquer la création de formes, ces auteurs ont très clairement démontré la nécessité d'effets complémentaires d'activation auto-catalytique permettant de justifier que la structure en formation puisse inhiber celle de ses voisines sans être inhibée par elle-même, explicitant ainsi aussi concept flou d'autoorganisation, comme déjà tenté ici en Introduction. Un '*modèle moléculaire de morphogenèse chimique appliqué à la lignification*' est donc proposé ici (Fig. 2). Faute de données expérimentales plus systématiques, il vise seulement à expliciter un mécanisme moléculaire global ; la Figure 2 propose donc une représentation spatio-temporelle de formation, compétitive et concertée, d'agrégats de DHP et donc indirectement de lignines. Selon ces principes, la formation d'agrégat serait initiée par 'fluctuation' locale de, par exemples, la composition en substrats, les conditions de diffusion, les 'activités', affinité chimique et potentiel thermodynamique, mais aussi les conditions locales de milieu, acidité et surtout potentiel redox. La polymérisation oxydasique étant ainsi amorcée, la combinaison de radicaux libres conduirait à une accumulation de DHP, avec insolubilisation localisée d'autant plus forte que elle serait rapide. L'activation autocatalysée de formation de radicaux libres monomères, observée avec de nombreuses peroxydases, en serait le facteur

déterminant ; cet aspect est précisé par la suite. En fonction du temps, il y aurait donc d'abord accumulation localisée (courbes en cloche continues: Fig. 2) suivie d'inhibition de cette dernière par compétition au niveau des radicaux libres monomères et même oligomères. Elles procèderait donc par réactions 'activatrices' au niveau du site catalytique et réactions 'inhibitrices' de combinaison avec les fonctions les plus réactives et nouvellement formées par polymérisation en surface du DHP (courbes en cloche discontinues: Fig. 2). En accord avec des mécanismes établis, l'intensité relative de ces dernières réactions dépendrait non seulement de conditions physiques, adsorption et transferts d'états électroniques[58a,b] mais aussi de facteurs chimiques, potentiel redox et couplages électroniques et complexes par transfert de charges.[59a,b] La formation des agrégats à distance régulière ou non,

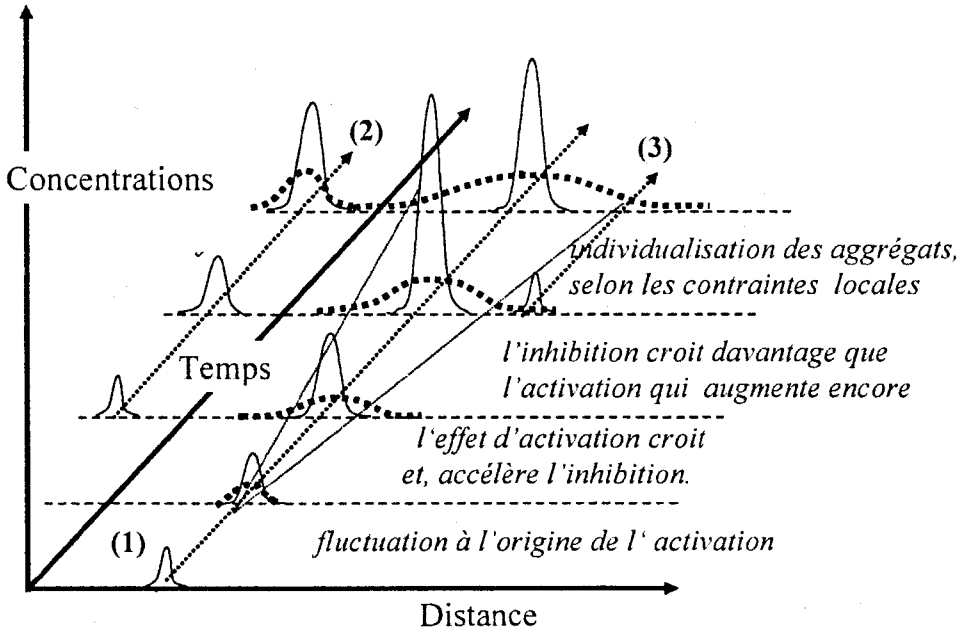


Fig. 2. – Formation d'agrégats, structures granulaires de DHP, par 'morphogenèse chimique', combinant des effets antagonistes d'activation et d'inhibition des réactions de polymérisation de monomères et de fragments oligoméres de lignines. La formation d'un premier agrégat (1), initée par 'fluctuation locale', induit en fonction du temps l'activation autocatalysée de radicaux monomères, entrainant la polymèrisation de chaînes oligomères formant l'agrégat par leur accumulation d'abord localisée et rapide (courbes continues de distribution en cloche) puis plus étendue et plus lente en extrémités des enchainements polymères (courbes discontinues). La formation des agrégats (2) et (3) est affectée par de la présence des chaines voisines ; elle est alors possible (2) ou non (3) en fonction des types de 'distances' et des interactions moléculaires coopératives, voir texte.

Fig. 2. Formation of 'clusters', granular structures of DHP, during 'chemical morphogenesis' involving the antagonist effects of activation and inhibition of the polymerisation reactions of free radical monomers and of oligomeric fractions of lignins. The formation of a first aggregate (1), initiated by 'local fluctuation', induces as function of time, an autocatalyzed activation of monomers with formation of the aggregate by accumulation first localized and fast (continuous bell-shaped distribution curves) then more extended and slower (discontinuous curves). The formation of other aggregates is possible (2) or not (3) depending of the 'distance' types and the cooperative molecular interactions, see text.

dépendrait donc finalement à la fois de leur 'distance spatiale', suivant les repliements des enchainements de fibres et de leur 'distance réactionnelle', fonction des vitesses et durées relatives de diffusion des radicaux et espèces en interactions.[57] Les effets métachromatiques, les phénomènes de 'monomérisation' par intercalation de molécules solvatées simples et le désenchevêtrement des chaînes lignocellulosiques sous contraintes, envisagées plus haut, sont compatibles avec ce modèle et paraissent susceptibles de bien le valider. D'une part, la lignification des agrégats, provoquant leur rétraction, mettrait sous contrainte de compression les chaîne polyosidiques, en accord avec les mécanismes moléculaires couramment admis lors de la formation des bois de compression.[27,33] D'autre part, les déstructurations mécaniques et pulpages, relaxeraient ces contraintes, d'autant plus aisément qu'interviendraient aussi des effets coopératifs de clivages de liaisons et des effets entropiques de réorganisation des couches de solvatation.[30a] La formation de lignines de type plutôt 'tridimensionnel' ou plutôt 'linéaire', envisagée aussi ensuite, pourrait affecter aussi la dynamique et les effets de ces associations, par la modification de la conformation supramoléculaire, quaternaire,[9a] des chaînes osidiques lignifiées. Les différences d'intensités métachromatique décrite selon les tissus végétaux[37,38a] et après simple déformation réversible en résulteraient donc aussi, comme semblent susceptibles d'être aussi modifiées les identifications immunocyto-chimiques correspondantes.

Les bases macromoléculaires de 'morphogenèse chimiques' du modèle étant présentées, des aspects plus dynamique, métaboliques et physiologique, sont envisagés, en quatre points, dans une perspective correspondante modèle de 'morphogenèse biologique'.

Le premier point concerne le modèle macromoléculaires,'en modules', proposé par N. Terashima[15] suivant M. Waymann.[60] Il fut établi globalement, sur la base de synthèse de DHP, de dépolymérisation chimique par 'pulpage' de bois et DHP et enfin de fractionnements par perméation sur gels des composés obtenus. Sur la base de distributions bimodales, qui sont compatibles avec des données plus récentes,[25b] ces auteurs ont proposé l'existence de deux sortes de fractions, 'assemblages stables', à partir des DHP et des lignines natives, dont le degré de polymérisation serait de l'ordre respectivement de 500 et de 20. Ils les ont définis comme 'modules'. Selon ce modèle, la formation des macromolécules de DHP et lignines aurait alors lieu par '*polymérisation additive entre les modules*', mettant en cause des liaisons plus labiles et dont il est, actuellement, raisonnable de proposer qu'elles soient de type β et surtout α-aryl-alkyl-éther. Ces interprétations sont compatibles avec celles de K. Freudenberg, de H. Bolker et de J.F. Yann, discutées par ailleurs.[8,9a] Cependant, des données expérimentales plus récentes et surtout leurs interprétations théoriques en terme de dimension fractales de ces fractions et de réticulation des réseaux polymères par percolation entre 'clusters', agrégats, de DHP ou lignines, rapportées par de Leclerc et Olson,[31] mais aussi celles de Gravitis,[54a,b] semblent devoir être prises en compte, au moins tout autant. Elles

semblent préférables car plus fines et informatives au plan supramoléculaire.[9b] Malgré tout, dans l'état actuel des observations et du présent modèle morphogénétique, le processus 'modulaire' mérite d'être retenu, mais validé, car il est simple. En plus de l'accord sur la formation de 'modules' par réticulation de courts 'enchaînements en bloc oligomères', qui seraient plutôt riches en liaisons 'condensées'[11] puisque formés en phase de croissance rapide (Fig. 2), il permet en effet aussi de justifier, en phase terminale d'agrégation, la réunion et le masquage des agrégats[15] par la formation, plus lente car inhibée (Fig. 2), de lignines plus riches en liaisons relativement plus fragile, plus aisément clivées par pulpages, qui seraient de type β- et α-aryl-alkyl-éther,[15] entre autres types de liaisons[61] avec moindre désordre,[59] et qui libéreraient alors ces 'modules' ou 'clusters' de plus petites tailles.

Le second point concerne les interactions intra- et inter-moléculaires au niveau des fonctions aromatiques des DHP et lignines. Concernant la formation des agrégats, le caractère peu polaire des monomères et plus encore des oligomères, pourrait contribuer au rôle moteur de la lignification dans la mise sous contrainte mécanique de l'ensemble pariétal lignines – réseau de fibres polyosiques, évoqué plus haut. Par référence aux mécanismes de fixation des molécules solvatés de colorants, adsorption sur les chaînes polymères, ainsi que à leurs associations moléculaires métachromatiques, dépendant de leurs arrangements spatiaux[46,47] cités plus haut, il est proposé que la perte progressive d'eau liée à la phase pectique des agrégats et le repliement corrélatif, en pelote, des chaînes pecto-cellulosiques[25] résulte d'une part, non seulement d'interactions de type coopératives selon les modalités déjà analysées sur les polymères linéaires[62] et depuis reconnues entre les colorants aromatiques basiques et les polymères polyosiques polyanioniques[48,50] et d'autre part de réarrangements thermodynamiquement favorables des couches d'eau de solvatation suivant la relation (1). L'importance biologique vraisemblable de ce dernier type d'effet dans le cas des LC, invoquée ailleurs,[26] n'a pas fait, récemment à notre connaissance, l'objet de rapport détaillé. Confirmant cependant ces propositions et les précieux mais anciens résultats de Stöckmann[30] cités plus haut, des études analogues plus récentes ont été conduites sur des systèmes protéiques hydrophobes fibreux animaux.[26] Elles démontrent, sans ambiguité, l'importance majeure de tels effets chimico-mécaniques. Il se pourrait donc qu'une partie significative des effets de types 'compensation' suggérés dans les cas de transgenèse affectant l'ensemble du complexe lignocellulosique[13a,25a,28,35] de manière globale résulte aussi de tels réarrangement 'entropiques' accompagnés des effets de 'compatabilisation', cités plus haut. Dans ce cadre de morphogenèse biologique, ils feraient donc intervenir les réseaux pectiques par leur caractère polyanionique[50] d'où leur solubilité remarquée,[25] mais aussi des lignines, comme semblent bien l'indiquer les variations métachromatiques en présence des 'colorants basiques'[39,43] dépendantes d'activation électronique localisée et fluctuations de fonction phénoliques définies.

Le troisième point concerne l'hétérogénéité moléculaire des fractions de lignine dans la perspective de leur formation autoorganisée dans les agrégats. L'existence même de fractions de lignines de type 'en bloc', plutôt tridimensionnelles et dites plus 'condensées', et de type 'en ligne', plutôt monodimensionnelles et dites moins ou 'non condensées', proposée depuis longtemps[7,8] discutée ailleurs,[1,11] est de plus en plus fréquemment invoquée et admise, en particulier lors des caractérisations immunocytochimiques[14,61,64] de l'organisation de la lignification dans les parois végétales. Elle concorde avec les données plus modernes de cinétiques et effets de percolation lors de diverses sortes de pulpages chimiques, déjà cités, qui sont interprétés en terme de 'dégelation' de deux types de réseaux LC, interpénétrés et de polydispersité différentes.[31] Suivant le modèle proposé ici et, en accord avec les observations *in situ* sur xylème du Ginkgo,[15] la formation de lignine enrichie en liaisons aryl-alkyl-éther, 'β–O-4, dibenzodioxocine, α-O-4, ...', aurait donc lieu en phase terminale lente (Fig. 2), ralentie par inhibition compétitive lors de la morphogenèse des parois. Soulignée déjà en principe comme condition de morphogenèse,[57] l'absence d'autoinhibition de l'agrégation par elle même ne dépendrait pas des seuls facteurs autocatalytiques, concernant la formation oxydasique des radicaux, mais aussi à l'activation des extrémités phénoliques des oligomères déjà réticulés dans ces agrégats. Mettant en jeu des complexes, par intercalation[43] et des transfert de charges[45,58b,c] capables d'affecter les potentiels redox et donc la modes de liaison intermonomères,[59] la polymérisation 'biologique' serait dans ces conditions contrôlée par '*séquestration réversible des radicaux libres en extrémité de chaîne*'. Ce type mécanisme radicalaire bien que relativement nouveau, est reconnu;[65] il n'est pas original dans le domaine de la chimie macromoléculaire. Dans son principe, il est en effet, similaire aux réactions de polymérisations ionique dites 'vivantes' parce que leur propagation dépend d'une réaction démasquage du groupement réactif terminal qui est sans cela est non réactive et dite 'dormante'.[65a,d] Il est donc proposé ici que la réaction de polymérisation radicalaire des DHP et lignines soit de ce type. En effet mettant en jeu des radicaux suffisamment stabilisés et séquestrés pour avoir des caractères 'dormant' puis 'vivant' selon les conditions locales d'agrégation, elle permettraient en fin de croissance des réactivations radicalaires et la propagation terminale de chaînes oligomères entre les agrégats en conditions ainsi lentes et relativement controlées (Fig. 2). Le processus 'biologique' serait ainsi assimilable à celui de réaction 'chimiques' radicalaires déjà décrites en phase hétérogène, dans le cas de miniémulsions par séquestration de chaînes dormantes, mais aussi lors de synthèses de polymères en bloc, reliés par des segments amorphes[65b,c] et qui tous aboutissent, après éventuels transferts et fragmentations de chaîne oligomères[65d] à la condensation terminale des blocs d'un agrégat, polymère 'mort'. Les connaissances actuelles concernant les mécanismes d'oligomérisation et de réticulation modèle des DHP et des lignines sont encore trop globales et fragmentaires pour tenter de valider davantage ces propositions. Bien que frappantes, les ressemblances ne sont peut être hélas, que fortuites.

Le quatrième et dernier point concerne le rôle des peroxydases dans la formation de structures organisées. La possibilité de former de structures spatio-temporelles par réactions peroxidasique n'a été rapportée que récemment. Elle a été observée à partir de solutions aqueuses d'amidon soluble du commerce, par réaction d'iode et de peroxyde d'hydrogène catalysée par la présence de lactoperoxydase immobilisée sur les parois du réacteur.[66a] Ces données sont en complet accord avec les principes thèoriques d'autoorganisation[55b] et avec leurs validations expérimentales en réacteur,[56a] déjà citées. Par la suite, étudiant très systématiquement les aspects biophysiques des activités peroxydasiques, ces premiers auteurs ont démontré de plus l'existence d'organisations temporelles correspondantes, oscillations et dynamique complexe, des réactions 'oxydatiques', par production de H_20_2 par activation catalytique de O_2, induites en présence de substrats et cofacteurs phénoliques simples par de peroxydases diverses.[66b,c] Plus récemment, analysant de façon détaillée les nombreuses étapes de ce type de réaction à partir de donneurs organiques d'électrons, et de NADH en particulier, ils ont aussi proposé que cette dynamique enzymatique complexe exerce un effet protecteur contre les réactions d'inactivation induites sur les peroxydases elle mêmes, par les produits intermédiaires d'oxydation.[66d] Enfin, ils ont aussi décrit l'induction rapide de bifurcations entre voies métaboliques qui, dans ces conditions et du fait des principes de 'complexité'[55b] déjà citée, ne nécessiteraient pas de changement génétique régulateur.[66e] Bien que très pertinents et rigoureusement établis, ces résultats originaux et ces hypothèses de biophysique générale ne sont pas souvent systématiquement pris en compte dans les publications correspondantes, spécifiquement biochimiques et biologiques, qui concernent les peroxydases 'végétales', y compris dans des revues récentes, pourtant approfondies, visant aussi la lignification.[67] Par contre, l'importance des activités oxidatiques des peroxydases *in vitro* et durant la lignification *in situ* des parois végétales est par plus souvent reconnue. Elle a été récemment analysée et son importance a été confirmée par des études originales approfondies.[67c,68a,b,c] A ce propos, ces auteurs ont suggéré que la formation d'H_2O_2 utilisée lors de la biosynthèses des lignines provienne de réactions d'autoxidation de l'alcool coniférylique ionisé et non pas d'une activation indirecte de O_2 par la peroxidase elle-même.[68c] Un tel mécanisme autocatalytique bimoléculaire est compatible avec le modèle proposé et les principes cités; l'initiation de la polymérisation des lignines par fluctuations locales proposée dans la Figure 2 peut lui correspondre. Ainsi, en matière de morphogenèse, biologique ou non, l'intérêt de ces données biophysique et physiologiques semble clair dans la mesure ou les observations de ces auteurs, confirmant d'abord l'existence d'effets spatio-temporels d'organisation catalysés par des peroxydases, montrent aussi la diversité des mécanismes oxidatifs envisageables[66b,c] ainsi que leur dépendance en fonction du pH du milieu.[69] Par rapport à la lignification des DHP, il suffit donc de rappeler que de tels effets du PH ont été déjà montrés sur la composition moléculaire des DHP et des LC[70a,b] de

même que ceux du potentiel redox.[59a,b] Comme ci dessus, les connaissances actuelles concernant les mécanismes macromoléculaire de polymérisation oxydative des DHP et des lignines sont encore trop mal connus pour permettre de valider une fonction morphogénétique directe aux peroxydases. Cependant, l'observation d'oscillations significatives après 6 heures de réaction pendant la densification des agrégats de DHP en présence de pectine,[25a] déjà citée, pourrait en constituer un indice. Concernant encore, les mécanismes physiologiques de polymérisation oxydative des lignines, la possibilité de couplages entre voies métaboliques méritent commentaire aussi. Concernant le métabolisme général de lignification[10,11] ils affecteraient le métabolisme énergétique oxydatif, en particulier des NAD(P)H déjà envisagés, mais cette fois au niveau du transfert des monomères de lignines *via* le plasmalemne vers la parois végétale en vue de leur oxydation au cours de lignification. La possibilité d'un tel couplage a été proposée récemment dans le cas de Tabac dont les peroxydases associées à la lignification avaient été modifiées par transgenèse.[67c] Observant des réductions semblables à la fois des teneurs et des composition en monomères mono- et di- méthoxylés, ces auteurs ont suggéré que l'existence d'un mécanisme physiologique de rétrorégulation qui inhiberait leur transfert vers la parois à la condition que la capacité oxydative soit diminuée. Il est évident que l'existence, proposée ici, de l'implication d'une activité oxydatique dans la polymérisation des lignines qui serait particulièrement consommatrice de 'pouvoir réducteur cellulaire,'sous forme de NADH, ne ferait que conforter l'effet d'un tel mécanisme de rétro-régulation. En accord avec ces auteurs, il convient de souligner que les manipulations génétiques des activités peroxydasiques ont abouti, dans d'autres cas cependant, à des effets différents. Des réductions ou des augmentations des activité peroxydasiques ont été corrélées soit à des diminutions soit à de augmentations de 'teneurs totale' en lignine chez respectivement des Peupliers[71a] et des Tabacs,[71b] avec cependant dans ce dernier cas une absence de modification nette de composition en monomères non condensés. Déjà analysée bien en détail,[10] en terme de coût relatif des diverses voies métaboliques globales de lignification,[11] cette notion de couplage métabolique semble mérite ici d'autant plus intérêt en terme de morphogenèse des parois lignifiées que, précisant des observations anciennes,[72 a,b] l'existence d'une périodicité journalière de dépôt d'hémicelluloses et des lignine, en tant que matrice amorphe entre les fibres cellulosiques des couches pariétales, a été rapportée et confirmée.[72c] Ce processus a de plus été mis en relation avec des cycles de mise en compression des parois végétales en cours de croissance aboutissant à l'établissement de contraintes mécanique de compression[71c] en cohérence avec une fonction morphogénétique globale. Au total, une fonction organisatrice des '*activités métaboliques intégrées*' de polymérisation des lignines dans les parois végétales semble donc possible; les données invoquées ici en sa faveur ne sont qu'indirectes cependant. Comme précédemment, ces rapprochements ne sont peut être hélas, que fortuits; l'enjeu considérable que représente la maîtrise des processus de lignification semble quand même, mériter leur validation.

CONCLUSIONS

Alors que des propositions plus pratiques ont été déjà formulées, seules quelques idées directrices de cette revue sont regroupées en cinq points.

En premier lieu, il est admis comme hypothèse de départ, la plus couramment retenue actuellement, que la formation des lignines et le processus de lignification des parois végétales sont amorcés par une 'réaction', de type enzymatique, et qu'elles se réalisent par des mécanismes non enzymatiques de façon dite pour cette raison 'spontanée'.

Ces processus aboutiraient ainsi à la formation d'un 'système ligno-cellulosique pariétal', ensemble dans lequel des 'éléments' macromoléculaires ou non sont liées par de multiples interactions croisées. Ce 'système composite pariétal' serait, dans ces conditions, 'composé' essentiellement de quatre sortes d'éléments organisés : des fibres cellulosiques, des matrices de type hémicelluloses et de type lignines, hétérogènes au plan moléculaire, et enfin d'eau, elle même organisée aussi autant par adsorption aux interphases que en elle-même, contribuant alors de ce fait à des effets entropiques organisateurs, statiques et dynamiques, de l'ensemble.

Le phénomène d'organisation spontanée de cet ensemble résulterait ainsi du caractère coopératif et réversible, à l'état de gel 'colloïdal', de ces interactions. Elles mettraient principalement en jeu des 'liaisons' de type éventuellement ionique mais surtout hydrogène et hydrophobes. Leur formation concertée, en cascade, déterminerait la stabilisation d'états du système, configurés de façon d'abord plutôt réversible de type parois primaires, puis plutôt irréversibles, après réticulation, de type parois secondaires. Dans ces conditions, l'organisation des 'chaînes polymères' serait aussi modifiée et réorganisable. Ces modifications autoriseraient, par 'déploiement–repliement' des enchaînements polymères, les formation, déformation et reformation de ces systèmes structurés fibreux, aboutissant à des états définis particuliers, 'formes', relativement stables au plans mécanique et plus généralement thermodynamique.

La formation progressive et localisée de lignine en forme de grains, agrégats, résulterait, dans le cadre d'un modèle proposé (Fig. 2), d'effets antagonistes inhibiteur et activateur autocatalysé, conformes aux principes physico-chimiques très généraux de l'autoorganisation des systèmes thermodynamiquement complexes qui furent établis[55] et validés expérimentalement,[56] par ailleurs. Ce modèle simplifié, combinant ces facteurs sur la base de fluctuation autoxydation et autocatalyse qui activeraient la polymérisation des lignines suffit pour décrire qualitativement les observations faites tant *in situ* que *in vitro*. Il vise à permettre des hypothèses plus détaillées des mécanismes moléculaires tant biologiques que technologiques, évoquées en Introduction.

A ce propos, il convient enfin de souligner le caractère très schématique des mécanismes invoqués ici lors de séparations de phases, de l'individualisation, de la rétraction et de la fusion des agrégats et modules de lignine pendant la formation

des parois lignifiées ainsi lors des effets mécaniques de mise sous contrainte des tissus de réaction ainsi que de déformation ou ruptures mécaniques. De même, les suggestions concernant le désenchevêtrement des chaînes lignocellulosiques sous contraintes et leur réorganisation qui seraient susceptibles de contribuer à la stabilisation biologique et/ou technologique ultérieure des parois végétales et produits dérives sont très simplifiées. Elles semblent pourtant utiles car elles sont susceptibles de fournir des bases moléculaires théoriques, en vue de la description de phénomènes biologiques complexes, tels que l'établissement des contraintes de croissance et la formation des bois de réaction. Elles pourraient même conduire à expliciter en terme de mécanismes moléculaire des concepts encore trop souvent flous ou seulement finalistes, d'états, de structures ou d'organisations 'plus adaptées biologiquement', et même les termes tels que 'autoorganisation' ou 'compatibilisation'. Bien que regrettées, ces simplifications sont cependant difficiles à éviter. Elles tiennent au caractère de 'systèmes complexe' que constituent en général les composés lignocellulosiques. Leur étude est donc faite 'à l'approche du complexe';[55b] elle nécessite et encourage donc des démarches pluridisciplinaires, en équipe, dont le besoin et l'intérêt général a été, encore récemment, souligné[2,73] mais qui, concernant ici les domaines vastes de la chimie, la biologie, la physique et les technologies, n'ont pu faire l'objet ici, que de vues simplifiées.

REFERENCES

[1] M. Baucher, B. Monties, M. van Montagu and W. Boerjan, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **17**, 125 (1998).

[2] M. Baucher, C. Halpin, M. Petit-Conil and W. Boerjan, *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*, **38**, 305 (2003).

[3] L. A. Rogers and M.M. Campbell, *New Phytol.*, **164**, 17 (2004).

[4] Y. Barrière, J. Ralph, V. Méchin *et al.*, *C. R. Biologies*, **327**, 847 (2004) et les deux articles précédents dè cette série, respectivement aux pages: 455 et 467.

[5] B. Monties, in "Plant Phenolics", vol 1, "Methods in Plant Biochemistry" Series, J.B. Harborne (Ed.) Academic Press, pp. 113-157 (1989).

[6] B. Monties, *Polymer Deg. Stab.*, **59**, 53 (1998).

[7] F.E. Brauns, "The Chemistry of Lignin", Academic Press, (1952), voir aussi le '*Supplement Volume*' avec D.A.Brauns (1960).

[8] K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig, "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions", John Wiley and Son (1971).

[9a,b] (a) B. Monties, *Polymer Deg. Stability*, **59**, 53 (1998), and (b) B.Monties and K. Fukushima, in, "Biopolymers": vol:**1**, "Lignin, Humic Substances and Coal, A. Steinbüchel (Ed.) Wiley VCH, p. 1 (2001).

[10] J.S. Amthor, *Ann. Bot.*, **91**, 673 (2003).

[11] B. Monties, in, "Advances in Phytochemistry", Research Signpost, F. Imperato (Ed.) p: 1 (2003).

[12] B. Monties, *Proc. Second Int. Conf. of the European Soc. Wood Mechanics*, (L. Salmen, Ed.) p. 1, STFI- Packforsk (2004).

[13a, b] (a) D.R. Dimmel, J.J. MacKay, E.M. Althen, C. Parks and R.R.Sedoroff, *J. Wood Chem. Technol.*, **21**, 1 (2001), and (b) D.R. Dimmelet al., *J. Wood Chem. Technol.*, **22**, 235 (2002).

[14] D. Reis and B. Vian, *C.R.Biologies*, **327**, 785 (2004).

[15] N. Terashima, T. Awano, K. Takabe and M Yoshida, *C.R. Biologies*, **327**, 903 (2004).

[16] J. Gril. D. Hunt and B. Thibault, *C.R.Biologies*, **327**, 881 (2004).
[17] L. Salmen, *C.R.Biologies*, **327**,873 (2004) et surtout *Proc. Sec. Int. Conf. European Soc. Wood Mechanics*, L. Salmen (Ed.), 388 p., STFI- Packforsk, Stockholm (2004).
[18 a, b] W. Chen, G.C. Lickfield and C.Q. Chang, *Polymer*, **45**, (a) part I: 1063 and (b) part II: 7357
[19] P. Fratzl, I. Burgert and H.S. Gupta. *Phys. Chem., Chem. Phys.*, **6**, 5575 (2004).
[20] S.E. Gradwell, S. Rennekar, A.R. Esker, T. Heinze, P. Gattenholm, C. Vaca-Garcia and W. Glasser, *C.R.Biologies*, **327**, 945 (2004).
[21] C. Pouteau, S. Baumberger, B. Cathala and P. Dole, *C.R.Biologies*, **327**, 935 (2004).
[22] J.E. Varner, in, "Self-Assembling Architecture", J.E. Varner (Ed.), A.R.Liiss Pub, p. I, 97 (1988), voir aussi les 'Perspectives de J.M. Lehn, *Angew.Chem., Int. Ed.*, 1304 (1999), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 4763 (2002) et de J.M. Whiteside, M. Boncheva, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 4761 (2002).
[23] P. Colonna, V. Planchot and M. Axelos, in, « La Génomique en Biologie Végétale », J.-F. Morot-Gaudry, J.-F. Briat (Eds.), INRA Science Update pub, p: 493 (2004).
[24 a, b, c] B. Cathala, N. Puff, V. Aguié-Béghin, R.Douillard and B. Monties, *A.C.Symp. Ser.*, **742**, 278 (2000), (b) B. Cathala, L.T. Lee, V. Aguié-Béghin, R.Douillard and B. Monties, *Langmuir*, **16**, 10444 (2000), (c) B. Cathala, V. Aguié and R. Douillard, *C. R. Biologies*, **327**, 777 (2004), .
[25 a, b] (a) D. Lairez, B. Cathala, B. Monties, F. Bedos-Leval, H. Duran and L. Gorrichon, *Biomacromolécules*, **6**, 763 (2005), (b) B. Cathala and B. Monties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **29**, 45 (2001).
[26] B. Monties, in, *Proc. Internat. WURC* (Wood Ultrastructural Research Center), G. Daniel (Ed.), Swed. Land. Uppsala Pub. P. 2 (2004).
[27] K. Bamber, *IAWA Journal*, **22**, 205 (2001).
[28 a, b, c] (a) S.R. Turner, C.R. Sommerville, *Plant Cell.*, **9**; 689 (1997) (b) Li Y *et al.*, *Plant Cell*, **15**, 2020 (2003), (c) U. Sharma *et al.*, *Agronomie*, **6**, 265 (1986).
[29] M. Petit-Conil, C. Chirat *et al.*, *Proc. 2000 TAPPI Engen. Pulping Conf. on Process and Product Quality*, PULP0036, p: 43, CD-ROM , TAPPI Atlanta Press Pub.
[30 a, b, c] W. Stöckmann, (a) *J. Polym. Sci.*, Part C, **36**, 363 (1971), (b) *Biopolymers*, **11**, 251 (c) TAPPI J. **54**, part 1: 2033, part 2: 2038 (1971).
[31] D.F. Leclerc and J.A. Olson, *Macromolécules*, **25**, 1667 (1992).
[32 a, b, c] L. Salmen, (a) in, *Proc. Second Int. Conf. European Soc. Wood Mechanics*, p:III, L. Salmen (Ed.),153 – 224, STFI- Packforsk (2004), (b) M. Akerholm and L.Salmen, *Holzforschung*, **57**, 459, (2003), (c) L. Salmen and A.-M. Olsson, *J. Pulp Paper Sci.*, **24**, 99 (1998)
[33 a, b] (a) T. Okuyama, H.Takeda, H. Yamamoto and M. Yoshida, *J. Wood Sci.*, **44**, 83 (1998), (b) H. Yamamoto, Y. Kojima, T. Okuyama, W. Abasolo and J. Gril, *Trans. ASME*, **124**, 432 (2002).
[34] G. Champetier and L. Monerie, "Introduction à la Chimie Macromoléculaire", **3ème part.-chap. II**, 471, Masson et cié Pub. (1969).
[35] D.G. Hepworth, J.F. Vincent and W.Schuch, *Ann. Bot.*, **81**, 729 (1998).
[36] K. Li and D.W. Reeve, *J. Wood Chem. Tech.*, **24**, 169 (2004).
[37] J.J. Balatinecz and R.V. Kennedy, *Forest Prod. J.*, **17**, 57 (1967).
[38 a, b] W. M. Harlow, *Paper Trade J.*, TAPPI sec., 33 (part II) et aussi 31 (part I) (1941).
[39] N. P. Kutscha and J.R. Gray, *Tech. Bull.*, **53**, Life Sci. Agric. Exp. Station, Maine Univ. Orono (1972).
[40] A.M. Dubinskaya, *Russian Chem Rev.*, **68**, 637 (1999)
[41] J. Ahmad and K.B. Austin, *Langmuir*, **6**, 1797 (1990).
[42] B. Dordi, H. Schönherr and G.J. Vansco, *Langmuir*, **19**, 5780 (2003).
[43] J.C. Stockert, M. Cañete and O.D. Colman, *Cell. Molec. Biol.*, **30**, 503 (1984).
[44 a, b] T. Koshijima, T. Watanabe and F. Yaku, *A. C. S. Series*, **397**, 11 (1989) et aussi F. Yaku *et al.*, *Holzforschung*, **33**, 54 (1979).
[45] B. Monties, *C. R. Acad Sci. Paris*, **277**, 1167 (1973).

[46] P. Gaham, "Plant Histochemistry and Cytochemistry", p: 4-6 et 34-35, Academic Press Pub. (1984).

[47] P. Prento, *Biotechnol.Histochem.*, **76**, 137 (2001).

[48 a, b] (a) J.B. Lawton and G.O. Phillips, *J. Chem.Soc.*, Perkin II Trans. 38 (1977), (b) R.B.Cundall and J.B. Lawton, *J. Chem.Soc.*, Perkin II Trans. 879(1979).

[49] G.C. Hochberg, *Colloïd Polymer Sci.*, **272**, 409 (1994).

[50] A. Mitra and A.K. Chakrabortsy, *Indian J. Chem.*, Sect. A: *Inorg. Chem.*, **37**, 418 (1998), et aussi A.K. Bhattacharyya and N.C. Chakravorty, *J. Indian Chem. Soc.*, **68**, 447 (1991).

[51 a, b] (a) M. Micic, M. Jeremic and K. Radotic, *J. Colloïd Interface Sci.*, **231**, 190 (2000) (b) J. Fromm, B. Rockel, S. Lautner, E. Widnesstein and G. Wanner, *J. Struct. Biol.*, **143**, 77 (2003).

[52 a, b, c] (a) N. Terashima, R.H. Atalla, S.A. Ralph, L.L. Landucci, C. Lapierre and B. Monties, *Holzforschung*, (a) **50**, 9 (1996), (b) **49**, 521 (1995) et aussi (c) M.T. Tollier, C.Lapierre, B. Monties, C. Francesch and Ch. Rolando, *Proc. 6th. Int.Symp. Wood Pulpling Chem. (ISWPC)*, **1**, 35 (1991).

[53 a, b] (a) J.-P. Touzel, B. Chabbert, B. Monties, P. Debeire and B.Cathala, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 981 (2003), (b) B. Cathala and B. Monties, *J. Int. Biol. Macromolecules*, **29**, 45 (2001).

[54a, b] (a) J. Gravitis and P. Erins, *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.*, **37**, 421 (1983), voir aussi ref. in (b) B. Monties, *Ann. Proc. Phytoch. Soc. Europe*, **25**, 161 (1985)

[55 a, b, c] (a) I. Prigogine, in "Introduction à la Thermodynamique des Processus Irréversibles", Dunod Pub., chap. 4 et 6 (1968), (b) G. Nicolis and I. Prigogine, in "A la Recherche du Complexe", P.U.F. Pub., chap 1,2 et 5 : Les bases microscopiques de la complexité (1989), (c) I. Prigogine and I. Stengel, "La Nouvelle Alliance : Métamorphose de la Science", Gallimard Pub., Chap. V, VI : L'ordre par fluctuation , 2eme ed. (2000).

[56 a, b] (a) V. Castets, E. Dulos, J. Boisonnade and P. De Kepper, *Phys. Rev. Letters*, **64**, 2953 (1990), (b) G. Dewel *et al.*, *Physica*, A **213**, 181 (1995), P. De Keppers *et al. La Recherche*, **305**, 84 (1998) voir aussi J. Boissonade, *Phys. Rev. Letters*, **90**, 188302 – 1,4 – (2003).

[57] H. Meinhardt and A.Gierer, *BioEssay*, **22**, 753 (2000) et références citées.

[58 a, b, c] (a) P. Pietikäinen and P. Aldercreutz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 455 (1990), (b) S. Barsberg and L. Thygesen, *Arch.Biochim.Biophys.*, Gen. Subj. 1472, 625 (1999) et (c) S. Barsberg et al., in U.Schmitt and P. Ander (Eds). *Cost Action E20 Wood Fiber Cell Wall Structure Proc*, E.C. Pub., p. 231 (2003).

[59 a, b] (a) K. Syrjanen and G. Brunow, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 3425, (1998), (b) G. Brunow *et al.*, *A.C.S. Symp. Ser.*, **697**, 131 (1998).

[60] M. Wayman and T.I. Obiaga, *Canad. J. Chem.*, **52**, 2102 (1974).

[61] E. Kukola, S.Koutaniemi, E. Pöllänen, T. K. Lundell, P. Saranpää, I. Kipeläinen, T.H. Teeri and K.V. Fagerstedt, *Planta*, **218**, 497 (2004) et **217**,229 (2003).

[62] G. Schwarz, *European J. Biochem.*, **12**, 442 (1970).

[63] J.M. Gosline, F.F.Yew and T. Weis-Fogh, *Biopolymers*, **14**, 1811 (1975) , voir aussi M. Miao et al., *J. Biol. Chem.*, **276**, 48553 (2003).

[64] J.P. Joseleau, O. Faix, K.- I. Kuroda and K. Ruel, *C.R.Biologies*, **327**,809 (2004).

[65 a, b, c, d] (a) A. Butté, G. Storti and M. Morbidelli, *Macromolecules*, **34**, 5885 (2001), (b) C. A. Barbosa, M.R. Coelho and A.I. Gomes, *Makromoleculare Chemie*, **168**, 91 (2001), (c) H. de Brouwer, J.G. Tsavalas, F.J.Schorck and M.J. Monteiro, *Macromolecules*, **33**, 9239 (2000) (d) G. Moad *et al.*, *Polymer Int.*, **49**, 993 (2000).

[66 a, b, c, d, e] (a) U. Kummer and G. Baier, *Naturwissenschaften*, **83**, 522 (1996), (b) B.J.M. Hauser and L. F. Olsen, *Biochemistry*, **37**, 2458 (1998), (c) U. Kummer, M.J.B. Hauser, K. Wegmann, L.F Olsen and G. Baier, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2084 (1997), (d) M.J.B. Hauser, U. Kummer and L. F. Olsen, *Faraday Discuss.*, **120**, 215 (2001), (e) L. F. Olsen, M.J.B. Hauser and U. Kummer, *European J. Biochem.*, **270**, 2796 (2003).

[67a, b, c] (a) N.G. Veitch, *Phytochemistry*, **65**, 249 (2004), W. Boerjan, J. Ralph and M. Baucher, *Ann. Rev. Plant. Biol.*, **54**, 519 (2003), (c) K.A.Blee, J.W. Choi, A.P. O'Connel, W. Schuch, N.G. Lewis and G.P. Bolwell, *Phytochemistry*, **64**, 163 (2003).

[68 a, b, c] (a) M.A. Ferrer, M.A. Pedreño, R. Munoz and A.Ros Barcelò, *FEBS Letters*, **276**, 127 (1990), (b) A. Ros Barcelo and F. Pomar, *Phytochemistry*, **57**, 1105 (2001), (c) F. Pomar, N. Caballero, M.A. Pedreño and A. Ros Barcelò, *FEBS Letters*, **529**, 198 (2002).

[69] G. Baier, P. Strasser and U. Kummer, *Z. Naturforschung*, A: Physical Sect., **50**, 1147 (1995).

[70 a, b] (a) J. Sipila and G. Brunow, *Holzforschung*, **45**, part **2**: 275 et **1**: 9 (1991) (b) J.H. Grabber, R.D. Hatfield and J. Ralph, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4984 (2003).

[71 a, b] (a) Y. Li, S. Kajita, S. Kawai, Y. Katayama and N. Morohosshi, *J. Plant Res.*, **116**, 175 (2003), (b) B. Chabbert, B. Monties, Y.T. Liu and M. Lagrimini, *Proc. 5th Int. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Ind.*, (Kyoto, Japan) p. 481 (1992).

[72 a, b, c] (a) M. Bobàk and V. Necesanÿ, *Biol. Plant*, (Praha) **9**, 195 (1967), (b) S. Mizuta and S. Wada, *Plant Cell. Physiol.*, **23**, 257 (1982), (c) M. Yoshida, Y. Hosoo and T. Okuyama, *Holzforschung*, **54**, 469 (2000).

[73] A.-M. Catesson, *C.R. Biologies*, **327**, 775 (2004).

clic here for
the next

A LOOK BACK UPON SOME 'NON-CONVENTIONAL' BIOCHEMICAL MECHANISMS OF SUPRAMOLECULAR STRUCTURES ASSEMBLING DURING PEROXIDASE-OXYDASE CATALYZED POLYMERIZATION OF LIGNINS AND THE RELATED DEHYDROPOLYMERS (DHP) FORMATION

BERNARD MONTIES

Equipes de Biochimie – INRA, Reims, 51686 and – INAPG, 78850 Thiverval-Grignon
Retirement personnal address: 36 route du Pontel 78760, Jouars-Pontchartrain, France
E-mail: bernard.monties@jouy.inra.fr

This paper is dedicated to Prof. Takayoshi Higuchi,
on the occasion of his 80th anniversary,
to congratulate his great stimulating contribution to lignin biosynthesis and biodegradation;
I shall never forget our visit and wishes for a closer cooperation,
in front of the Silver Phenix at Byodo-Hin, in May 1981

The role of the 'peroxidase-oxidase' reaction (catalytic formation of H_2O_2 by O_2 activation), now well-known but seldom discussed, is recalled with respect to biochemical studies on lignin polymerisation and emphasis on the physico-chemical mechanisms of pattern formation and of molecular organisation during the synthesis of lignin model compounds (DHP). The corresponding processes of supramolecular assembly involving oligolignols interactions are related to more fundamental kinetic and thermodynamic mechanisms of cooperative inter- and intra-molecular binding reactions of polymer ligands, through interfacial- and template-constrained polymerisation. Finally, viewing synthetic and natural lignified structures as 'open systems far from equilibrium', typically self-organized by nucleation processes and by the formation of 'dissipative structures', as previously illustrated in this journal (*Cellulose Chem. Technol.*, 2005, **39**, pp. 341-367), the so-called 'random' process of lignification is tentatively described in terms of intra- and inter-molecular cooperative non-covalent and covalent 'binding' and of hydrophobic 'solvatation'. Here, the somehow controversial word 'random' refers to the pre-existence of elementary (*i.e.* atomic, molecular and polymer) structured building-blocks and to the absence of pre-formed systemic (*i.e.* supramolecular assemblies) organization.

The formation and progressive evolution of diverse macroscopic patterns during the biosynthesis of lignified cell walls are currently well-established on the basis of unambiguous anatomical and cytochemical observations. During the first half of the XXth century, most of these observations, mainly founded on biochemical studies were, with rare and often neglected exceptions, seldom discussed in terms of the fundamental physico-chemical mechanisms that subtend these macro- and supra-molecular morphogenetic organizations. The review-chapter entitled "Biosynthesis of lignin", written by T. Higuchi in 1985, is one of such exceptions in which, among many other topics, the author emphasized not only the structural differences evidenced in the formation of dehydrogenation polymers (DHP), involving diffusion across the cell membrane, for example in the dialysis tube, but also the possible regulation of lignin

polymerization, involving the formation of H_2O_2 from O_2 by peroxidase-catalyzed reactions, cooperatively affected themselves by the number of reduced compounds, monolignols and ascorbic acid, for example.

Also, highly significantly, in 1985 this chapter was included in the book "Biosynthesis and biodegradation of wood components", viewed as "the first comprehensive book on wood biochemistry" intending, in the terms of its preface, "to seek to apply biotechnology to wood production and use".[1a] With biochemistry as a necessary condition for some "new uses" of wood, the contents of both this chapter and the book still remain completely relevant.

The continuously increasing number of papers published in specialized "biochemical" journals clearly illustrates this fact, accounting, however, a correlated increasing need of complementary studies on the related physico-chemical mechanisms substratum. Such "non- biochemical" data and hypotheses, often briefly and/or only rarely discussed by biochemists, were thus "non-conventional", even now often "neglected" and finally "forgotten".

This is still currently the case of the two just cited topics; **first**: the peroxidase-oxidase reaction, when looking back at its reported complex, non-linear dynamics induced by naturally occurring aromatic substrates allowing chaotic oscillations and convective pattern formation, **secondly**: the molecular structure of DHP, when looking back at the diverse spatial patterns, observed after their enzyme-initiated and chemically-driven organization in the presence of mono- or/and multi-functional ligands, as the result of inter- and intra- molecular reactions, depending on cooperative binding and solvatation ranking mechanisms in both solutions and at interfaces.

In this short note, the author supports the lasting and increasing interest for these non-conventional topics in a specific biochemical view. In this respect, the significance of some "neglected" old key-papers is eventually recalled, on emphasizing some very recent papers more directly concerned with these physical chemistry views, with the aim of inciting to experimental validation in lignification studies. As a "short note", the paper does not provide extended critical views. It has to be considered as complementary to a previous review focussed on some macromolecular aspects of the biological variability of lignins.[1b] This is a kind of part 2 of this review, providing more "fundamental" mechanistic views and references, in addition to those newly cited in the previous one, along with others,[1c,f] which are thus only mentioned, without being included in the reference list.

The peroxidase-oxidase reaction and lignin- or dehydropolymer- polymerization

The involvement of the activated oxygen species (especially the superoxide radical) of monophenols (especially coniferyl alcohol) and of reduced metabolites (especially malate and NADPH or NADH), in the hydrogen peroxide formation and related polymerisation of lignols and monophenols by isolated plant cell walls, was unambiguously demonstrated by G. Groos and coworkers in 1977. Even if extensively commented by Higuchi (**1[a]** pp. 148 and 159) and confirmed in 1978 by A.-M. Catesson and coworkers (**1[d]** p. 8), through a direct histochemical probe based on *in situ* malate-NAD dependence, this enzymatic reaction mechanism seems to have been only rarely cited and exclusively in studies of H_2O_2 plant metabolism during a localized hypersensitive defence reaction,[2] xylem cell wall lignification[3] and cellular redox signalling the involvement of NAD(P)H and plant oxidases and peroxidases as simple enzyme oscillators[4] in the general and secondary lignification metabolism,[1b,d] for example. To the best of our knowledge, based on citations and data base analysis, this reaction mechanism is apparently only seldom cited, "neglected", during most of the current model studies of oxidative polymerisation of simple oligolignols and DHP supramolecular assembly, either in the presence or absence of copolymers. With some very rare exceptions of enzymatic biosynthesis of H_2O_2 by glucose-oxidase in the reaction medium, as reported by M.-T. Tollier and by N. Terashima and coworkers (**1[b]**, pp. 361 and 352), for example, H_2O_2 is almost invariably used as a solution of "commercial H_2O_2" directly added reagent during the synthesis of

model lignin DHP. Equally, almost invariably, the effects of H_2O_2 local concentration and reaction kinetics, even if unambiguously demonstrated on the basis of Freudenberg's conventional "Zulauf" and "Zutropf" conditions, are very seldom discussed even when the validity of the extrapolations of the mechanisms and the results of such *in vitro* synthesis to the lignified plant cell walls biosynthesis and their H_2O_2-related finely retro-regulated metabolism are involved. As evidenced in the introduction, it seems worth pointing out that the peroxidase-oxidase reaction supplemented with simple phenolics shows a typical oscillatory and complex dynamics,[5a] depending on the occurrence of the non-linear, second order, intermediate autocatalytic reaction steps,[5b,5c] as a potential source of enzyme-catalyzed formation of special, macroscopic patterns,[5d] generators of characteristic instabilities or turbulences in homogeneous reactors or in a reaction-diffusion environment, depending, for example, on the differences in proton diffusion, pH,[5e] or in substrate inhibition,[6] being thus a function of the spatio-temporal organisation of the reaction-diffusion system. Viewed in 1994 by the authors as "a challenge for physiologists",[7] the "nonlinear behaviour in the peroxidase-oxidase reaction" still remains a challenge for lignin biochemists but, rather surprisingly, for organic chemists as well! The metabolic stability of the related spatial patterns, described as "dissipative structures" (as later viewed here), was questioned by these authors "to stay on long-term *in vivo*" on the basis of model calculations,[5e] even when, however, the combination of autocatalytic reactions with the diffusion of reagents in an open reactor, leading to the formation of these dissipative structures, was viewed by others as "conditions for the formation of functional order in the evolution of life".[8] Inviting thus experimentalists to validation, these assertions also warrant the very common need of "improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis", as recently illustrated, too, in the field of industrial chemistry, by Van de Welde and coworkers,[9] who strongly emphasized the "crucial" mode of H_2O_2 addition, when comparing the results of *in situ* generation of H_2O_2 with the introduction of a concentrated solution at a single point, through pumping into the reaction vessel.

In the field of lignin biochemistry, whatever the experimental conditions of DHP synthesis and, similarly, of the biological synthesis of lignins, may be,[1d,b] the systematic, well-established differences between the macromolecular structure of lignins and DHP unambiguously show that conditions other than peroxidase-catalyzed reaction mechanisms are, at least, crucial. As emphasized in the introduction, this seems to be specifically the case, during the initial steps, enzymatic or not, of molecular assembling leading, through non-covalent or covalent interactions, to macromolecular structures and to the so-called "macroscopic patterns".

Even abridged, a survey of these steps is well beyond the scope of such a short note. Thus, aiming here not at "neglecting" a possible contribution of the "dissipative structures" to such a spatial organization, the importance of a cooperative interaction mechanism is suggested as one of the crucial factors during lignin and DHP spatial organisation, as illustrated and identified here when the physico-chemical conditions of DHP synthesis are compared for example, in agitated "homogeneous" solution and at "heterogeneous" liquid-air or liquid-solid interface.

DHP spatial organisation and cooperative interaction mechanisms

Organic synthesis through dehydrogenation of phenols as lignin model polymers has been initiated by Freudenberg and coworkers[10a] around 1950, with "the intention to duplicate as closely as possible lignin biosynthesis as it occurs in the plant" and again, around 1970, "the most significant result that lignin produced *in vivo* in nature and *in vitro* by biosynthesis in the laboratory are as closely identical, as might be reasonably expected of high-molecular mass amorphous materials".[10b] Sometimes, although less and less frequently assimilated to the "natural" lignin biosynthesis, the chemical synthesis of DHP can and has to be currently perceived as the essential

complement of the *in situ* physico-chemical analysis contributing, at a microchemical level,[11a] to the systematic identification and characterisation of the occurrence of *in vitro* interactions among the lignified cell wall layers biopolymers, namely cellulose, hemicellulose, pectin, lignin and proteins, systematically analyzed *in situ* by L. Salmen and coworkers.[11a,b]

The same type of complementarity is found when comparing the physico-chemical conditions of synthesis in agitated solution and at liquid-solid or liquid interfaces.

In "solution", according to Freudenberg's bulk and end-wise conditions of polymerisation, the peroxidase activity has been recently demonstrated as "a crucial parameter for structural variations of DHP",[12] which agrees with the results of Tanahashi and Higuchi,[1a] for example, and with others papers, cited elsewhere.[1a–d, 2]

Studies on DHP polymerisation under similar conditions, yet with the addition of macromolecular compounds, at "solid interfaces", provided similar evidence on the variations – mainly – of the relative frequency of the inter-monomeric linkages in the presence of cyclodextrins,[13a] cellulose,[13b] macromolecular lignin fraction,[13c,d] arabinoxylan,[13e] pectin composites[13f,g,h] and xylan.[13i] Even when differences in the molecular mass and relative variations in the size and composition of oligomeric and copolymer fractions were less frequently reported, such studies, unambiguously demonstrating the highly significant occurrence of the physico-chemical interactions at solid-liquid interfaces, when compared to the variations reported in aqueous phase. Very stimulating figures have been drawn,[13a, 13b, 13d, 13i] to illustrate some so-called molecular "template", "scaffold", "aggregation" effects, when identifying some molecular mechanisms of the assembling steps which, however, remained of quality when only "pure" analytical biochemistry was involved.

At the "air-water interface", a similar type of results was also reported when studying the kinetics and layer organisation during the peroxidase-polymerization of coniferyl alcohol, when the reaction occurs at and near the interface.[14a,b] In the early stages of the reaction, when only coniferyl alcohol dimers were analyzed, the relative proportions of dimers changed when compared to the polymerization in "solution". Furthermore, by using combined methods of "pure" analytical biophysics for surface pressure and molecular organization, the formation of a 2D layer and of a 3D structure was observed. The modification, according to the mechanical surface constraints of the surface selected during the polymerisation study, leads to a process described as organized in the "subsurface". Interestingly, the adsorption of the oxidation products, yet not the diffusion of the phenolic substrate, was identified as the rate-limiting step, allowing the idea of a kinetic model of DHP interphase organization at the "subsurface", a model which quantitatively agrees with the surface and interfacial organization behaviour, as previously reported[14c,d] in the case of DHP synthesized "in solution".

Now, bringing together, at the molecular level, the similitude between the products of these three types of DHP synthesis and the reference at the macroscopic level, to the differences in the corresponding processes, perceived as "homogeneous" in agitated solution and as "heterogeneous" at liquid-air or at solid interface, it is thus suggested to look, at the elementary submolecular mechanisms level, on the cooperativity of the physico-chemical interaction steps as a crucial factor of DHP organisation. In this respect, one has to underline the essential difficulty to quantitatively conceptualize the notions of hetero- and homogeneity at least at two levels, not only in the case of interfacial assembly processes, in which the just cited macroscopic perceptions of "homogeneity" and "heterogeneity" could not be relevant at the macromolecular organisation level, as due to the submolecular interphase-subsurface-interface conceptual continuity, but also in the case of peroxidase-initiated and chemically-driven polymerisation of DHP which, under solid interface spatial constraints, unambiguously depends, too, on the relative proportions, often qualitatively perceived as "small" or "large", of numerous reagents such as in H_2O_2, O_2-activated species, phenolic substrates, in effectors and, of course, in

"polymer templates" concentrations. This latter point has been demonstrated and illustrated by, for example, Sarkanen and coworkers,[13c,d] who reported that "dehydrogenative polymerisation of coniferyl alcohol in homogenous solution has now been found to be strongly affected by small quantities of macromolecular lignin components". Essential but more specific, difficult and sometimes even controversial,[1e] such questions are however not commented here any more, for the sake of shortly recalling the more general and elementary, "universal" mechanisms of cooperativity, aiming at stimulating its account in the case of DHP and lignin formation studies.

Cooperative binding between "small" or "large" simple molecules to (bio)polymers is obviously "universal", bearing more than a biochemical significance. According to the conventional polymer chemistry views, cooperativity can be conceptualized as a mechanism in which the interaction of a molecular structure with a binding site affects, in some way, the reactivity and, consequently, the binding capacity of its other sites. In this respect, the binding of an isolated ligand – "nucleation" –, the binding at the immediate neighbourhood of an already bound one – "aggregation" – and the intricate effect due to ligand-ligand binding – "dimerization" – were identified by G. Schwarz[15a] as standard elementary steps, which allowed the formulation of the quantitative relations required, recalled as the most useful tools in the experimental analysis of (bio)polymer formation processes. Among the plethora of other current relevant publications, this interest is here illustrated by only two particularly clear series of papers, combining model parameter calculations with subsequent experimental applications. As to the static and dynamic properties of the cooperative binding between ligands and linear polymers, the respective association constants, determining the type and degree of cooperativity – in addition to some related equilibrium concentration of components – were first calculated on the basis of a pertinent kinetic model.[15a] In the two following papers, this model was experimentally validated and extended to the dependence of cooperativity on ionic strength, polymer ligand ratio, ligand dimerization and stacking tendency of the neighbouring ligands, dyes, molecules. As to the complementary cases of multiple inter- and/or intra-molecular binding with mono- and/or poly-valent ligands, similar calculations, applied to reversible disassembly and gelification,[15d] have also provided quantitative criteria used to successfully assess the types of binding reported by other authors, positive- *vs*. negative- cooperativity or non-cooperativity, statistical or random binding, by the determination of the inter- and intra-molecular equilibrium constants.[15e] By extending the general treatment of the macrocyclization control,[15f] tentatively viewed here as a modular polymerization of oligomeric chains as networks cycles, these data could be relevant in the modular formation of DHP and lignins, by assembling the oligolignols suggested, among others, by Freudenberg and Wayman, as previously reviewed ([1b] pp. 353; [1f]). Of course, concerning only the reversible cooperativity in self-assembly processes, this last model cannot be directly involved in DHP formation studies. However, it is suggested that such model could be tentatively applied at least during the initial steps of DHP synthesis, corresponding to the binding interactions between water solvated mono- and oligo-lignols and to their phase-transition from a "free" liquid phase into an "interphase" constrained at the liquid-solid interface. Such a transition step would involve a thermodynamically controlled rearrangement of free-, solvated- and structural-water, as reviewed ([1b] pp. 351, eq.1; [1d]), thus occurring prior to the local decrease of water concentration and chemical activity, as experimentally evidenced and discussed by Cathala and coworkers[13g,h,i] for the hydrophobic domains of the DHP nano-aggregates, for example. Specifying the concept of "concerted supramolecular organization" suggested in this respect, as well,[1b] the possibility of an either reversible or not concerted cooperative folding and unfolding of oligolignols has to be considered, along with concurrent dehydration and hydration effects, as due to the so-called "nonpolar", "hydrophobic

hydration", as evidenced in both experimental[16a] and model, theoretical[16b,c] studies of "hydrophobic proteins", elastin and elastin-like polymers,[16a,b,c] but also in the often forgotten case of cellulosic fibres.[16d,e] Ironically, it could even be added that such a model can be directly applied to the study the complex metachromatic effects reported during the cytochemical characterisation of *in situ* lignin,[1b] prior to and after mechanical breaking,[17] thus aiming at identifying some supramolecular intercalation reaction mechanisms and the related controversial occurrence of stereochemical effects due to the chiral spaces at the interfaces with solids, during DHP and even lignin (bio)synthesis!

A last, much more short-term … reason of the interest for the molecular cooperativity effects in DHP lies in the recent report of Salmen and coworkers,[18] who quantified the intermolecular coupling effects associated with the *in situ* lignin during glass transition changes, pointing out the possibility to enlarge the concepts and procedures of the global and segmental dynamics of polymer studies, in the case of *in situ* lignins. Accordingly, the large range of segmental behaviour in more or less smooth or constrained polymers systematically identified by Ngai and coworkers[19] provides relevant incitation to elaborate models and to similarly quantify the role of submolecular differences and of the heterogeneity in DHP, as also suggested on the basis of "pure" biochemical analysis, when comparing the bulk – more "compact" Zutropf – and the end-wise – more "linear" Zulauf – types of DHP composites.

Opposite to such (bio)chemical analyses, performed at polymer, molecular and submolecular "elemental" levels, polymer segmental chain motion, molecular steric substituent constraints or atomic orbital interactions, steering – for example, the additional possibility of physico-chemical studies, based on global, "systemic", thermodynamic bases – have to be finally recalled.

The possibility to analyse the very early steps of formation and assembly of macromolecules, and thus of lignin and DHP, according to the thermodynamic views initiated and developed mainly by Prigogine and co-workers, has been recently discussed in this journal,[1b] even if exclusively at the biochemical level. Complementary views on the principles of the thermodynamic control of the physico-chemical mechanisms of spatial self-organisation and of auto-catalyzed peroxidase polymerisation are thus presented here with reference mainly to cited, yet not listed papers.

Adapted from the previously mentioned paper (1[b], Fig. 2, p. 356 and ref. 55-56), Figure 1 summarizes the central suggestion that "the early stages of lignin and DHP depend on non-equilibrium stationary states allowing, under certain conditions, phenomena of macroscopic self-organization described as temporal rhythms and special patterns", which depend on both external and internal constraints, expressed by a very limited number of thermodynamic parameters describing the system. According to both theoretical bases, expressed by Prigogine [20a,b,c] and coworkers, and to the corresponding unambiguous experimental validations of De Keppers, Boissonnade[20d,e] and Epstein groups,[20f,g] the spatial organization processes of DHP and lignin are tentatively described as "chemical morphogenesis" processes initiated by a non-linear, "complex", oxidasic enzyme system and driven by random chemical interactions. Adapted from a cartoon of De Keppers *et al.* (20[e], p. 86), this figure is only a draft. It tends to outline, as a function of time and of a generalized spacial-3D distance, the evolution of the concentrations of some molecular species possibly involved in the sub-molecular mechanisms of DHP-aggregate formation at a liquid-solid interface occurring in the diffusion cell reactor,[13g,h] in which the peroxidase-polymerization of DHP is performed through diffusion into a cellulose-pectin composite mat, for example.

As previously discussed,[1f,c] and also according to Wayman's and Freudenberg's earlier models, the formation of relatively short and thus soluble oligolignols *(2 f.)* would occur first, leading, as just mentioned, to their cooperative self-assembly, as insoluble lignin, like oligolignol networks *(3 f.)*, finally appearing as 3D patterns, granular nano-structures, at macroscopic cyto-

chemical level *(4 f.)*. Thus, DHP formation by cooperative interactions and self-organization is viewed, according to polymer chemistry, as a thermodynamically and stochastically ("statistically" or "randomly" would be equivalent terms!) "simple and natural" phenomenon. In this respect, the (bio)synthesis of DHP and lignin appears to be driven not only in the initiation *(1 f.)* but also in the aggregation *(4 f.)* steps, according to a balance mechanism between energy dissipative and conservative processes, again emphasized, through thermodynamically-constrained mechanisms very similar to those described during the "chaotic reactions of polymer string formation" and also during the "bifurcation process", as extensively discussed by Prigogine (20[d], 20[a] pp. 246-250). According to Eigen's authoritative contribution to the self-organization of the matter and to the evolution of biological macromolecules,[21] the word "random" refers here to the pre-existence of elementary (*i.e.* atomic, molecular and polymer) structured building-blocks and to the absence of a pre-formed systemic (*i.e.* supramolecular assemblies) organization. For avoiding, as previously done,[1e] any controversy on the question of the "random or not-random" nature of lignin origin, this point of view is not accounted here any more.

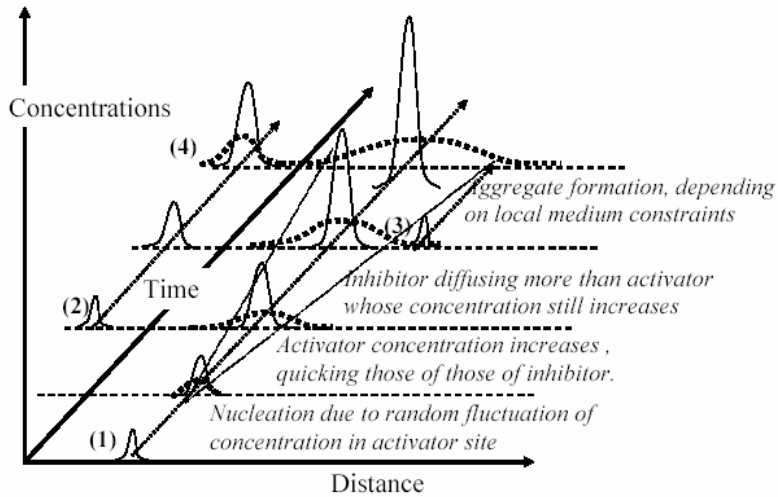


Figure 1: Formation of "clusters", a granular structure of DHP, during "chemical morphogenesis", involving the antagonistic effects of activation and inhibition of the polymerisation reactions of free radical monomers and of the oligomeric fractions of lignins. The formation of a first aggregate, (1), initiated by a random "local" fluctuation, induces, as a function of time, an autocatalyzed activation and polymerization of monomers (2), with the formation of oligomers, subsequently aggregated by a first localized and fast accumulation (continuous bell-shaped distribution curves), which becomes more extended and slower (discontinuous curves). The formation of other aggregates is possible (3) or not (4), depending on the "distance" types *vs.* the internal and external constraints of the system and on the cooperative molecular interactions (see the text)

Consequently, if considering first – in this respect – the peroxidase-oxidase mechanism, one has to emphasize, as also clearly stressed by Eigen,[21] that Prigogine and his coworkers demonstrated that "a combination of autocatalytic reaction behaviour with transport process may lead to a peculiar spatial distribution of the reaction partners", which he called "dissipative structures", *i.e.* structures resulting from a dissipation of energy rather than from molecular conservative forces. A very clear presentation of the corresponding thermo-dynamic balance mechanism between dissipative and conservative processes in, respectively, equilibrium and non-

equilibrium structures, is given by Prigogine in his seminal book,[22] as illustrated in Figure 4 of Chapter 8, on the creation of order in open systems, shifted far from equilibrium by external constraints. Including the reaction loops and complex kinetics depending on the redox potential of the phenolic effectors not consumed during the reaction, as reported by Kummer and coworkers,[5a-c,7] the peroxidase-oxidase system mechanism is consistent not only with the possibility of supporting pattern formation but also with the nucleation steps in the synthesis of DHP models and of *in situ* lignins.

As to the related dehydropolymer (DHP) formation, one can emphasize, as illustrated by Pacault,[20d] Epstein,[20f] and Kondepudy and coworkers,[23] that the spatial inhomogeneities can interact with and even amplify the temporal non-linearities in evolving complex systems brought about by autocatalytic mechanisms and by the competition between the internal and external constraints, which fully agrees with Prigogine's above-mentioned views. The importance of the "perfect" mixing conditions in either "small" reaction vials or "large" reactors, to the structure of the reaction products was experimentally demonstrated by these authors, who emphasized the practical importance of the instabilities in "thermokinetic phenomena".[20d] The poor reproducibility observed during DHP synthesis according to the reaction conditions, "mixing", sometime deplored but seldom discussed when quantitatively … analyzed, is fully consistent with this type of instability of the autocatalytic enzyme system. According to these observations, B. Cathala and coworkers[24] showed, again in agreement with other authors, that an "as careful as possible control" of the state of the reactor, of the preparation conditions and of the reagent mixing allows significant improvements of the reproducibility between DHP preparations. However, because of the lack, to the best of our knowledge, of more precise quantitative and specific data on the other autocatalytic process steps of nucleation and aggregation during the DHP synthesis plotted in Figure 1, no other comments are attempted here.

CONCLUSIONS

Trying to combine and to express as simply as possible, in a "foreign language", thus sometimes unavoidably inexact, a large number of data arising from biochemistry, physical chemistry and thermodynamics, this short note has to be viewed mainly as an illustration of the interest of the multidisciplinary approaches to the biosynthesis of lignin and synthesis of DHP models. It is thus seen as an invitation to reinforce and enlarge the cooperations; the idea is common and of course not new,[25] yet requiring some insistence to currently survive.[1e] Furthermore, it strengthens the wish that such scientific cooperativity … would contribute not only to breaking some "closed circles of conventional research", but also to opening accounts on not only old, "forgotten", but also new, "non-conventional" ideas as typical and ultimate illustrations in the case of lignin biochemistry, formation of nano clusters and related fractal properties of lignin and DHP, already pertinently explored, but not yet revealed here, by J. Gravitis and coworkers![26]

REFERENCES

[1a] T. Higuchi, "Biosynthesis of lignin" and "Preface", in "Biosynthesis and Biodegradation of Wood", edited by T. Higuchi, Acad. Press, Orlando USA, 1985, pp. 141-160 and pp. XV.

[1b] B. Monties, *Cellulose Chem. Technol.*, **39**, 341 (2005).

[1c] B. Monties, *Polymer Degrad. Stability*, **59**, 53 (1998).

[1d] B. Monties, in "Advances in Phytochemistry", edited by Ph. Imperato, Research Signpost Pub., Kerala, India, 2003, pp. 1-48.

[1e] B. Monties, *Cellulose Chem. Technol.*, **40**, 685 (2006).

[1f] B. Monties, "Recent Advances on Lignin Inhomogeneity" in *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europ.*, edited by C. F. Van Sumere and P. J. Lea, Oxford Univ. Press, U.K., 1985, **25**, 161.

[2] C. S. Bestwick, I. R. Brown and J. W. Mansfield, *Plant Physiol.*, **118**, 1067 (1998).

[3] A. Ros Barcelo, *Planta*, **207,** 207 (1998); see also *Trees*, **20**, 153, on "the gap in our knowledge of why lignifying xylem tissues are able to accumulate H_20_2" (2006).

[4] R. Mahalingham and N. Fedoroff, *Physiol. Plant*, **119**, 56 (2003).

[5a] U. Kummer, M. J. B. Hauser, K. Wegmann, L. F. Olsen and G. Baier, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2084 (1997).
[5b] B. J. M. Hauser and L. F. Olsen, *Biochemistry*, **37**, 2458 (1998).
[5c] L. F. Olsen, M. J. B. Hauser and U. Kummer, *Europ. J. Biochem.* **270**, 2796 (2003).
[5d] U. Kummer and G. Baier, *Naturwissenschaften*, **83**, 522 (1996).
[5e] G. Baier, P. Strasser and U. Kummer, *Z. Naturforsch. A (Phys. Sc.)*, **50**, 1147 (1995); see also ref. 1[b], pp. 361, ref. 66).
[6] H. Degn, *Nature*, **217**, 1047 (1968).
[7] U. Kummer, K. Valeur and G. Baier, *Plant Peroxydases Newsletters*, **4**, 30 (1994).
[8] M Eigen, *Naturwissenschaften*, **58**, 465 (1971); see also pp. 467 and 473.
[9] F. Van de Velde, F. Van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Trends in Biotech.*, **19**, 73 (2001).
[10a] K. Freudenberg, *Angew. Chem.*, **61**, 228 (1949).
[10b] K. Freudenberg in "Constitution and Biosynthesis of Lignin", edited by K. Freudenberg and A.C. Neish, Springer, Berlin, 1968, pp. 46-122; see also *Fort. Chem. Org. Nat. Stoffe*, **11**, 43 (1954).
[11a] L. Salmen, *C. R. Biologies*, **327**, 873 (2004).
[11b] J. S. Stevanic and L. Salmen, *Celulose Chem. Technol.*, **40**, 761 (2006).
[12] V. Méchin, S. Baumberger, B. Pollet and C. Lapierre, *Phytochemistry*, **68**, 571 (2007); see also G. Jacquet, B. Pollet, C. Lapierre, C. Francesh, C. Rolando and O. Faix, *Holzforschung*, **51**, 349 (1997).
[13a] R. Nakamura, Y. Matsushita, K. Umemoto, A. Usuki and K. Fukushima, *Biomacromolecules*, **7**, 1929 (2006).
[13b] M. Micic, K. Radotic, M. Jeremic and R. M. Leblanc, *Macromol. Biosci.*, **3**, 100 (2003).
[13c] S.-Y. Guan, J. Mlynar and S. Sarkanen, *Phytochemistry*, **45**, 911 (1997).
[13d] Y. Chen and S. Sarkanen, *Phytochemical Rev.*, **2**, 235 (2003).
[13e] A. Barakat, J.-L. Puteau, L. Saulnier, B. Chabbert and B. Cathala, *Biomacromolecules*, **8**, 1236 (2007).
[13f] N. Terashima, R. H. Attalla, S. A. Ralph, L. L. Landucci, C. Lapierre and B. Monties, *Holzforschung*, **49**, (part 1), 521-527 (1995), see also **50**, (part 2), 9-14 (1996).
[13g] J.-P. Touzel, B. Chabbert, B. Monties, Ph. Debeire and B. Cathala, *J. Agric. Food Sci.*, **51**, 981 (2003).
[13h] D. Lairez, B. Cathala and B. Monties, *Biomacromolecules*, ***6***, 763 (2005).
[13i] A. Barakat, H. Winter, C. Rondeau, B. Saake, B. Chabbert and B. Cathala, *Planta*, **226**, 267 (2007).
[14a] N. Grozev, V. Aguié-Béghin, B. Cathala, R. Douillard and I. Paniatov, *Colloïd Polym. Sci.*, **282**, 429 (2004).
[14b] B. Cathala, V. Aguié-Béghin and R. Douillard, *C. R. Biologies*, **327**, 77 (2004).
[14c] B. Cathala, L.T. Lee, V. Aguié-Béghin, R. Douillard and B. Monties, *Langmuir*, **16**, 10444 (2000).
[14d] M. Micic, J. Orbulescu, K. Radotic, M. Jeremic, G. Sui, Y. Zheng and R.M. Leblanc, *Biophys. Chem.*, **99**, 55 (2002).
[15a] G. Schwarz, *Eur. J. Biochem.*, **12**, (part 1) 442-453 (1970); see also 15[b] part 2 and 15[c] part 3, following respectively pp. 454-460 and pp. 461-467.
[15d] G. Ercolani, *J. Phys. Chem. B.*, **107**, 5052 (2003).
[15e] G. Ercolani, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 16967 (2003).
[15f] G. Ercolani, L. Mandolini, P. Mencarelli and S Roelens, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3901 (1993).
[16a] J. Reguera, J. M. Lagaron, M. Alonzo, V. Reboto, B. Calvo and J. C. Rodriguez-Caballo, *Macromolecules,* **36**, 8470 (2003).
[16b] B. Li, D. O. V. Alonzo, B. J. Bennion and V. Dagget, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11991 (2001).
[16c] J. E. Morel, *J. Theor. Biol.*, **112**, 847 (1985).
[16d] V. Stöckmann, *J. Polymer Sci.*, *Part C*, **36**, 363 (1971).
[16e] V. Stöckman, *Tappi J.*, **54**, 2033 (1971).
[17] K. Bamber, *IAWA J.*, **22**, 205 (2001); see also W. M. Harlow, *Paper Trade J.*, **24**, *TAPPI Sect.* (part II), 33 and (part I), 31 (1941).
[18] M.- P. Laborie, L. Salmen and C. E. Frazier, *Holzforschung*, **58**, 129 (2004).
[19] K. L. Ngai, R. Casalini and C. M. Roland, *Macromolecules*, **38**, 4363 (2005), see also K. L. Ngai and C. M. Roland, *Macromolecules*, **26**, 6824 (1993) and K. L. Ngai and R. W. Rendell, *J. Molec. Liquids*, **56**, 199 (1993).
[20a] I. Prigogine and I. Stengel, in "La nouvelle alliance: métamorphose de la science", Chap. V, pp. 204-208 for "reaction loop and non linearity"; Chap. VI pp. 242-250 for "fluctuations and chemical kinetics", Gallimard,. Paris, 2[d] ed., 1986.
[20b] G. Nicolis and I. Prigogine, in "Introduction to complexity", translated into French by P. Chanu as "A la recherche du complexe", see Chap. 1, 2 and 5, "Les bases microscopiques de la complexité", P.U.F., Paris, 1989.
[20c] I. Prigogine, *Naturwissenschaften*, **76**, 1 (1989).
[20d] A. Pacault, P. Hanusse, P. de Kepper, C.Vidal and J. Boissonade, *Acc. Chem. Res.*, **9**, 439 (1976).
[20e] P. De Keppers *et al.*, *La Recherche*, **305**, 84 (1998).
[20f] I. R. Epstein, *Nature*, **344**, 321 (1995).

[20g] I. R. Epstein, I. Lengyel, S. Kadr and M. Yokohama, *Physica A*, **188**, 26 (1992).
[21] M. Eigen, *Naturwissenschaften*, **58**, 465 (1971), see note 1, pp. 467 and 473 on "randomness" and 'phenomenological *versus* thermodynamic theories".
[22] I Prigogine, in "Introduction to thermodynamics of irreversible processes"; French translation by J. Chanu as "Introduction à la thermodynamique des processus irreversibles", Chap. 8 *"Ordre et dissipation"*, see §3 *"Structures dissipatives"*, pp. 136-139 and §4 *"Instabilités briseuses de symétrie"* pp. 139-144, Dunod, Paris, 1962.
[23] D. K. Kondepudi, R. J. Kaufmann and N. Singh, *Nature*, **250**, 975 (1990).
[24] B. Cathala, B. Saake, O. Faix and B.Monties, *Polym. Degr. Stab.*, **59**, 65 (1998), B. Cathala, B. Saake, O. Faix and B. Monties, *J. Chrom.*, **1020**, 229 (2003), see also for effects "running" conditions A. Barakat, B. Chabbert and B. Cathala, *Phytochem.*, **68**, 2118 (2007).
[25] A.-M. Catesson, *C. R. Biologies*, **327**, 775 (2004).
[26a] J. Gravitis, *Cellulose Chem. Technol.*, **40**, 291 (2006).
[26b] J. Gravitis, A. Kokorevics and V. Ozol-Kalnin, in *Proc. ISWPC*, 2, 11-14, ATIP-EFPG, Nice, France, (2001); see also in B. Monties, *Ann. Proc. Phytochem. Soc.*, **25**, 161 (1985), edited by C. F. Van Sumere, Oxford Univ.Pres, U.K., and *Anim. Feed Sci. Technol.* **32**, 159 (1991).

Advances in Phytochemistry

Published by Research Signpost

2003; Rights Reserved

Research Signpost
T.C. 37/661(2), Fort P.O.,
Trivandrum-695 023, India

Editor
Filippo Imperato

Managing Editor
S.G. Pandalai

Publications Manager
A. Gayathri

Research Signpost assumes no responsibility for the opinions and statements advanced by contributors

ISBN 81-271-0018-8

LES POLYMERES VEGETAUX vol 2 part 1
226/529

Contents

Botanical variability and mechanical function of lignins: Two critical aspects of the plant phenolic secondary metabolism — 1
Bernard Monties

The role of plant phenolics in the postharvest physiology and quality of fruit and vegetables — 49
Vincenzo Lattanzio

Distribution of flavonoid aglycones in tribe *Anthemideae* (Asteraceae) — 85
Stephanie Ivancheva and Reneta Tsvetkova

The different folds adopted by plant cysteine endopeptidases belonging to papain family — 97
Géraldine Dehon, Anouar El Moussaoui, René Wintjens
Delphine Van Wuytswinkel Mohamed Azarkan and Yvan Looze

Halogenated natural products in streptomycetes — 109
Řezanka, T., Jáchymová, J. and Spížek, J.

Biosynthesis of plant steroid glycosides — 185
Zdzislaw A. Wojciechowski

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

Medicinal plants of Argentina. Pharmacological properties and phytochemistry — 209
Zunino M.P., Lopez M.L. and J.A. Zygadlo

VARIABLITE LIGNIFICATION

Δ * Metab primar % secondaire phenols

① Lignine : variabilité monomère | C_6C_3 lignins

I) come compose secondaire
A - phenols en général
B - monomeres lignol
C - metab polymerisation oxydatique

II. come types de lignines
A - anatomie (cell et subcell)
B - polymere (hetero H/G/S)
C - facteurs moleculaire
× oxydabilité (Redox)
× sterique
× autoorgan DHP

III. come facteur pop mecanique (support)
A - bois lignif normale (mecanism
B - bois et tissus de reaction
C - gravitropisme des monocot (noeud)

IV) Questions recurrents d'analyse
× composition / • teneur /
× effet système pour vget / • autorganisation
| thermodyn.
| analogie.

Donner metabolisme lignification B: 121

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India

Advances in Phytochemistry, 2003: 1-48 ISBN: 81-271-0018-8
Editor: Filippo Imperato

I Botanical variability and mechanical function of lignins: Two critical aspects of the plant phenolic secondary metabolism

clic here for the next

Bernard Monties
Equipe Prois vegetales et materiaux fibreux (INRA), CRA, 51686, Reims, France
INRA. Institut National Agronomique (INA) Paris-Grignon, Campus de Grignon
78850, Thiverval-Grignon, France

Abstract

Lignins are classified among 'secondary plant products' because of the large and specific botanical variability of their molecular structures and of their cell wall strengthening functions. The diversity of the biosynthesis pathways of lignin monomeric units and the complexity of their polymerisation reactions, do not allow a simple assignment of lignins to 'primary' or 'secondary' metabolites but can be related to plant evolution. The secondary character of lignins is however

Correspondence/Reprint request: Dr. Bernard Monties, Equipe Prois vegetales et materiaux fibreux (INRA), CRA 51686, Reims, France. E-mail: monties@jouy.inra.fr

2003 - Adv. Phytochem. 1 - p1-48 (Imperato P. ed)

*clearly demonstrated by **i** : differences among the tissue lignification patterns (tree xylem and cork, annual plant sclerenchyma and parenchyma), **ii** : variety of the 'usual' phenyl-, guaiacyl- and syringyl-lignin types reported in Gymnosperms, Angiosperms and Monocotyledons as linear and bulk polymers (Fig 1), **iii** : 'unusual' specific lignification patterns of fibre plants (Flax and Kenaf) and of Gramineae (mainly Wheat and Maïze). Redox potentials, steric effects and molecular complexe formations are major factors of this structural variability and biological plasticity. They determine some spatial 'order' in the lignin 'random' networks, by self-organization effects. This secondary diversity is also shown by the molecular mechanisms of cell wall strengthening, during 'normal' growth and 'induced' reactions in soft- and hard-woods, in lianas but also in grass straws (nodes reorientation) because of mechanical stresses resulting from interactions between the components of the 'cell wall polymer system'. In spite of these clear evidences of this functional molecular variability, and thus secondary character of lignins, care has to be taken to some recurrent analytical questions, related to local/total lignin content and monomeric composition. In this respect, the importance to look lignified plant cell walls as 'self-organized complex systems' is emphasized. Possible mechanisms of self-organisation spatio-temporal effects are suggested, in agreement with the currrent paradigm of lignin random formation.*

1. Introduction

Concerning 'plant phenolics as secondary metabolites', in this review, emphasis is placed on the botanical variability of lignins, particularly on their chemical structure ('lignin-types') as well as on one of their biological functions ('mechanical strengthening').

Taking also into account a few selected data concerning lignin biosynthesis, some introductory comments seems necessary to make these choices clearer. The occurrence of ~~'lignin'~~ as ~~'defined'~~ chemical compound, ~~'endowed~~ with biological functions', has long been recognized, by agricultural chemists during the last decades of the XIX century, by H. Braconnot , H. Payen and particularly E. Fremy [1] who emphasized the differences in chemical composition between ~~'vessels'~~ and ~~'fibres'~~ isolated from woods. The names ~~'vasculose'~~ and 'fibrose' were even proposed by Fremy for the corresponding fractions of wood, whose characteristic reactivity in acid and alcaline medium could be even nowadays attributed to contemporary ~~'lignins'.~~ The biological, genetic and ecophysiological variability of lignin and thus the corresponding plural, ('lignins'), was however, recognized much later, in the second part of the XX century, mainly by biochemists and plant physiologists, as previously reviewed [2]. The fact that, 'lignin in plant has a certain biological plasticity or variability and is able to adapt it self to external conditions' was stated pertinently, for

'Lignins' Fremy cycle step:2; next ..clic here !

example by K. Kratzl, in the case of the formation of reaction woods [3]. He also emphasized the importance of 'biogenetic considerations' [4], to provide a new implulse in the usual studies of lignin which were mainly based on organic- and also macromolecular- chemistry. In fact, according to K. Freudenberg, until the sixties only the 'haziest notions about the nature of polymeric molecules' were developed. Thus, concerning the chemical constitution of lignin, advances were 'depressingly slow'[5], because *first*: the question of the occurrence of any 'ordered' or 'fortuitous' polymeric constitution of lignin was only stated, considering lignin as either a 'refuse' or a 'chemical individual'[5], and *second*: that lignin studies were focused in priority on Conifers species and even only on Spruce wood, in relation to the short term interests of pulp and paper production.

At this time nevertheless, due to newly adapted methods of chemical characterisation, mainly ethanolysis, nitrobenzene- and/or potassium permanganate- oxidations , reviewed earlier [2] - [6], the three most frequent types of phenylpropane lignin monomeric units: 'monolignols' or preferably 'lignols', were unambiguously recognized in different proportions, even in 'the' lignin of normal and reaction woods of Conifers, and were 'identified' according to their aromatic cycle substitution pattern (fig1), as:

:1: non-methoxylated, *p*-hydroxyphenyl, or '**phenyl**': (H),
:2: p-hydroxyphenyl-*ortho*-methoxylated, or '**coniferyl**' or '**guaiacyl**': (G),
:3: p-hydroxyphenyl-*vic*-dimethoxylated, or '**syringyl**': (S).

Due to the fact that Gymnosperm wood lignin contains mainly G units, most of the related models of lignin 'molecular' constitution were then based, and often later, exclusively discussed, as a *homo*-coniferyl G-polymer [7]. The large diversity of 'lignin' in the plant kingdom was however at that times, very clearly demonstrated particularly in1958 by Gibbs[8]. For example, in a systematic survey of 90 species of Monocotyledons, including 72 genera and 37 famillies, Gibbs emphasized that about 65, gave positive unambiguous evidences of the occurrence of S units in lignin. He reported also small amount of S even in some Conifers, he concluded that 'in all probability, the lignins (plural!) of all Angiosperms contain the syringyl grouping'. Moreover, a functional significance of this variability of lignins, in terms of conducting- and/or supporting-tissues, was then also suggested, (see the comments by Thimman and by Wareing, published in this key reference).

Whatever their pertinence, these early visionary views of biologists were rather overlooked or not understood, probably due to a context of short term industrial priorities. In this respect, the 'reference' textbook, coedited in 1971 by Sarkanen and Ludwig [9], provides some unmatched views on the structure and the occurrence of lignins and makers no exception, with its chapter

GNU PDF MERGE AND SPLIT TRIAL VERSION, purchase

on lignin classification and distribution [10], as it emphasizes for exemple, the 'appallingly scant current knowledges of the lignin component (singular!) in herbaceous Dicotyledons'. Over the last two decades, the emergence of possible 'biotechnological modifications' of lignins in terms of macromolecular structure [11], of biosynthesis regulation and of of biological functions [12], [13], recently reviewed, also reinforce the need for a more precise assessment of the biological variability among the many 'lignin types' and related phenolic compounds.

Currently, any plant biochemist would further stress that the characteristic of 'secondary plant product' which has been clearly attributed to the monomeric plant phenolics metabolites in the past [1, 14], is even now much more rarely taken into acount in the case of the 'phenolic polymer lignin'. It is thus one of the purposes of this review to consider, albeit though selectively due to a lack of space, both the structural and the functional variability of lignins, in view of this so called 'secondary' metabolism.

This chapter documents thus three points :

(*i*) 'lignin' as a member of the 'cluster'of the plant phenolic secondary products, in respect to phytochemical differentiation and evolution,

(*ii*) 'lignins' as a set of cell wall linked phenylpropanoid polymers, in respect to the diversity of their molecular ,mainly monomeric, structure and to the occurrence of specific H-, G- and S-lignin 'types' or 'fractions', identified and isolated as 'defined' chemical compound,

(*iii*) 'lignins' as functional components of plant cell walls, when integrated in the polymeric netwoorks of the wall layers, in respect to mechanical properties, to growth stresses generation and to reorientation of stems by formation of reaction tissues. This review is however limited to Gramineae, Monocotyledons, and a few cases of woody Angiosperms.

To conclude, some recurrent methodological or analytical difficulties which introduce some uncertainty into these discussions and views are finally presented, before a few general comments on self-organisation of lignins and cell wall netwoorks.

In an attempt to provide more stimulating and synthetic points of view, some analytical data previously reported, even by other authors, were compared on the basis of 'standard correlation coefficients'. In this respect, even unconventional ideas and/or provocative hypothesis have been deliberately put forward.

2. Lignin as a phenolic plant secondary product

Plants have a characteristic ability to synthetise and accumulate a large diversity of 'simple' low molecular weight (micromolecular) and 'complex'

polymeric (macromolecular) phenolic compounds, which are biogenetically related and usually classified as 'secondary compounds' even if the meaning of primary or of secondary metabolism or products change according to the authors and currently appears as oversimplified. Having discussed these opinions in the case of lignins, some aspects of biosynthetic pathways and polymerization reaction of lignols, designed as factors of such diversity, are briefly reviewed here .

2 A. Plant phenolics as secondary metabolites

Secondary compounds have been comprehensively reviewed by Conn and coauthors [15], who defined secondary compounds as 'those natural products, usually of plant origin, which do not function directly in the primary biochemical activities that support the growth, development , and reproduction of the organism in which they occur; such compounds being restricted in their occurrence or distribution in nature'. At least two chapters of this book were more specifically devoted to lignin, respectively to the 'enzymology of the monomeric units biosynthesis', by Grisebach, and to the lignin formation (lignification) viewed as a 'process integrated in cells and tissues differentiation', by Wiermann. Not only xylem but also the other specific elements, e. g. sclerenchyma, were emphasized. As primary metabolic pathways are not necesarilly the same in all species however, Bell emphasized , in this book also, the need to revise our ideas concerning the role or roles of many biological coumponds [16]. Even when the two century old concept of 'secondary metabolites', which could be attributed to Kossel and to Czapeck was 'largely mysterious'[17], one now can assume, with these last authors, that the secondary compounds play, by their variability, a major role in the adaptation of plants to their environment. As later discussed, this is particularly true for lignins 'plasticity'. Furthermore, based on relevant comprehensive experimental evidences reviewed by Gottlieb [18], and thus, contrary to century old beliefs, the so-called 'secondary metabolism', which was designated also by him as 'special', is likewise essential to plant life and adaptation.

In this respect, this primary versus secondary hierarchical classification of the general plant phenolic metabolism seems now simplistic. In agreement with Gottliebs's views on 'special / general' metabolisms, it thus seems preferable for example to divide the lignin biosynthetic pathways according to three general 'sequences' : shikimate-, cinnamic acids- and lignin-monomers-parts [12], or to discriminate two main 'primary-' and 'secondary-' lignin types according to their 'commonness in vessels' and their 'adaptability in fibres', corresponding very roughly however, to respectively the guaiacyl- and syringyl-lignin types [19].

More specifically, (*i*) the very large functional diversity of lignification patterns of plant cell walls, (*ii*) their great specific differences in temporal sequences, and (*iii*) the related variables of spatial distribution in the cell wall

layers during the differentiation of plant organs allows to emphasize unambiguously 'the formation of lignin as one of the most important achievement of the secondary metabolism' [20]. However, the need to take into account more fuzzy boundaries between these two different metabolisms has also to be considered due to the extensive reprogramming of both (i) the 'flexible' secondary metabolism, previously reported at the gene expression level [21], and more recently confirmed after UV induction of the fine regulatory networks involved in the 'simple' flavonoid biosynthesis [22], and (ii) the 'common' primary metabolism as shown for example, even after a small decrease of the transketolase activity, in Tobacco transformants, which markedly affected both the lignin content and the lignin distribution in the xylem [23].

Similarly, it seems relevant to also 'reduce the contrast' between lignins, viewed as polymer of lignols only, and non-lignin phenolics linked to the cell walls, such as cinnamic acid derivatives linked to either polysaccharides or lignin fractions [13]. One of the main reasons, could be the progressive concerted evolution 'towards diversity' of both the macromolecular and the micromolecular primary and secondary phenolics, since the appearance of land plants [24], which could be related to two main factors. First, as far as UV-solar irradiation is concerned, a protective adaptation against UV damages by deamination of aromatic aminoacids has been proposed [25], accounting for the appearance of the different famillies of phenolics and making thus possible, quite early in the evolution, the accumulation at the cell surfaces of cinnamic acids, phenylpropanoid and flavonoid derivatives, and then later of the lignins and/or lignin-like compounds endowes in addition of adhesive-strenghtening functions, as discussed also elsewhere [26]. Second, as far as the variable oxygen content in atmosphere is concerned, the progressive increase of oxidation degree, by hydroxylation, of these phenolics, analogous for the other micromolecular metabolites [24], with a corresponding protection, by methoxylation, allowing a progressive diversification of the aromatic cycle substitution patterns, from H to G then S in the case of lignols and of the corresponding cinnamic acids derivatives.

If these two 'mechanisms' are combined, some phylogenic and ontogenic correlations can be recognized. The most primitive plants would have first, excreted some non-methoxylated, H type, phenolics which were polymerized after that, non enzymatically at the outside of their outer membrane, combining thus UV-screening effect and oxydative adhesive strengthening possibility, which correspond to the 'current' characteristic function of the primary wall middle lamella (ML), (cf. § 4A). On the other hand, dimethoxylated S-type lignols would have appeared later on, being thus deposited in Dicotyledons, mainly in the fully extended second wall layer (S2) of the secondary cell wall (SW) thickenings at the inside of the XM layer of fibres, and in the

Monocotyledons, during the 'lignification' of collenchyma into sclerenchyma (§: 3A).

Accordingly, the occurrence in plant cell walls not only of polymerized lignols (lignins) but also of other monomeric, 'simple', and/or oligomeric, 'complex', phenolics seems to be viewed now as attempts at evolutionary advances by plants, based on potential advantages gained with the secondary, 'special', excreted phenolics metabolites [18, 24], and not at all as evidence of 'waste' or 'refuse cast outside', as prevously discussed [13] .This seems to be particularly the case for proanthocyanidins [27-30] but also for hydroxycinnamic acids (HCA) in Dicotyledons [31] and in Monocotyledons [32], and likely also for simpler flavonoids [33]. Concerning HCA, in contrast to the Monocotyledons , where the occurrence of, for example, ferulic acid in cell walls is widespread (25 of the 52 families examined), in Dicotyledons its occurrence was restricted to Cariophyllales, 9 of 150 families. At the other hand, PCA was mainly found in the group of FA containing Monocotyledons, but also in some Dicotyledons species, in an appearantly erratic fashion. These specific variations, probably related in the case of PCA to changes lignification pattern [13, 34], will not be detailled here also.

However, as they are central in each of the three 'parts' of the lignin secondary, 'special', metabolism, the general variability of HCA deserve more comments concerning their relative occurrence and contents in the various plant cell walls, keepind in mind their limits of detection, seldom discussed (cf § 5A). The 'bewildering' array of the phenolic acid compounds [35] is currently well recognized among the several 'discrete groups' [36] and chemically or biogenetically defined 'famillies' of other phenolics, but can conceal at the same time both some very significant variations in HCA absolute total wall contents and changes in relative molar proportion when compared to polymerized lignols in lignins. It is also the case of benzoic acid derivatives long known to be more specifically 'associated' to mainly Salicaceae woods or lignin fractions [37-39]. In the most complex case of Grasses which are particularly 'rich' in HCA [32], in p-coumaric (PCA) and in ferulic (FA) acids mainly, the HCA relative molar ratio can be lower by about one to two orders of magnitude as compared to the total lignols contents, according to the development stages [40, 41], the plant species [42] and even the plant 'groups' : *Pooideae* versus *Panicoideae* [13, 43, 44]. For example, much higher PCA contents were reported in Maïze and Sorghum (*Panicoideae*) than in Pooideae : Wheat [45] and Ryegrass [41]; the relative variations in FA content were however not so large. The occurrence of PCA reported in isolated lignin fractions of Asparagus sp. [46], of PCA and FA and even of sinapic acid (SA) *in Linum sp.* [47] but not reported previously [31, 32] are likely due to detections artefacts, related to such biological variations both in Monocots and Dicots. Similar differences between species, and even cultivars, could also give rise to such apparent discrepancies as, for

example, the occurrence of SA reported in significant quantity in Rice cultivars [48], but not detected among the cell wall linked HCA , mainly PCA and FA, in Rice varieties obtained in France from CIRAD, Montpellier grown and analysed in 1981 and 1982 (cultivars: *Eustillette A, Euribe* and four *Stirpe* cv. ; unpublished data, with D. Jouin and M.-T. Tollier). In spite of its 'secondary type' restricted distribution in Dicotyledons [49], the occurrence of SA has been recently reported among the alcali-extractable fractions from both transgenic Tobacco [50] and Poplar [51], in low content however. In this last case PCA, FA and SA contents were relatively low : about one per cent of the 'total' lignin in these transformed plants cell walls, and only one per thousand in the controls, in which further SA was not detected.

It can be thus put forward that both the concerted changes in the primary and/or secondary metabolic pathways and their corresponding genetic and eco-physiological regulations, mainly contribute to reduce the contrast between the phenolic compounds, previously classified too simplistically, as primary and secondary compounds.

2 B. Lignins monomeric units as secondary metabolites

Current ideas concerning the biosynthesis of lignols have evolved quickly and profoundly during the last few years as previously reviewed with K. Fukushima [13] and as more recently stated and very critically discussed by Dixon's group [52], in the case of biosynthesis pathways of G and S lignols. As some apparent inconsistencies concerning the organisation of the lignols biosynthesis pathways (LBP) but also the analytical determination of the entire lignin polymer have been emphasized in depth by them, only some points, more directly related to the structural variability of lignins, are summarized here.

Concerning first the 'interrelations' between cell wall polysaccharides and lignins biosynthesis, two studies on LBP-transformed Poplars, for their Co-A-ligase [51] and for their O-Me-transferases [53] have demonstrated significant and concerted increase in 'total cellulose' and decrease in 'total lignin' contents. These data are thus indicative of possible compensatory regulatory interactions between the primary and secondary metabolisms discussed before. They require confirmation and further mechanistic analysis. Furthermore, the differences in the lignification patterns between these transformants clearly illustrate the 'secondary type' variability of the lignin monomeric composition. Concerning the S/G ratios of the 'total lignin', which were estimated in both cases by partial depolymerisation (thioacidolysis) as non condensed lignols [2], (§ 5 A), this ratio remained practically unchanged in the first case but decreased strongly in the second, being associated with : # an almost complete lack of S lignols in the wood of one of the 6 month old transformant, # a 17 % reduction in 'total' lignin, # twice more G condensed units in 'total' lignin and # a five fold selective reduction in the cell wall lignin linked alcali-extractible p-

hydroxybenzoic acid, without significant change however, in the corresponding vanillic acid yield!, (likely linked to polysaccharides, [39]). Moreover, an interesting qualitative change in the lignin monomeric composition in the fibres secondary wall was shown by UV-microspectro-photometry (fig 3 in [53]), indicating a shift of the absorbance maximum to the longer wavelength interpreted as a decrease in S-lignol content. Confirming the relatively limited interest of 'total lignin data' in lignin biochemistry [13], these last results illustrate the importance of integrating the spatio-temporal dimension, in the assessment of the 'secondary' character of lignins. In addition, the occurrence of 'unusual' FA and SA bound to the cell wall of Poplar transformants for CCR was reported [50], confirming this last comment, since the most severely transformed plants exhibited both altered mechanical strength and morphology of the vessels (probably with local changes in their phenolic composition) when xylem fibre morphology appeared relatively unchanged. A dramatic reduction of 'total Klason and Acetyl bromide lignin' was also reported in this study. Recalling the possibilities of complex and large modulation of the S and G distribution among cell wall types reported for exemples by Fujita, Okuyama and Yoshinaga, reviewed earlier [13], one can thus expect in the case of biochemical analysis of 'total' variations, the possible occurrence of even larger 'local' secondary transformations of wall phenolics among the different types of the transformed plant cell wall layers. Histochemical and chemical data reported recently in the cases of *Arabidopsis*- [54], of Tobacco and of Poplar-transformants for F5H [55], seems to agree with this proposal. *Arabidopsis* xylem cell walls normally shows a G lignin whereas S lignin appears in the interfascicular sclerified parenchyma; when in transformed plants, a S rich lignin was observed in all the cells that normally lignify. Furthermore, the effet was dependant of the choice of the gene promoter. Significant changes in both lignin distribution, 'total' contents and S/G monomeric composition reported in Tobaccoes and Poplars were also dependant of the promoter type and associated to deposition of 'S-rich lignin' [54]. At least in the case of Arabidopsis however, changes in lignification patterns were described not only in vessel and in fibres cell walls, but also in parenchyma cells, the most dramatic effects occurring apparently in the later. Large structural variations have been demonstrated in the cell walls of axial and radial parenchyma, of both softwoods and hardwoods, which however were not observed in the cell wall of the tracheids and the wood fibres [56]. Such data deserve attention before any extrapolations of this 'variability' into other 'non woody' annual plants can be made; all the more so since the occurrence of specific metabolic pathways have been clearly recognized at the level of sinapic acid derivatives [49] [57] and that the lignification patterns (sclerenchimatization) greatly change according to the plant species, organs (stem, leaves, ...) and aging [58].

This great variability and adaptability of S type lignification pattern, already emphasized here and clearly illustrated by these genetic manipulations, clearly states a 'secondary metabolite type' which has been also very recently recognized also at the metabolic level. Drawing attention very pertinently to the currently accepted lignol metabolic pathways, which require revision, Dixon and coworkers [52] have even suggested the occurrence of two new independent biosynthetic pathways to G and to S lignins respectively channeled by soluble or by membrane associated enzyme complexes, allowing thus a more finely regulated metabolic control of the gene expresions. More than twenty years ago, trying to specify the regulatory role of en zymes of Gymnosperms, Angiosperms and Monocots, the Higuchi group [59] unambiguously demonstrated several specificities of S lignol biosynthesis pathways, including phenolic acid and aldehydes for example, as precursors. Such views have very recently been put forward in the Chiang group, with the characterisation of a new sinapyl alcool dehydrogenase (SAD) in Angiosperms specifically expressed in the S rich lignin tissues [60], and by the modulation of the methylation steps of syringyl lignols by phenolic aldehydes [61]. All these data throw new light corroborating the 'special' character of the S lignification, leaving however unsolved questions. For example, the traditionally accepted pathway that sinapic acid is converted to sinapyl alcohol *in vivo* by Oleander and by Robinia shoots, has just been confirmed [62] challenging the general existence of SAD activity in Angiosperms. Similarly, *in vivo* demonstration of the uniformity and the generality of the regulatory effects of the lignol precursors reported *in vitro* on SAD seem required, even when convincing evidences of both the 'commonality' of G hydroxylation and methylation pathways in both Angiosperm and Gymnosperms and the corresponding 'specificity' of S pathway, have been provided in these papers. In this respect, the compartmentalization of enzymes and phenolic substrates and/or effectors [63-65] may be of paramount importance, in the partitioning of carbon between 'simple' and 'complex' phenolic including S and G lignin rich fractions and deserve more specific validations.

2 C. Monomers polymerization and primary metabolism

Unlike the biosynthesis of lignols, their dehydrogenative polymerization remains less extensively studied, in spite of its possible critical effects on lignin macromolecular structure. Many factors have contributed to this apparent lack of interest : (*i*) the uncertainties concerning the types of enzymes, likely peroxydases, (*ii*) the diversity of their potential isoforms, (*iii*) the involvement of metallic and phenolic catalysts, (*iv*) the evidence of synergic effects which differ *in vitro* and *in vivo* changing some time even the specificity against lignols and mainly (*v*) , the very nature of the oxydative substrate (H_2O_2 - peroxidasi versus O_2 peroxidase mechanism for example). Only the two last

LES POLYMERES VEGETAUX

points will be discussed briefly here, for their to potential account to the fuzzy metabolic boundaries already suggested between the primary and secondary metabolisms, reference only to a few relatively recent papers .

Contrary to the currently accepted 'dogma' of the non-specificity of peroxydasic reactions, the occurrence of substrate-specific peroxydases has been reported for example, by comparing the dehydrogenative polymerization of G type coniferyl alcohol (CAol) with the S type sinapyl alcohol (SAol) [66]. These two substrates however remain the two 'main' substrates, in addition to the corresponding H p-hydroxycinnamyl alcohol (Hcol) [59]. Among several isoperoxydases isolated from Poplar tissue culture, both a S-specific and a G-specific form were characterized *in vitro* [66], horse radish peroxidase chosen as reference displayed in these conditions similar activity only as G specific form. Furthermore, a significant enhancement of specificity against SAol was also demonstrated during *in vitro* peroxydase dependent oxidations [67] due to the presence of both Caol and a water soluble PCA ester extracted from the apoplast. However such 'enhencer' catalytic effects, reported in epicotyls extracts of *Vigna angularis*, were not observed with Tobacco apoplastic peroxidase extracts, which rapidly oxidized both SA and Saol, in addition to PCA, FA and CAol [68]. Confirming the secondary, 'specific', character of S lignol oxidative metabolism, other cases of S/G selectivity have been reported and were related to stress reactions, variously expressed *in situ* versus *in vitro*, with synthetic S type substrates [69, 70] and even, indicating different requirements for exogenous H_2O_2 [71] or for O_2 , suggesting the occurrence of oxidase- or laccase- type reactions [68], whose mechanism remains uncertain.

In more direct relation to the 'primary' energetic metabolism however, the possibility of a peroxidase-oxidase ,'oxidatic activity,' of peroxidases, which correspond to their well estabished catalytic production of H_2O_2 from O_2 [72], deserves discussion. Formation of hydrogen peroxide in the presence of O_2 at the expense of NAD(P)H, by bound peroxidases isolated from horse radish cell walls, has been unambiguously demonstrated in the presence of Mn^{2+} [73]. A relation to the oxidative polymerization of lignols during lignification was also suggested by these authors. Confirming these views, malate dehydrogenase was later found to be a possible source of *in vitro* production of NADH, which was oxidized by two different mechanisms and stimulated by various monophenols, especially by Caol [74]. Whereas, in the absence of added H_2O_2, the addition of NADH and malate as 'substrates' was reported to allow the *in situ* histochemical detection of peroxidatic activity in lignifying tissues of Carnation stems [75]. More recently, during the 'unusual' lignification steps of Flax fibres (cf §: 2B), levels of wall-bound peroxidases were shown to increase, when their ability to utilise malate to form H_2O_2 increased also as these fibres became more lignified [76]. Concerning the control of this unusual lignification pattern of Flax fibres, the involvement of factors other than the type of isoenzyme and the avialability

of both lignols and of H_2O_2 was suggested by this author.

Thus, in agreement with the data reviewed above, the possible modulation of enzymatic activities involved in both the lignol biosynthesis [60, 77], the production of peroxide and the polymerisation of lignols depend on the avalaibility of both the secondary phenylpropanoid- and the primary energetic-metabolites.

According to the recent evidence indicating the location of peroxidases in the plasma membrane of differentiating xylem of Poplar [78] and, taking into account the well recognized [79, 80] importance and complexity of the redox activity in plasma membrane also, one can emphasize that these biochemical regulatory effects could be also dependent on the biophysical organization of lignol monomers and oligomers at this interface. This effect could contribute to explain the differences between *in vivo* and *in vitro* activities discussed above. It corroborates also the importance of the polyfunctionality of the cell wall bound peroxidases [81] and of their metabolic plasticity [82] which likely contribute to the lignin macromolecular inhomogeneity [83]. Recently reported for the first time in the Morré's group [84], the fact that 'growth-related' and 'auxin stimulated'- NADH oxidase activity of the external surface of the plant plasma membrane respond to gravity stimulations and oscillates with a temperature compensated periodicity could also contribute to modulate cell wall organisation and lignin polymerisation. With respect this NADH-peroxidatic (NOX) activity of bound peroxidases, the catalysis mechanism, by ternary complex, involving two phenolics (lignols) for one oxygen molecule [72] must be stressed. It can be formaly identified to an autocatytic chemical open system. According to Kondepudi and Buhse [85], such system can be specified by the reaction step:

$$A + B = 2\,B$$

in which the reaction product : B (a lignol-radical, here) reacts as catalyst during the oxydation of the substrate: A (a lignol as phenol or phenate, here) allowing the resulting auto-catalyzed formation of two lignol radicals B, here coupled with the bi-electronic reduction of O_2 in H_2O_2. According to these authors and to related views [86], one can expect during the *in muro* lignol polymerization, which is probably controlled by gradient diffusion effects, the occurrence of both (*i*) time dependent reactions related to the plasmlemna NOX oscillations, (*ii*) spatial distribution effects, 'self seeding' [87] or 'self-organization' [13], setting the stochastic, 'random', nucleation of lignin in discrete sites [88] during the initiation of cell wall lignifcation, (cf. § 4). Both effects could determine lignin inhomogeneity during lignification; they remain entirely hypothetical, to the best of our knowledge. The *in vitro* occurrence of oscillatory and complex dynamic reaction patterns of NOX previously demonstrated [89, 90] more recently characterized [91, 92], will be discussed elsewhere.

3. Variability of lignin types

The secondary character of lignins is emphasized here in view of the variability of a few selected lignification patterns according to (*i*) anatomical data (on cell wall layers and tissues), to (*ii*) chemical structure (on monomeric composition of 'usual' H-, G- and S-types to (*iii*) only two unusual cases (Flax and Kenaf) and finally to (*iv*) studies of lignin polymer models (*in vitro* factors related to this variability).

3 A. Ultrastructural variability of cell walls and tissues

The variability of lignin distribution has been mainly studied in wood, 'xylem', cell wall layers in the softwoods of Gymnosperms and in the hardwoods of Angiosperms, in relation to pulp and paper production. Convincing evidence of quantitative and qualitative variations in lignification patterns at the levels of cells and tissues of both normal- (early- and late-) and reaction-woods have been discerningly reviewed [56, 93-97] and thus will not be discussed here again, excepting the occurrence of S rich lignin fractions from Angiosperms wood and from Monocotyledon stems (cf §:3B).

Furthermore, very significant differences among these lignification patterns have been demonstrated, by combination quantitative microscopy procedures, between trees (Pine and Poplar) and annual plants (Flax and Wheat) [98]. Significant differences between fibres and vessels, both in lignin contents and in S/G ratio, appeared then higher in Poplar, lower in Flax and less distinct in Wheat. The extent to which these last values may vary according to cultivars and growth conditions however remains unknown. In agreement with the lignin functional significance (in cell adhesion, sap conduction and mechanical strength) of these differences related to plant evolution [13], the levels of lignification, expressed as % of 'local' lignin contents, were much lower in the fibre secondary walls in Poplar, Wheat and Flax (about 10%) than in Pine (about 20%) suggesting that less lignin was required to achieve strength in Angiosperms than in Gymnossperms. Lignification levels in middle lamella seemed however of the same order, except in Wheat where lignin content was the lowest and where, relatively thicker fibre S1 layer were also observed, confirming again the specificity of the lignification of Monocotyledons. The occurrence of an unlignified 'gelatinous' layer [94] was also confirmed in libriform fibres of Poplar and of Flax, illustrating the extent of the very fine variations occurring at the level of individual cell wall layers also observed in the lignification of mild reaction wood [99].

Furthermore, fine variations in the middle lamella lignification pattern were also reported (*i*) in Poplar pith demonstrating the existence of a specific uncondensed and S-rich lignin (mistreated as ML lignin), (*ii*) in Magnolia-,

Beech- and Lilac-woods where small S lignol contents were detected in addition to H-lignin, occuring as major lignol in these middle lamellae [100, 101].

In this respect also, the lignification variability of the sclerenchyma and of the related non-lignified collenchyma, seldom studied, requires comments in the case of annual plants, Monocotyledons mainly and Dicotyledons. The sclerenchyma, together with the collenchyma, are located, along with the parenchyma, in the zone between the epidermis and the vascular-bundle tissue. As supporting system, also called 'stereome', they strengthen tissues and/or organs; the walls of the sclerenchyma cells becoming usually 'sooner or later' lignified, particularly in Monocotyledons: 'plants with sclerenchyma and without collenchyma' [102]. In Wheat stem, collenchyma and sclerenchyma contribute respectively to reorientation reactions and stem mechanical properties (cf. §: 4.2). Sclerenchyma appear typically as a rigid, relatively elastic and remanent tissue, due mainly to the lignification of its secondary walls (deposited over the primary wall after this later completed its extension), unlike the relatively plastic and tough collenchyma, which retains active protoplasts capable of cell wall reversible rearrangements, as reported after mechanical stimulation [103, 104]. A peculiar feature of lignification, reported in parenchyma cell walls and in the secondary wall of fibres of both woody Dicotyledons and Monocotyledons [56, 105, 106], is 'multiple layering'. These walls were shown to consist of layers of typical fibrous 'cellulosic' secondary walls separated by more isotropic layers, rich in pectin and in lignin, thus ressembling to primary walls, the global apparance being that of complete walls (primary plus secondary) laid down inside secondary one. To the best of our knowledge, this lignification pattern has not been systematically studied more in detail in relation to lignification, plant development and mechanical properties. In the case of growing internodes of Maïze, a correlation can be however suggested between these 'specific' lignification patterns and both the appreciable amount of lignin, reported even in the youngest parenchyma fraction [107] and the continuous lignification, whithout biphasic increase in thickness, of the cell walls of the sclerenchyma [108], (which would be expected according to a 'xylem fibre growth' model [13]). Another specific sclerenchyma lignification pattern, also 'unexpected' for the similar reason, has been reported during sclerenchyma differentiation in Lucerne stems [109]. In agreement with previous reports on lignification of collenchyma in Lucerne and Carrot for examples [110], lignin deposition occured first in the secondary walls of primary fibres of differentiating sclerenchyma and was accompanied by a relative S/G ratio increase in the 'total' internode lignin. Interestingly, an apparently similar effect could occurs during the primary phloem fibres differentiation in transgenic Aspen [60], where the biosynthesis of S-lignin precede that of G-lignin type, and during S sclerification in *Arabidopsis* [54].

3 B. Molecular variability: H-, G- and S- lignin types

In agreement with the reference views of Sarkanen and Hergert [10], any classification of lignins on a taxonomic basis still remains approximate. Lignin types are thus identified here on the basis of the relative frequency of the three most frequent H, G and S lignols, identified according cytological or/and chemical analysis, and whose detection limit questions must be taken into account (cf.§ 5A). The limited but real taxonomic value of the variations in monomeric compositon of lignins was clearly stated more than forty years ago, by systematic comparison of about thousand Angiosperms, Gymnosperms, Mono-cotyledons and more 'primitive' plants species [8, 111], by Gibbs. He emphasized, the frequent occurrence of S lignol traces in the G-rich Gymnosperms lignins, the occasional absence of S lignols in the atypical S-G Angiosperm lignins of some 'primitive' Dicotyledons and finally, the weak but significant occurence of H lignols in the H-G-S lignins of Monocotyledons. The detection of H units, also reported in other genera, including the most primitive plants requires comments (cf § 5A). These data were however, in complete agreement, with a more limited comparative study [112], indicating that, variations among eight Australian Eucalyptus species, at least as great as as that already found among a much larger number of the others North American Angiosperms. This led the authors to conclude that the S-G lignin 'can not be therefore be regarded as a chemical entity'. This differentiation between Gymnosperms and Angiosperms was later more precisely related to the high S-lignins content of the fibres, more specific of Angiosperm tissues [113], when at the opposite, no correlation was justified between high S contents and the occurrence of vessels [114], the later containing mainly G-rich lignin. In this respect, lignin monomeric variability illustrates some sort of 'secondary phenolic compound' specifcity and chemotaxonomic interest [115], in spite of the widespread occurrence of lignins, and also of some apparant discrepancies, probably due to ecophysiological effects. For example, 'high-syringyl lignins' appeared to be present in Birches and in Madrona; the tension wood of these trees being reported to contain even more S lignols than normal wood lignin [10], when only medium to strong S contents were independently reported in *Betula sp.* and *Betulaceae* [8, 113, 116, 117]. Thus, as previously suggested [11, 13], the variability of lignification, viewed here in terms of H-, G- and S-rich defined fractions or 'lignin types', reflects both the *in situ* 'intrinsic immutability' [10] or 'commonality'[60] of G-lignin, as indicative of plant vascularization by tracheids or vessels, and the corresponding 'inhomogeneity' or 'more variable distribution' of S-lignin, as indicative of plant reinforcement by fibres. The possibility of a progressive transition between these two 'extreme' functions has been clearly demonstrated recently by Yoshinaga [118] for example, in oak wood [119], illustrating again the plasticity of the lignification and of the plant cells.

Emblematic of lignin for most of the wood technologists and non-biologists, G-lignin type molecular structure has been intensively studied and reviewed [59, 120, 121]. The Sarkanen's textbook [9] remain a reference. It is enough thus to emphasize the currently accepted structural 'non uniformity' of lignin, even in Conifers, and of the related dehydrogenation polymers models, 'DHP', (cf. § 3C). According to their rate of formation [120], these DHP were termed 'bulk' and 'end-wise' by Sarkanen [122], who also supported the posssible occurrence , in Angiosperms,of a 'largely end-wise' lignin, and then relatively linear, S-lignin type (fig 1), as discussed elsewhere in relation to lignin macromolecular inhomogeneity [83] or heterogeneity [11, 13].

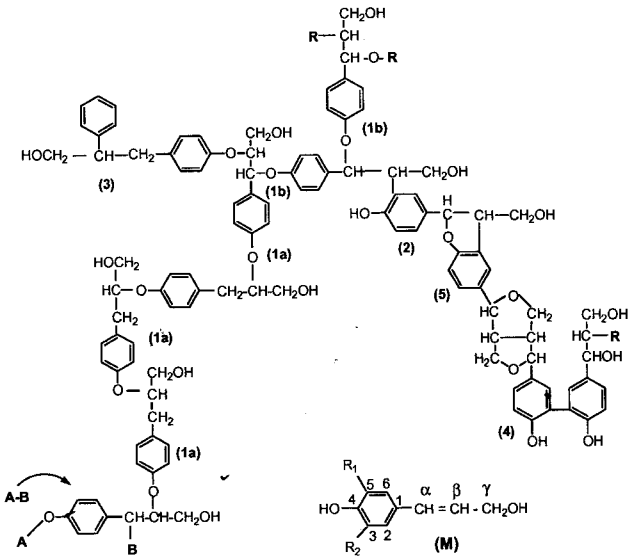


Figure 1. Generic structural scheme of a lignin oligomeric fraction associating a linear end-wise chain (1a bounds, at *left*) and a bulk condensed 'block' (2-5-4 , at *right*). The five most frequent intermonomeric linkages (**1, . . ,5**) are shown binding thirteen lignols (**M**). The common hydroxy-phenyl-propanol skeleton (H) is depicted, without accounting the possible selective distribution of the guaiacyl (G : 3-methoxy-H) or syringyl (S : 3,5-dimethoxy-H) lignols. The bulk pentamer is grafted either to the 'linear' heptalignol chain or to other wall components (**R**) by a labile α-O-4 aryl-alkyl-ether bound (**1b**). The 'end-wise' chain, linked by more stable, β-O-4 aryl-alkyl-ether linkages (**1a**), has been terminated by addition of the **AB** compound through a methylene quinone, either by ionic or by radical coupling (cf. fig. 2). At the right, the 'condensed' pentamer skeleton is characterized by C-C intermonomeric (**2, 5, 4**) linkages not so easily cleaved by the chemical depolymerization procedures, such alcaline oxidations or solvolysis. The decrease from **1** to **5** is indicative of the relative freqency of these intermonomeric linkages in the 'total' lignin, but do not account for the corresponding oligomeric H-, G- or S-fraction or lignin-type (see text).

In agreement with the Sarkanen alternative view, that end-wise G-type polymerization could occur by 'one by one radical polymerization on the surface of polymer particles', forming β-O-4 linked chains (fig 1), relatively high contents in G-etherified β-O-4 units were recently reported in Pine wood and in corresponding isolated milled wood fractions [123]. Due to the well known differences in both specificity and yield of the lignins chemical depolymerization methods [2], and in agreement with these last authors, care has to be taken with the interpretation of the experimental data in terms of 'bulk/ end-wise' macromolecular structure [11]. In this respect, the potential of solid state ^{13}C NMR for 'total' lignin characterisation [33], has to be emphasized. In the case of Wheat internode, this method, combined with ^{13}C selective G-lignol labelling, has indicated the formation of 'bulk' G-polylignol at the bottom of the internode, when more 'end-wise' structure was reported at the more mature, top, of internode [124].

On the other hand, H-lignin type has not been not studied so often, with however the exception of the noteworthy data by Fukushima [100], who demonstrated in the cas of Pine wood, that H units deposited mainly in the early stage of the cell wall formation and in middle lamella (ML) of normal and of opposite woods, while in the corresponding compression wood, the H units were observed first in the middle lamella, and then in the secondary wall, being deposited from the outer to the inner S_2 [125]. In agreement with Gibbs data [8], the yields of nitrobenzene degradation in H units were found relatively low in normal wood but significantly higher in compression wood suggesting that the corresponding H-lignin type was richer in β-O-4 linkages and thus 'end-wise' type in S_2 layer and then 'bulk' in ML. The heterogeneity of lignins was also demonstrated by two peaks of deposition for both H- and G-lignin types in Pine shoots cell walls [126], when the deposition of S-lignin traces, [8], was also confirmed, occuring late in inner S_2, mainly.

If we keep in mind the possible modulation of cinnamate-Co.A-ligases by some 'intermediate metabolites', such as ACH during the compression wood formation [77], the characterization of H-lignin and lignols as 'secondary metabolites' could appear even more 'bewildering' than stated earlier, by Van Sumere [35]. A second, at least as determinant reason originates from the so-called 'condensed' structure in H lignins, which was mainly related to the occurrence of the two unsubstituted carbons (C_3 and C_5), on the H lignol aromatic cycle (fig 1), able to form C-C covalent linkages. These so-called 'condensed' linkages are cleaved with difficulty, or not at all, by the current chemical degradative methods [2, 9, 127]. This effect is also possible at the C3 of the G lignols but not in S lignols [128], thus leading to specifically less condensed S- lignins, as emphasized later. The case of *Quercus suber* cork lignin is particularly illustrative of the diversity of these effects and of the H-

versus G-lignin variability. In relation to the complex supramolecular architecture of cork, which combines aliphatic and aromatic components, the existence of different aromatic domains has been suggested : the major part being a typical G-lignin domain [129], including another structural moiety with higher H-unit content, which was degraded by pyrolysis but was resistant to thioacidolysis [130].

In the case of the Monocotyledon grasses, similar differences between H- and G-S lignin can be suggested according to very significant differences between the H, G and S yields of nitrobenzene oxidation products, according to the reactions conditions [131]. Contrary to the G and S product yields, which remained relatively unchanged when the reaction time and temperature increased, a significant increase of the relative yield in H product was observed in the case of Wheat but not in the cases of Maïze and Sorghum. The total absolute yields were however about two time higher in Maïze and Sorghum than in Wheat indicating a more condensed total lignin in Wheat, which is probably richer in H lignols and related condensed PCA derivatives also, a question requiring experimental evidence. Keeping again in mind, the differences in chemical pattern of lignification and in anatomical distribution of vascular bundles between *Panicoideae* (Sorghum and Maïze) and *Pooideae* (Wheat) [13], the existence of specific differences concerning the H-type lignin can be suggested in Grasses, relating the occurrence of H-condensed structures and the strengthening function of sclerenchyma, mainly. In this respect, further validations are required, particularly according to the phylogeny of Grasses [45]. Most of the H-lignins fractions remain thus largely unknown; and 'much remains to be done concerning the Monocotyledon group', as stated by Gibbs long time ago [8]!

The S lignin type at the opposite attracted more interest in view of potential possibilities of genetic manipulations [12, 51, 132, 133], mainly with the aim to improve pulping performances. In this respect, even when both model [134] and industrial [135, 136] studies have correlated the fast rate of alkaline delignification and high syringyl contents in woods, attention must be paid to the facts that other factors which may be important, as for example the degree of condensation of the 'total' lignin and also the free/etherified phenolic group ratio, as shown in Eucalyptus woods [137] as in Wheat straw [138]. Whatever may be of these technical potentials, much evidence has been reported on the existence of S-lignin type fractions, in both Mono- and Di-cotyledons. The significant botanical adaptability or variability of S-type lignin has already been illustrated by empirical correlations, calculated between the S contents (expressed as % of OCH_3 or of chemical degradation yields) and for examples, # the fibres and vessel cell wall thickness [139], # the Klason lignin (Kl) content in various Eucalyptus species [10], # the acid-soluble lignin content in woods [140], # the molecular weights [141] or # the chemical depolymerization yield

(S + G non condensed lignols, expressed as % of Kl) among several Angiosperm species [13]. The same type of correlations between S, G and S+G depolymerisation yields found in recent papers in the case of transformed plants were calculated and expressed here as standard deviation coefficient (SDC). For example, in the case of F5H transformed *Arabidopsis* [54], SDC between the G and S yields and the corresponding (S + G) were found respectively of 0.92 and 0.39 with 35S as promoter, but of only 0.34 and 0.70, respectively with the other C4H promoter. Similar calculations done in the cases of F5H transformed Tobaccoes and Poplar stems [55], gave apparently similar and high SDC (0.9), in each cases. Such correlation suggest a high variability, plasticity, or adaptability, particularly of S-lignin fractions. They do not take into account local spatio-temporal variations of lignification patterns of cell wall layers and thus deserve a relative interest only.

Some analytical fractionations, in combination with model studies of DHP, provided more conclusive data. Even though the potential existence of S-lignin was clearly stated in the sixties [128, 141], the isolation of S-rich lignin fractions was reported, probably for the first time, in 1978 [59, 142] confirming the indirect physical evidences, established by UV-microspectrophotometry, that syringyl chromophoric groups of S-type lignin, were located predominantly in the fibres secondary walls and in parenchyma cells of Birch wood [10, 96]. Further evidence was later provided of both, the occurrence and the variability of S-rich lignin fractions among Angiosperms species, famillies,... In the case of Birch for example, a syringyl- β-O-4 rich lignin, mainly composed of non-phenolic S lignols (S/G # 6.0) and almost monodisperse has been reported [143]. It was even termed 'endwise S lignin fraction' and was extensively characterized for its very high molecular weight [144, 145]. In the case of *Eucalyptus globulus* wood, a S-rich lignin fraction was reported with S units included in the linear parts of the macromolecule, in agreement to a S/G ratio of 5.0, found after hydrogen iodide depolymerisation [146]. Interestingly in this case also, the H units, previously observed by other techniques, were not detected suggesting that almost all were 'condensed', as already discussed, and were incorporated into the branching points of the lignin network instead of its linear portions; a stimulating suggestion requiring further validation however. A similar trend was also reported in the cases of organosolv lignin fractions of Poplar, Maple and Birch wood mixtures, the high moleculer size fractions being richer in S units [147]. Similarly, in Eucalyptus, the well established large variability among famillies [112] has been very recently confirmed in a large number of clones [148].

In this respect, the large variability of the S/G ratio among Angiosperm species [12] is well accepted; care has however to be taken when assessing this variability of the possible effects of development stages and growth conditions on both the S contents and S/G lignol ratio, as reported in the case of fast

growing Poplar [149]. In combination to clonal differences, such effects could contribute to explain some significant and unexpected differences in S/G ratio reported in different teams, [12, 150, 151]. As previously discussed, ^{13}C NMR giving relatively lower S/G ratio could be more representative of 'total' lignin than most of the chemical degradative methods [151], whose relative data accuracy cannot be challenged however.

As high S contents have been also reported in Liliaceae [8], in Agavaceae [113] and in Abaca [152] respectively, Monocotyledon lignification patterns also require discussion, even if viewed again later (cf § 4B). First, the corresponding 'absence' of H lignols reported by some authors [8, 113], in combination with a high S content, could be significative from plant evolution point of view, as it could indicate a trend to the S-G lignin pattern found in Dicotyledons, even when the occurrence of H lignols and of PCA derivatives is unambiguously specific in others Monocotyledons, like Grasses [153]. This 'similarity' deserve more analytical validation. Furthermore, in agreement with the relatively weak differences between S, G, and even H contents reported in Monocotyledons [8], the evidences for occurrence of S-lignin type was much more difficult to detect in Grasses (Wheat and Maïze stems) than in Angiosperm woods. It was the case after chemical characterizations based on S/G degradation ratio of lignin fractions isolated sequentially form milled tissues [154, 155], yet indicating lignin heterogeneity [156]; this was more clearly stated by use of ^{13}C NMR [124], as already discussed. At the other hand, the occurrence of S-rich lignin fraction in alkali-soluble lignins isolated from both Maïze internodes and Wheat straw has been unambiguously demonstrated, by use complementary methods [138, 157, 158]. These data clearly indicate the occurence of S-rich, β-O-4 linked and end-wise lignin in Grasses also. However, at least in the case of brown midrib (bm2) mutant of Maïze, the monomeric composition of the alkali-soluble lignin fraction and of the corresponding normal line [159] were not very different. The lignification pattern of this bm2 mutant was still distinctive and characterized by (*i*) a much higher S/G ratio (ranging from 2.7 to 3.2 according to the stem level of the internode) than in the corresponding normal one (ranging from 0.9 to 1.5) and (*ii*) a significant absolute increase of the S depolymeristion yield, clearly indicative of a relative enrichment of the bm2 lignin in S-rich 'end wise' lignin fraction, still not further characterized. Enligthening the plasticity of S-type lignification also, the effects of the bm2 mutation in Maïze differed dramatically from the bm3 one [156, 160], which has been characterized by a very low absolute yiels in non-condensed S units and a low S/G ratio (0.16 to 0.43). Apparently the variations between Maïze mutants, reported in the 'reference' paper by KUC and coworkers [161], were not so clear-cut. Large variations in cell wall linked cell wall linked HCA were also reported in this paper. In this respect, the strong correlation between the yields in ferulic acid and the yield in non-condensed S

BEST OF THE WORLD IN VEGETABLE OIL

units, reported in the bm3 Maïze internodes [160], was unexpectedly not observed in bm2 mutant [159] Confirming the secondary character of both lignin and cell wall linked PCA, these differences between mutants suggest a complex mechanism of PCA pre-acylation of the S lignols, already described also in Maïze [162]. More, highlighting both the plasticity and specificity of the lignin biosynthesis pathways in Monocotyledons and the differences that exist between them and Dicotyledons at the level the phenolic secondary metabolism, the case of Maïze bm1 mutants has to be emphasized. Unlike to the changes reported in corresponding CAD Tobacco transformants and Pine mutant, a dramatic reductions in both the 'total' KL content and in the S- and G-thioacidolysis yields were reported, whithout however unchanged S/G ratio, in the bm1 line. likely affected also, at the CAD gene [163]

Finally, the case of 'bast' or 'soft fibres' [164], typically found in Flax and of Kenaf, deserve comments in relation to their specific lignification pattern, during the plant cell wall maturation, highlighting again the plasticity and specificity of S-lignification in Dicots.

In spite of their well known low lignin content [104], the anatomical changes of lignification pattern of Flax fibres strand have been studied precisely since long time [165, 166]. Starting soon after flowering and increasing with time in function of ecological conditions, lignin deposition, as shown by cytochemistry, occurs only in isolated groups of fibres when the great bulk of the strand and fibres remains unlignified. The Flax fibres, being at no time fully lignified in cross section, the lignification starts in ML, continuing in the secondary wall which appears as a multilayered structure which remains 'cellulosic' [102] and deposited in two phases not only during the 'standard' rapid phase of cell enlargement but also, later and more slowly, during the 'life of the plant'. The occurrence of 'typical' S-G Angiosperm lignin in Flax has been recently confirmed [167], the S/G ratio being much more higher in fibres (about 2.5), than in xylem (about 0.5). In this respect, the preferential association of S lignin with fibres, stated earlier [113], has been again confirmed. Due to the very low 'total' lignin content in fibres, (for this reason also difficult to asses by standard methods [2]), this 'fibre lignin' was not more characterized by these authors, who however reported very orignal differences in the spatial distribution pattern of Flax lignification. Characterizing both cell wall linked phenolics and lignin in the fibre wall layers, a discrete distribution of phenolics was reported alike 'islets' or 'patches' by cytochemical labelling, evenly distributed as 'branched clusters' and as 'oval groups' [167]. A specific distribution of of these types of phenolics was proposed, which deserve more detailled studies. The structure of Flax fibre lignin itself remains thus largely unknown, seeming still complex according to previous sodium chlorite fractionations attemps [168, 169] which separated a methoxyl rich solubilized (S-rich?) lignin fraction and a residual, alcali-soluble, lignin apparently poorer in

methoxyl In this respect the occurrence of a H-rich lignin could be suggested associated or not to other phenolics [33, 170]. Due to both to its discrete distribution and its specific reactivity, Flax fibre lignin typically 'drags' serious analytical questions (cf §5A), and typically requires specific analytical adaptations. This is a typical figure for many cell wall 'secondary compounds', whose 'standard' determination seems rather uncertain and likely provide 'nothing but an average content', as previously emphasized [13].

At the other hand, Kenaf lignin is well identified as a S-G lignin typical of Dicotyledon, in spite of its 'unusual' acylation pattern [171, 172]. Enlightening again the S-type lignification variability, Kenaf lignin holded attention by its high S/G ratio and β-O-4 linkage contents and thus by the probable occurence of a large 'end-wise' S-lignin fraction. S-rich fraction was found more specificalled abundant in the 'fibrous bark', mainly phloem, fraction of the Kenaf stem than in the 'woody core', mainly xylem [172-174]. As shown by UV microspectrophotometry of bast tissue, S lignin was predominantly observed in these 'bast fibres' only [173], thus in fibres again[113], 'looking pure syringyl lignin' [174]. Large variations in this lignification patterns and in the associated cell wall linked phenolic acids contents were however reported, and most often related to (*i*) cultivar choices, (*ii*) growth stages and (*iii*) growth conditions, illustrating the plasticity of the secondary type S lignin in Kenaf. In that cases, S/ G ratio ranged from very high values, around 6 to 9, [173, 174] to relatively low S contents even in S rich older fibres, S/ G ratio around 1 or less, and unusually high contents in H units in younger parts of plants [175]. Previous study have demonstrated, the large responsiveness of S lignification pattern in both the phloem (bark) and the xylem (core) of *Coleus sp.* treated with growth factor mixtures [176]. In the case of Kenaf, and likely of Flax and other Angiosperms, similar hormonal regulation effects on lignification types can be suggested, mediating *in vivo* ecological and developmental factors. In the case of Kenaf fibre differentiation, effect of growth factors, has been soon reported [177], gibberellic acid treatment increasing the fibre cell length during the plant growth. Furthermore in the case of Kenaf again, effects of growth factor mixtures have been already reported on the lignin structure and contents. In the case of excised young internodes of one month old Kenaf plants, the lignification of boths the 'bark' and the 'core' were dramatically changed after seven different treatments with mixtures of auxin and gibberellin or with ethrel [11, 178]. Enligthening again the specific plasticity of S lignin type, the S/G ratio changed according to treatments, from around 3 to 8 in 'bark', whitout however significant changes in the 'core' whose S/G remained around 1.5, a selective 'accumulation' of S-lignin in barks was thus indicated. Similar changes in the related S and G thioacidolysis yields were observed, ranging from around 300 to 1500 mMol.g^{-1} Kl , in the case of S in 'bark', without however large variations in the case of G in 'core' and in

'bark', which remained around 1200, 850 and 180 mMol.g^{-1} Kl, respectively. Very likely, the biosynthesis of an end-wise S-lignin fractions was thus induced by these treatments. It can be then suggested that the large variations earlier discussed in the case of field grown Kenaf and other Angiosperms can be explained by similar adaptative regulatory mechanisms, typical of plant phenolic secondary metabolim.

3 C. Factors of molecular organization variability

Lignin molecular organization arises from the *in situ* polymerization of lignols. It is currently assumed that this polymerization is initiated by an enzymatic oxidation followed by a non-enzymatic polymerization process which depend on the pre-existing cell wall organization. It is accepted that the results of *in vitro* synthesis of lignin polymer models provide critical views concerning the *in situ* lignin network organization both on the lignins types with reference to dehydrogenation polymers, (DHP), of lignols, and on lignin-polysaccharide complexes, (LCC), deposition patterns with reference to synthesis of DHP-polysaccharides complexes. Even if *in vivo* extrapolation of such data requires attention, four factors will be discussed here, (*i*) lignols oxidation potentials, (*ii*) steric course of the polymerization, (*iii*) LCC organization and (*iv*) discrete molecular oligomerization, everyone being viewed as heuristic proposal which contribute to set the variability and adaptability, secondary character, of lignins.

In agreement to textbooks reporting the importance of redox potential in phenols chemistry [179], the effect of oxidation potential during DHP synthesis was recently very clearly stated [180, 181]. It was shown that lignol polymerisation can not longer be viewed as a 'coupling reaction' between identical reactants, but as a 'cross-coupling' between different phenols, leading thus to different oligomers according to both their molecular structure and the H, G or S lignol types. Some cross-coupling being surprisingly difficult to achieve, it was suggested that the relative redox potential of lignols and oligolignols could determine some 'limits to randomness' in the lignification process in vascular plants. In this respect one can emphasize that these very interesting data were obtained according the 'standard' DHP synthesis conditions, that is after 'H_2O_2-peroxidasic initiation in water/organic solution', [59, 120]. Emphasizing the complex organisation of cell walls, changes in the redox factor effects can be suggested according to the reaction medium conditions and to the chemical environment. Solid 'state' effects could also occur such as 'diffusion and reactions at interphases' [182], and 'charge-transfer polymerisation', allowing the possibilities of either random- or alternating- or homo- propagations [183] and thus formation of different oligomers. Depending of the redox potential values [179], the rate of reaction of intermediate quinone-methide, later discussed, was found dependent of both the pH and the polarity, aqueous or organic solvent, of the medium [184], contributing to changes in, for

example, the relative *erythro/ threo* proportions of H type β-O-4 dilignols. Concerning such kinetic effects, dehydrogenative polymerisation studies of *o,o',m* - trisubstituted model phenols have unambiguously established their unusual degree of stability, previously emphasized by Sarkanen [122]. Concerning in this respect, S lignols and the related S-type lignins, the great relative stability of S radicals [185] has to be recalled with respect to (***i***) the occurrence of long lived S radicals in woods, recently confirmed [186, 187], (***ii***) their possible reaction with intermediate charge transfer complexes formation, their possible involvement in (***iii***) lignol biosynthesis during 'microsomal chanelling' of the S lignols [52] and in (***iv***) lignin depolymerisation redox reactions [188].

Concerning the stereochemistry of lignin intermonomeric linkages, the overall prevalence of the erythro form of β-O-4 syringyl ethers is well recognized on the base of both *in situ* ^{13}C enriched wood analysis [189] and of *in vitro* model synthesis [190]. At the opposite, a pronounced selectivity for *threo* conformation has been reported for the corresponding H type dimers, with an intermediate distribution in the case of the G dimers. Interesting enough, all these streochemical distributions depended in each cases of the pH, of solvatation- [191] and/or of polarity-effects [184]. Confirming again the distinct behaviour of S lignols [190], these results could be explained in term of the steric course of reactions additions between quinone-methyde intermediates and the lignol arylpropanoid radicals. With respect to the 'phenolic secondary metabolism', the very general importance of such addition reaction was earlier emphasized [192].

Taking here mainly into account the specific steric hindrance, due to the two 3,5-dimethoxy grouping, in S lignols, it seems possible to account for the stereospecificity reported in the S-lignin fractions, the formation of *erythro* β-O-4 S-ethers, through an 'head-to-tail', 'antiparallel', charge-transfert complex (CTC). This CTC would be more strongly stabilized for the S- than in G- lignol type (Fig 2). This mechanism is quite similar to the one, proposed by Wallis and Sarkanen [122] in the case of C_β-C_β resinol formation, the CTC being 'parallel' however in this case. Interestigly, a remarkable resistance to acidolysis was also reported specifically with the S type, model dimers S β-O-4 S [190]. All in all, the combination of these steric and electronic effects can be put forward as one of the main factor determining not only the structural differences between the H, G- and S-lignin fractions but especially the 'occurrence of a certain regularity in the distribution of weak and strong bonds 'suggested by Freudenberg [120]' and thus of some order in the random-lignin polymer networks. Accordingly, the existence of steric specificities of *in situ* lignins, could be explained whithout the requirement of 'defined' dirigent compounds. The possible involvement of some specific H, G and S dirigent proteins [193] can not be excluded however, and requires further evidences.

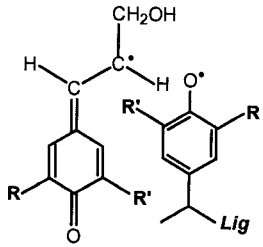


Figure 2. Hypothetical steric control of the formation of a β-O-4 linkage involving a 'head to tail' charge-transfer complex between two lignol radicals: a terminal lignin (-*Lig*) phenoxy radical (right) and a C_β radical in a methylene-quinone mesomeric form (left). Due to steric hindrance by the methoxyl groups (**R, R'**), a more stable stacked planar structure is expected in the 'more ordered' case of the two S-lignol cycles (**R = R'** = OCH_3.) as than in the corresponding 'more random' case of the two G-lignols (**R** = OCH_3 , **R'** = H), see text.

Concerning the formation of LCC and the variability of their spacial organization, most of the model studies have concerned the G-type DHP [59, 122]. The possibility that cell wall components act as parts of the cell wall 'system' and can determine their own organization through mutual interactions, 'self-organization', has been more recently emphasized [13]. For instance, significant changes in the molecular structure of DHP have been reported in function of the presence and the physical state of pectin 'gel', added in the reaction medium [194, 195]. Even when the question of the 'spatial organisation' of these DHP was not adressed, seven main factors affecting the chemical structure were identified during this study : (*i*) the Ph of the polymerization medium, (*ii*) the relative concentration of the phenolic substrates and (*iii*) of H_2O_2, (*iv*) the conditions of lignol peroxidasic- *versus* (*v*) peroxidatic-oxidation and finally, (*vi*) the type and (*vii*) the hydratation state of the carbohydrate matrix.

Extending these views in the case of a 'solid' *Acetobacter* cellulose-pectin matrix placed in a diffusion cell, significant differences of the DHP polymerization pattern were observed very recently; a more uniform distribution of the DHP on the surface of the fibrous 'polysaccharidic' network was observed in the presence of pectin [196]. Furthermore, the occurrence of non covalent association between G-oligolignols and also between lignin fractions has been confirmed and even, in part, related to their higher β-O-4 content [197]. The possibility of more pronounced secondary character of S-lignin fraction can be thus suggested, but requires further exprimental evidences. In agreement to this hypothesis, clear differences in the fine 'spacial organization' of G- and of G,S-DHP films, ordered at the air-water interface, have been

recently reported [198], demonstrating that both types of DHP were organized as inhomogeneous structure. Being both more concentrated at the air side of the interface, the G-DHP showed a steeper density profile than the corresponding GS-DHP.

Assuming that DHP could mimic lignin organization at the cell wall interfaces, significant differences can be thus expected *in vivo* in both the formation and the reactivity of the S-rich lignified, likely more ordered, cell wall layers.

Concerning finally the variability of the macromolecular structure of lignin itself, the occurrence of discrete series of oligomeric fragment was recently reported after both DHP matrix assisted desorption mass (MALDI) spectrometry [199-202] and after industrial hardwood pulping trials [203]. These data were discussed with respect to lignin biosynthesis also. As previously reviewed [11], the formation of discrete 'primary chains', during industrial pulping, is well established and theorized in terms of branched-gel degradation mechanisms [204]. Molecular size analysis of lignin fractions isolated from mixtures of Angiosperm woods (Birch, Aspen, Maple) and corresponding to a large number of cookings, have provided strong evidences of the cleavege of lignins into two sort of fraction: (*i*) a, 'very low molar size' fractions (1 to 4 D.P.) and (*ii*) a remainder 'higher molecular' size fraction', which was estimated from 5 to 11 D.P [203]. Moreover, the 'apparent molecular weight' elution curves profiles reported by the last authors clearly indicated a discrete size spectra of lignins fractions, oligolignols, whose molecular composition was not further studied. These last data looks unexpectedly like the MALDI birch lignin SG oligomers distribution [199] Furthermore, both of them qualitatively agree with the branched-gel degradation model. In agreement with these data, it seems that the rough and the fine structures of the MALDI spectra reflects the relative stability and the macromolecular distribution of the varied interlignols bonding types (Fig 1). In this respect, and considering the plasticity of the 'phenolic secondary metabolism', the suggestions of a genetic control of the 'ordered' structure of these fractions [199, 202] seems quite doubtfull. This proposal agree also, with the 'non-total' random lignin polymerization process advocated by Freudenberg and others [13, 59, 120, 122], who emphasized the possibility of some physico-chemical, self-organization, factors as a potential source of ordered structure and thus of variability in the lignin polymer networks.

4. Variability of lignin functions

As biological functions of lignins were recently reviewed [13], only mechanical strengthening will be discussed here, in an attempt to illustrate some effects of the 'secondary diversity' of the wall lignification patterns. Obviously, any of these other functions could be illustrative. Mechanical properties still provide a larger panel of variations from fully to non-lignified cell wall and/or

products, even when the artificial and reductionist identification of lignins as individual factor in the 'whole cell wall system' is again assumed.

4 A. Molecular strengthening of plant cell walls

Due to space limitation, only typical lignified secondary cell walls from Angiosperm woods and from Monocotyledon stems are taken into account here. With respect to question concerning the initiation of lignin deposition [193, 205] in non yet lignified wall layers, some distinctive features of primary cell wall deserve attention. From mechanical point of view and before any lignin deposition, the 'primary wall system', including the middle lamella and the primary wall *sensu stricto* has been characterized by (*i*) its ability to resist to strong relative constraints with relatively thin parenchyma cell wall [206, 207], (*ii*) its local and reversible capacity of response to mechanical stimulations resulting from parenchyma and related non-lignified collenchyma reactions [208]. In most of the flowering plants, these properties have been correlated to the interwined cell wall polysacharide organisation and to the cellulosic fibres interactions with hemicellulose and pectic substances, the main exception being Monocotyledons, Gramineae group, with very small pectin contents [206, 207, 209].

Recently, accounting for the local fashion of the plant cell primary growth, 'in mosaic' [210], a rapid, periodic or aperiodic, chaotic, extension behavior has been experimentally demonstrated in *Vigna radiata* hypocotyl segments [211]. It was correlated to differences in the local fixed charge density of the pectic fraction of the cell wall. Local organization and association between cellulose/xylane 'solid microfibrill rods' and pectins have been also reported in the primary Onion cell wall by SS-^{13}C NMR, suggesting a non-homogeneous 'soft gel' structure. In addition to the generation of periodic or aperiodic extension behaviour [210], these data suggest that the non-homogeneous spatial organization of more or less hydrated pectins can also contribute to the initiation of local polymerisation process of lignin and thus the discrete formation of 'islets' or 'patches' patterns, in agreement with structural changes in DHP observed in model studies [190,191], already reviewed (§: 3 A , C).

Lignin deposition can thus be viewed to start in pre-constrained cell wall layers, contributing to adapt the primary constraints, and to induce new specific secondary, growth, stresses.

Concerning growth stresses, it is currently accepted that tree trunk and grass stem maintain their 'optimal', most often vertical, position owing to stresses which provide rigidity to these plant organs, allowing them to also resist to external stresses and to reorientate themselves through reaction tissue formation. During plant growth, specific qualitative and quantitative variations in lignification pattern corresponding to both normal or adaptative changes contribute to the setting up of 'growth stresses', enlightening again the plasticity

and the secondary functional character of lignins.

Long time ago, mechanisms of growth stresses generation were discussed opposing two hypothesis of 'cellulose fibre tension' and of 'lignin matrix swelling' respectively. More recently a new unified model was proposed by the Okuyama's group. This model states that the growth stresses are generated by the interaction between (*i*) the tensile stresses due to 'cellulosic' microfibrills, in their axial directions, and (*ii*) the compressive stresses due to 'lignin' matrix, because of its deposition in the empty interfibrillar space, acting thus longitudinally in compression wood but tangentially in normal wood [212]. In the case of Conifer compression wood, these authors suggested that middle lamella lignin-compound (ML) do not contribute to compressive growth stresses. They clearly correlated however, large compressive stresses in S_2, especially in its outer S_{2O} sub-layer, with high lignin contents.

Very seldom studied in Monocotyledon, the generation of internal stresses has been also investigated in the stem, cane, of Rattan (*Calamus merrilii.*), in the same group [213]. Depending of the specific anatomy of this stem, the internal stresses in the Rattan cane was correlated with the ratio of fibre strands across the diameter and along the stem. The stress pattern was surprisingly opposite of that in trees : a high compressive stress occuring at the periphery, where sclerenchyma and lignin contents were the highest. Even if this pattern do not hold for all Monocotyledons, it shows up one time more, evidence of the specifity of lignification in Monocotyledons.

At our knowledge, the molecular organization of lignins on the inside of the cell wall layers has not been ascribed to these effects. However a very interesting basic model has been recently introduced to describe the biomechanical properties of woods, particularly the moisture dependency of the elasticity modulus in function of the cell wall components [214]. To obtain a reasonable simulation of exprimental data, the fine structure of both the cellulosic fibre bundles and the hemicellulosic matrix, were introduced as parameters in the constitutive equations. Simulated data very reasonably fitted the experimental values when the occurence of 'stable' and of 'unstable' domains was assumed in each polysaccharide component domain [215]. Pointing here variations in lignification at the outside- and inside-parts of cell wall a complementary approach can be suggested taking into account linear and bulk lignin domains in S_2 and ML, for example.

4 B. reaction wood cases and lignification variability

Reaction wood formation is currently viewed as an 'adaptative' response of plant (woody) organs to regain their usual position. This usual position is established through equilibrium between internal stresses among organ tissues during the unperturbed, normal, development. Fine and local variations of the cell wall layers organisation and lignification have been reported mainly in both

Gymnosperms and Angiosperm woods illustrating the plasticity of lignification [97].

Considering however the large systematic diversity of reaction wood morphological types, in stems and branches of Dicotyledons [216, 217], the lack of systematic studies on the fine variations in these lignification patterns has to be stated. In a similar way, expected relations with plant evolution and ecophysiological factors [139] were seldom reported. Enligthening however the possible variability of the H-lignin in relation to Gymnossperm evolution, clear structural changes of cell wall helical thickenings of compression woods have been reported to disappear from some compression wood tracheids [218]. Similarly, the frequent lack of 'gelatinous' fibres in tension woods [217], much more difficult to assess (§ 5A), may be related to Angiosperm evolution.

Focussing here on S-lignin in Angiosperms, lignification variability will be considered only (*i*) in the case of Rose flower and Liana stem, during their 'normal' development, and (*ii*) in the case of Eucalyptus and Box woods as atypical gravitropic reactions.

The case of Rose flower peduncles is particularly illustrative as the tendency to bending of Rose flower peduncle, a determinant factor of the post-harvest quality of the flower, depends on its 'rigidity' which is affected by both the cell turgor and stem tissue lignification types. Very significant differences in bending tendency have been observed between Roses cultivars. In a comparative study of two cultivars, the peduncle strength has been correlated with the lignin content and composition of both 'wood', mostly xylem, and 'bark', mostly phloem. Comparing the lower-, medium- and higher-parts of these flower peduncles, larger 'total' lignin contents were found in the xylem of the stronger peduncles. This increase was furthermore associated with a S type lignin enrichment occuring in the distal part of the peduncle mainly [219]. It was suggested that the 'normal' differentiation of non condensed S-rich lignin in xylem fibres cell walls contributed mainly to the strenghtening effect. Genetic and ecophysiological factors which likely affect this 'normal' expresssion of S-lignification secondary variability were not further studied.

In the case of gravitropic reaction in Angiosperm wood, large anatomical differences, have been most frequently recognized as occuring at the upper part of the organs, as 'tension' wood, when compared with the lower part, 'opposite' wood, identified as unchanged reference or 'normal' wood. Lower lignin content were generally reported in tension wood in combination with only weak qualitative changes in monomeric composition suggesting that the molecular structure of the 'total' lignin of tension and opposite woods were globally almost the same [139, 220, 221]. Disregarding thus the lignins local distribution, tension wood specific strengthening has been more often related to cellulose accumulation and reorganization of the gelatinous layer. Making very clear example of lignification variability, Eucalyptus reaction wood clearly display

'unusual' patterns. Extensive histochemical test have unambiguously shown that Eucalyptus gelatinous layer in reaction wood fibres undergoes lignification, the extent depending on both the gelatinous layer structural hetrogeneity and the cell location [222, 223]. Furthermore, confirming the large interspecific variability, gelatinous layer was observed in *E. camaldulensies* [224], but not in *E. tereticornis* x *E. grandis* hybrids [148]. In both cases however, significant relative decreases of 'total' lignin content were reported in reaction wood (# -40%) when compared the normal wood. Still more in the last case of hybrids, the reaction 'strenthening effects' were measured and expressed as wood relative deformations (WRD) allowing a more accurate and objective location of the wood reaction samples. In these conditions, a continuous evolution of the properties of wood according to the reaction stress intensity was observed, and was correlated with the progressive changes in both the cellulosic microfibrils orientation and in lignin content and molecular composition. As WRD increased, (*i*) total KL content decreased, (*ii*) S/G ratio in non-condensed lignol increased, (*iii*) relative yields in non-condensed G and -S lignols increased then afterwards respectively decreased and remained unchanged. In this way, even when these correlations brightly enlighten the biological variability and secondary character of S-G lignins, one had to stress that they do not display any simple individual effect of defined wood components, lignin or cellulose for example, already discussed [13].

Concerning Box reaction wood, a similar situation occur in term of changes in 'total' lignin monomeric composition. Considered to be a primitive Angiosperm because of its secondary xylem composed of tracheids and vessels, with a very low S/G ratio of about 0.5 in normal wood, *Buxus* exhibits an 'unusual' Angiosperm reaction wood , without gelatinous layer [94, 225]. It looks like compression wood of Gymnosperms [226]. In the case of differentiating normal and compression *Buxus* wood, very specific and progressive changes in the S- and the G- type lignin deposition patterns have been clearly demonstrated by UV microspectrophotometry, in the outer portion of S_2. layer mainly [227]. As in the case of Eucalyptus reaction wood, correlations between changes in lignin composition and cell wall strengthening effects were studied and expressed as WRD. In these conditions, progressive changes in lignification were again observed, indicating the formation of a more condensed reaction wood lignin slightly richer in H- and G-non condensed lignols (# +3%) but poorer in the S one (# -20%). In this case, the S/G ratio only decreased from 0.49 to 0.37. Again plasticity and variability of lignification was clearly illustrated even in this 'unusual' case. Keeping again in mind the compression wood lignification pattern in Gymnosperms, these changes in lignin likely affect wood stresses but only indirectly, through the interconnected cell wall polymer 'system'.

Finally, a similar but more complex example of plasticity of cell wall lignification is provided with the case of Lianas. During their usual stem development, Liana switch from a self-supporting phase to a supported growth phase, after contact with a support. Two main different types of wood are produced according to these growth conditions, very stiff during self-supporting phase and more flexible during supported growth, implying also changes in growth stresses and mechanical properties of the woody tissues [228]. Comparing total wood composition of two lianas *Bauhinia guianensis* and *Condylocarpum guianensis*, striking differences in mechanical properties were demonstrated between wood types. They were correlated with changes in cell wall lignification patterns. Changes in S/G ratio and S+G yield were observed leadind to the suggestion that the stiff self-supporting wood was characterized by a more linear S lignin type encrusting the polysacharidic fibres whose monomeric composition ,xylanes, changed also [229, 230]. Yields in non-condensed S lignol were about two time higher in *Bauhinia* wood samples than in corresponding *Condylocarpum* suggesting a higher relative content in S-rich lignin fibres. Different changes in cellulose microfibril orientation were also observed in these conditions, implying that the Liana stem strengthening effects are correlated to the changes in both lignin and polysaccharide cell wall organization. Nevertheless, these data also clearly confirm the large ecophysiological plasticity of S-type in the S-G Angiosperm lignin.

4 C. Gravitropic reactions in Monocotyledons

Alike knowledges on lignification of herbaceous Dicotyledons which were, and remained, 'appalingly scant' since in 1971 [10], studies on strengthening reactions in Monocotyledon stems are also appalingly lacking, with respect to their fundamental agricultural interest. As in the cases of woods, a few cases of both normal and adaptative growth reactions have been reported and can be related to specific changes in both cell wall organization and lignification patterns.

Lignified tissues, sclerenchyma and vascular bundles mainly, are specifically distributed in the typical *Gramineae* stem, 'cereal culm'. This characteristic anatomical organization of lignified tissues has been related to the resistance of these structures to fail under bending because of local buckling.

Looking Wheat culm as hollow tubular lignocellulosic composite, an original device has been first adapted to characterize culm strenght in terms of both curvature and bending moment, which was later analyzed according to a model correlating culm strength to anatomical distribution data [231]. Having first established the importance of culm nodal thickening, 'nodes', as stabilizers of these hollow structures, large differences between the mechanical properties of culm internodes were demonstrated by comparison of Wheat, *Triticum sp.* and Rye, *Secale cereale* cultivars. Even if molecular structure of lignin was not

considered, very clear correlations were shown between mechanical properties and the relative extent and location of the lignified tissues, parenchyma and sclerenchyma fibres [232]. Furthermore these differences of lignification patterns between cultivars were related to plant selection stage. Keeping again in mind, (*i*) the complex structure of sclerenchyma occuring specifically in Monocotyledons [102] and (*ii*) the possibility of fine local variations in lignification patterns of parenchyma cells and tissue, reported even in Poplar xylem for exemple [233], these data corroborate a large functional significance of the normal variations in lignification between Monocotyledons, discussed here in the case of cereal 'group' only.

Concerning the occurrence of 'adaptative', reactions in Monocotyledons, the case of Wheat nodes deserve again interest in their gravitropic responses. Identified more than one century ago, the most usual type has been characterized by an irreversible increase in the grass leaf nodal structures [234]. Structural changes of the node 'motile tissues' which produce the bending of the stem by reorientation of unchanged remaining internodes, were identified by the appearance of a swollen region, at the base of the lower portion of the node. This region was characterizedand by the differentiation of massive cellulosic 'columns' at the cell corners in the non-lignified reaction tissue :'collenchyma' [234]. In fact, contrary to these authors, this reaction tissue has to be termed at the present time 'collenchyma', and not 'sclerenchyma', in agreement to the textbooks [102, 104]. Indeed, as emphasized by these authors, the reaction tissue, located in the lower part of the node, was completely non-lignified. A strong lignification occured albeit, at the corresponding base of the sheating leave of the node, which has to be termed 'sclerenchyma'. Lignification suddenly ceased at the base of the node providing the 'non-lignified and potentialy extensible motile tissue' involved in the reorientation process. Not any other chemical data were reported on lignin structure by these authors, at our knowledge. In our group, the 'upper' and of the 'lower' part of such Wheat leaf sheats reaction nodes were studied comparing lignin content and lignin monomeric composition. At the heading stage, growing Wheat plants, were displaced into horizontal position, which induced a culm reorientation in the vertical position because of the node bending reaction. Plants were collected at maturity of the grain. About hundred plants were thus grown, in open field, during two successive years. Comparing the reaction leaf sheet fractions, no significant differences were found in (*i*) the total KL lignin content (about 16% cell wall dry matter: cwdm), in (*ii*) the S/G and H/G alcaline nitrobenzene ratio (respectively about 1.3 and 0.5) and in (*iii*) the cell wall linked PCA or FA esters contents (about 0.9 and 1.3% cwdm) [235].

Intrestingly, another Wheat node geotropic curvature, which superficially resemble to the previous one, has been described and was characterized by the need of a continuous geotropic or hormonal stimulation in order to maintain

the gravitropic response [236]. Curvature was induced by displacing growing plants to the horizontal position also, allowing the geotropic response to occur in few hours. On being returned to the initial position, the induced curvature was gradually lost. This 'reversible reaction' was also observed with *Avena* and *Hordeum* nodes [237], occuring only in the non-lignified leaf-sheat part of the node. It was correlated to the elongation of all growing leaf cells, with exception for those from the uppermost region of the node which appeared compressed.

Illustrating the specificity of the relations between the strengthening reactions and the lignification patterns in cereal culms, these data demonstrate also the unavoidable need to look plant cell walls properties as functions of the whole lignocellulosic system, the cell walls being lignified or not [11].

Not only lignins but also cell wall linked phenolic acids, (HCA : § 3B), likely contribute to these strengthening effects of cereals culms by mechanims remaining largely hypothetical. In the case of Maïze and Wheat internodes, differences and possible correlations between both cell wall linked hydroxycinnamic acid contents and vascular bundle distributions has been previously emphasized [13]. Other similar specific differences can be expected concerning also the adaptative aspects of lignification in Monocots, not only between these *Pooideae* and *Panicoideae*, but between for example other genera, familly, tribe or 'groups' whose evolutionary diversity is considerable [44]. Likely systematic differences between Monocots have been reported concerning both cell wall polysaccharide composition [43, 238] and specifically associated PCA and FA [209]. Corroborating a possible cell wall polymer cross-linking function by 'simple' (monomeric,..) HCA derivatives, which is well recognized in Graminaceous plants [34], the occurrence of diferulate (dimers,..) and of larger oligomeric FA-coupling products has to be taken into account. Strong evidences of the formation of such products were recently provided [239, 240]. Because established by *in vitro* experiments, these results deserve however *in situ* validation. In this respect, they could contribute to better explain the high alcaline solubility of Grass lignin condensed fraction [138], (cf § 3B), and may be demonstrate the validity of the 'old' Stafford's hypothesis [241], who suggested the formation of a HCA based 'acid lignin' in Grasses, resulting from the oxidative polymerization of ferulic acid derivatives mainly. Occurrence of condensed PCA derivatives can not excluded in this case according to nitrobenzene oxidation data [45,127]. Fiting the 'secondary variability' of not only the lignin networks but also the associated phenolic acid derivatives, the lignification patterns in Monocotyledons deserve much more comprehensive analysis.

5. Recurrent methodological questions

The variability of both lignin molecular structure and mechanical function of polymeric networks were reviewed with the aim to illustrate how the different

lignin types could belong, as phenolic polymers, to the familly of the secondary plant products. Recurrent difficulties have to be still kept again in mind concerning the significance of the lignin contents and monomeric composition determinations and the importance to approach plant cell walls as an self organized systems; both questions discussed here again [2].

5 A. Analytical limitations

Only two topics, (*i*) molecular composition and (*ii*) total content determinations, concerning qualitative and quantitative chemical analysis will be discussed. Histochemical analysis would have deserved similar caveat against for examples the specificity of some immunochemical probes used for qualitative *in situ* identification of the so-called 'condensed / non-condensed' lignin macromolecular structure or the quantitative assessment of lignin contents based on transitory color reactions, such as Maüle based syringyl group determination in the presence of 5-hydroxy-G lignols.

In the case of total Klason-lignin (Kl) determination [2, 6], it has been clearly demonstrated [140] and recently well confirmed [242] that S-lignin fraction is rapidly dissolved and undergoes complex condensation reactions yielding acid soluble lignin (ASL) and insoluble KL fraction containing syringyl groups. Both formation and structure of ASL are thus critical when studing the variability of S-lignin types. Furthermore, KL determination can be critical also in the case of bast fibres, such Flax (§ 4B), because both by KL fractionation trials and by selective isolation experiments, two different types of lignin have been identified and characterized [164]. A possible location of these fractions, differing in methoxyl group contents, was even suggested in the middle lamella and in primary-secondary layers respectively [243]. Systematic differences in the contents in these two KL types were also reported by this author : the low methoxyl fraction occuring mainly in 'long' bast fibre plants (Ramie, Flax and Hemp) but not so much in 'short' bast fibre (Jute, Kenaf, Sisal) [244]. Even if the past interpretation of these results deserve validation, these exprimental data corroborate the S-lignin type variability. Amazingly, these data also agree with the 'old' Fremy's views on fibrose and vasculose, already stated. They deserve thus more precise assessment even if they were criticized in the connection of the 'vasculose' location by Bolker [245].

In the case of lignin qualitative composition, which is usually characterized by variations in non-condensed S/G ratio, large and systematic differences have been reported in function of both the analytical procedures and the lignin types [10, 127]. In the case of solvolytic procedures, using for example thioglycolic acid or ethanol as reagent, differences have been related to the relative linkage stability between H, G and S lignols involved in condensed bounds (Fig 1). In this respect, the possibility of 'loss' of specific fractions of mono- and oligomeric lignin fractions during the recovery of unsoluble lignothiogycolic-lignin

was emphasized long time ago [38, 246]. Surprisingly this question is seldom considered when analyzing S-lignin content or composition. Similarly, the distinctiveness between the 'non- condensed' and 'condensed' lignin fraction, as indicated by the recovery percentages in (H + G + S) ethanolysis- or thioacidolysis- solubilized products require attention. Even if it was more often critically adressed [2, 127, 247], this question remains often neglected however. In this respect, very recent reports have indicated that thioacidolysis yield could strikingly increase, whithout however large S/G changes, according to (*i*) the type of reagent : methanethiol versus ethanethiol [248], (*ii*) the sampling procedure : drying mode [249], (*iii*) the sample chemical pretreatment [250]. Such data, which however require further experimental validations and mechanistic interpretations, could be very critical as ,taken all together, they indicate the possibility of very large contents of non-condensed monomeric units in lignins neworks. In the cases of Poplar and Spruce woods [244], about half of the total lignin would occur as linear end-wise G- and/or S- linear type.

In order to get more exact and complete views on both lignin contents and structure, the imperative necessity to combine analytical methods has to be stressed again [2]. The aim would be to specify the data gained by the degradative chemical methods by means of identifications based on physical non-destructive approaches such as isotopic labelling [251], spectroscopic procedures, SS^{13}C-NMR [33, 251, 252] or dynamic mechanical FTIR [253, 254], for example. In this respect, the recent Terashima's review [251], concerning the Ginkgo wood G-lignin is very demonstrative. According to tracer method and thioacidolysis data, the relative frequency of the β-O-4 linkage were respectively of 55 and 23 %. Likely, similar 'conflicting' data were reported when comparing the relative lignification levels of Pine $S2_L$ and ML by interference- or fluorescence-microscopy data [255]. Further comparative analytical studies are clearly required to better assess the secondary character of lignins.

5 B. Cell wall system and self-organization effects

As clearly stated by Freudenberg [120], the paradigm of lignin 'random' polymerization process, which is most currently accepted nowadays, is not exclusive of the possibility of a 'certain order' in the lignin polymeric networks [11]. Thus 'how randomness and order can combine' correspond really to one of the most central and recurrent methodological question of lignin biology. Looking the whole cell wall a system, self-organization effects may provide some advances in this respect. Considering the multiple possibilities to arrange a given set of cell wall components in metastable arrangements, self organization effects may account for the diversity of structure, properties and functions of the 'plant cell wall as a whole'. Original mechanical properties of cell wall clearly result from the interactions between associated defined compounds which,

artificially isolated, do not exhibit any of them. Such statement could be not so trivial as it first appear as it also apply to fully- or more or less- or not at all-lignified structures. This last case was recently emphasized by Attala [256] who stressed the 'inherent tendency of the cellulose molecules to self-assemble' and concluded that 'the structures of native celluloses are, at a minimum, species and tissue specific, depending on biogenesis processes'. In lignified natural and model structures, the occurrence of a similar biogenetic order may be evidenced by specific regular or repeated lignin distribution and patterns inside the different cell wall layers, such as (*i*) easily depolymerized linear 'chains', (*ii*) residual condensed bulk 'blocks', (*iii*) 'islets', 'patches' (*iv*) distincts lignin 'aggregates' in partly lignified or lignifying tissues and mainly (*v*) fine and local adaptative variations in lignification (§4B). In this respect, extending the original Yamamoto's model approach [214], the occurrence of linear-2d.- and of bulk-3d.-lignins networks in respectively S_2 and ML, can be suggested.

Furthermore, confirming the need to look cell walls as system, the two mechanisms of Gramineae stem reorientation (§:4C), involving specifically non-lignified tissue provide an a *contrario* illustration of this proposal. Bending reactions appear to occur in these cases, as a result of specific delay of the lignification of selected parts of collenchyma and likely parenchyma, a situation which could compare to the variable occurrence of 'non-lignified' gelatinous layer in Angiosperm woods but also in some Gymnosperm specific woody cells [13]. The structural role and the strengthening function of specific chemical associations and physical entanglement of cellulosic microfibrils embedded in non-lignified pectic and hemicellulosic matrix [207, 257] also corroborate this proposal. In this respect, the 'fuzzy' boundaries between primary and secondary metabolisms (§ 2A) could appear not so surprising. For example, Aspen tension wood formation which occurs with deposition of a typical non-lignified gelatinous layer [94], has been characterized by the expression of cellulose synthase in the xylem and phloem fibers of the inner, tension, side of the bend but was turned off at the opposite, normal, side suggesting that cellulose becomes the major sink in the tension tissues when lignin biosynthesis was attenuatted [258]. The whole, both primary and secondary, carbon flux was thus reoriented.

Self organization effects likely occur also during wood transformation as results of molecular interactions, not reviewed here. In the case of both partly delignified and fully lignified products, holocellulose, chemical pulps and woods, the fact that 'all polymer components contribute to mechanical properties' has been very clearly stated and confirmed in the Salmen's group [254, 259] pointing to such 'systemic' interactions again.

Furthermore, in a review on the biochemical and genetic controls and cytochemical events during the xylem differentiation, it was suggested that a system theory approach might be a powerfull tool in understanding the

physiology of xylem cell differentiation, looking cell wall as an (*i*) open, (*ii*) adaptative and (*iii*) homeostatic system [260]. As earlier emphasized (§ 2C), autocatalytic processes have to be also accounted among organizing factors.The advantages that such complex non-homogeneous structures offer into the life process has been also very critically emphasized by Ricard recently [261], who also discussed the local organization and aperiodic growth of non-lignified primary plant cell wall [210, 211]. Indicating how order can appear and combine with randomness, these data offer a cogent explanation for the emergence of discrete spatial patterns in lignifying cell wall, because they can be related to Turing's spatio-temporal organization model requiring (*i*) gradient of reactants, (ii) autocatalysed reactions and (*iii*) open system far from equilibrium conditions [85, 86]. These conditions are apparently satisfied, at the best of our knowledged in the case of plant cell wall lignification (§ 2C, 3C). Refering to the first experimental evidence of a sustained Turing's type structure in an open gel strip reactor maintained far from equilibrium [262], the discrete distribution of spots recalls clearly, but perhaps accidentally, the 'random' distribution of the lignin initiation site 'ordered' in the Flax ML for example. Even if this hypothesis agree with the current model of 'random' formation of lignin networks, this hypothetic proposal requires experimental demonstration.

In agreement with such principle of thermodynamical study of lignocellulosic products, the phenomenon of longitudinal contraction of cellulosic fibres during pulping [263] and of related entropically controled metastability [264] has to be underlined. Demonstrating the basic and practical interests to look at cellulosic stuctures as (*i*) water content dependent, (*ii*) temperature sensitive and (*iii*) non-uniform polymeric system, able of self-organized arrangement, these data lead to view the progressive evolution of the structural variability of the secondary compounds and the appearance of structures, of order and of functions as depending of a more global system [265].

6. Conclusions

In this review, the variability of both lignin structural types and their related strengthening functions were selected in order to illustrate the secondary character of these plant phenolic products. In this respect, 'lignins' calls to only a generic name for series of compounds having a high degree of structural and functional similarity. Their discrimination among primary and secondary metabolites could even look as a wager due to their systematic existence in vascular plants. Viewing lignin types in a perspective of plant evolution, more subtle 'secondary' figures were however identified in relation to (*i*) the substitution patterns of lignols, (*ii*) the relative frequency of linear and condensed oligomeric fractions, (*iii*) the specific spatio-temporal and discrete

© LES POLYMÈRES VÉGÉTAUX

lignin distribution in the 'normal' cell walls, (*iv*) the 'adaptative' responses of these distributions according various external stimulation, (*v*) the complex regulations of the multiple pathways of lignol biosynthesis and oxidasic polymerization, (*vi*) the corresponding coupling of the metabolic carbon and energetic fluxes and finally (*vii*) the combined functions in cell adhesion, water conduction and mechanical support in plant cell walls. Lignins can be classified as 'secondary products' because of this diversity and even if they were recognized not to be 'defined chemical entities', as stated long ago by Bland [112]. Furthermore with respect to the 'fascination that secondary metabolites hold as objects of scientific studies', as emphasized by Haslam [266], the negative definition ('compounds which do not function...' : cf. § 2A) has to be rejected, as every negative concept [267], puting even forward the opposite view of lignins as part of the 'highly adaptable cell wall organized system' [13, 268]. Ironically, one can be afraid when looking the 'very complex' cell wall system to face the same situation told in the teaching of Buddha [269], of the blind mens gathered about an elephant : every one describing rightly one part but not one of them being able to tell the elephant's exact form. Even more, this parable takes apparently only into account the 'matter', in a reductionist approach of molecular organization, and not 'energy' such as mechanical work, frictional constraints, related force potentials or even entropic and informational factors [13, 268] which also contribute to hold any system, such as a reoriented straw node in its geotropically right place for example. As emphasized in reference books [261, 265, 270, 271] such an integrated physico-chemical approach of life process may be fundamental. Looking cell wall as a system undergoing irreversible evolution, variational principles application could be a way to describe how the most disordered state can be reached with a minimum rate of production of this disorder or entropy. The relevance of such application to the case of plate viscoelastic bending, already derived by M. Biot, has been emphasized by Brillouin [266]. In the case of plant tissue and cell walls they would likely allow a better understanding of lignin functions and structural variations, enligthening also the fuzzy concept of phenolic secondary compounds.

Acknowledgements

I am grateful to the researchers at INRA in Reims : Brigitte Chabbert and Bernard Cathala, P. Dole, Roger Douillard, Bernard Kurek for encouraging me to write this review, for their enthusiastic and honest comments. I would also like to thank researchers from foreign Universites who came to Reims to dicuss and share results not yet published : L. Donaldson (Rotorua,Nz.), K. Fukushima (Nagoya, Jp.), J. Grill (Montpellier, Fr), L. Salmen (Stockohlm, Sw.), K. Takabe (Kyoto, Jp.), N Terashima (Nagoya, Jp.), U. Westermark (Lulea, Sw.) and who do not necessarily agree with the ideas presented here.

References

1. Fremy, E., 1859. C. R. Acad. Sci., **48**: p. 862, 868 and 1883, Chimie biologique et chimie physiologique in Encyclopedie chimique T IX, sec 2: Chimie des végétaux, p 3 - 26.
2. Monties, B., 1989, *Lignins,* in *Methods in plant biochemistry*, J.B. Harborne, Editor. Academic Press. p. 113 - 157.
3. Kratzl, K., *et al.,* 1962. TAPPI J. Vol. 45. 113.
4. Kratzl, K. 1958: *Proc. 4 th Int. Cong. Biochem* (*Trans. Plenary Sessions*). W Auerswald, vol 16 , p 102 - 140.
5. Freudenberg, K., 1968, *part II: the constitution and biosynthesis of lignin, in Constitution and biosynthesis of lignin,* K. Freudenberg and A.C. Neish, Editors. Springer: Heidelberg. p. 45 -122.
6. Lin, S.Y. and C.W. Dence, 1992, *Methods in lignin chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer.
7. Freudenberg, K. 1964. *Contribution à l'étude de la chimie et de la biogénèse de la lignine*. in *Chimie et biochimie de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses.*, Barnoud F. Edit. p 39 - 50,: EFP - CTP - Univ. Grenoble publ., Grenoble (Fr)
8. Gibbs, R.D., 1958, *The Mäule reaction, lignins, and the relationships between woody plants.*, in *The physiology of forest trees,* K.V. Thimann, Editor. Ronald Press. p. 269 - 313.
9. Sarkanen, K.V. and C.H. Ludwig, 1971, *Lignins: occurence, formation structure and reactions.* : Wiley-Interscience. 916 p.
10. Sarkanen, K.V. and H.L. Hergert, 1971, *classification and distribution, chap. 3, in Lignins: occurence, formation, structure and reactions*, K.V.S.C.H. Ludwig, Editor. Wiley-Interscience: New York. p. 43 - 95.
11. Monties, B., 1998, *Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants,* in *Biomaterials and biodegradable polymers and Macromolecules: current research and industrial applications,* Elsevier, Editor. Elsevier: Amsterdam. p. 53 - 64.
12. Baucher, M., *et al.,* 1998, *Biosynthesis and genetic engineering of lignin*. Critic. Rev. Plant Sci., **17**: p. 125 - 197.
13. Monties, B. and K. Fukushima, 2001, *Occurence, function and biosynthesis of lignins, in Bioploymers,* A. Steinbuchel, Editor. Wiley-C VH: Weinheim, Ge. p. 1 - 64.
14. Herrmann, K.M., 1995, Plant Physiol., **107**: p. 7 - 12.
15. Conn, E.E., 1981, *Preface to volume 7: secondary plant products*. The biochemistry of plant products : a comprehensive treatise. Vol. 7. New York: Academic press. 690 p.
16. Bell, E.A., 1981, *The physiological role(s) of secondary (natural) products*, in *The biochemistry of plants : secondary plant products*, E. Conn, Editor. Academic press: New York. p. 1 - 20.
17. Bourgaud, Y., *et al.,* 2001, Plant Science, 2001. **161**: p. 839 -851.
18. Gottlieb,O.R.1990, Phytochemistry, . **29**: p. 1715 - 1724.
19. Monties, B., 1998, Polymer Degradation Stability, **59**: p. 53 - 64.
20. Wiermann, R., 1981, *Secondary plant products and cell and tissues differentiation, in The biochemistry of plant products: a comprehensive treatise*, E. Conn, Editor. Academic press: New York. p. 85 - 116.

21. Hahlbrook, K., 1989, Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., **40** , 347 -369.
22. Logeman, E., *et al.,* 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**: p. 1903 -1907.
23. Henkes, S., U. Sonnewald, and R.F.M. Stitt, 2001, Plant Cell, **13**: p. 535 -551.
24. Gottlieb, O., 1989, Phytochemistry, **28**: p. 2545 - 2558.
25. Lowry, B., D. Lee, and C. Hébant, 1980, Taxon, **29**: p. 183 - 197.
26. Monties, B. and K. Fukushima, 2001, *Occurence, function and biosynthesis of lignins, in Biopolymers,* A. Steinbuchel, Editor. Wiley-VCH: Weinheim, Ge. p. 1 - 64.
27. Stafford H.A.1988, Phytochemistry, **27**: p. 1 - 6.
28. Jouin, D., M.-T. Tollier, and B. Monties, 1988, Cell. Chem. Technol., **22**: p. 231 - 243.
29. Peng, S., A. Scalbert, and B. monties,1991, Phytochemistry, **30**: p. 775 - 778.
30. Magel, E.A., *et al.*, 1995, *Heartwod formation and 'secondary' lignification,* in *Contribution to forest tree physiology*, M. Bonnet-Mazimbert, Editor. INRA: Paris, Fr. p. 35 - 56.
31. Hartley, R.D. and P.J. Harris, Biochem. 1981, Syst. Ecol., **9**: p. 189 - 203.
32. Harris, P.J. and R.D. Hartley, 1980, Biochem. Syst. Ecol., **8**: p. 153 - 160.
33. Love, G.D., *et al.*, 1994, Phytochemistry, **35**: p. 489 - 491.
34. Iiyama, K.I., T.B.-T. Lam, and B.A. Stone, 1994, Plant Physiol, **104**: p. 315 - 320.
35. Sumere, C.F.Van, 1989, *Phenols and phenolic acids,* in *Methods in plant biochemistry,* J.B. Harborne, Editor. Academic press: London. p. 29 - 73.
36. Harborne, J.B., 1989, *General procedures and measurement of total phenolics,* in *Methods in plant biochemistry,* J.B. Harborne, Editor. Acdemic press: London, UK. p. 1 - 28.
37. Nakano, J., A. Ishizu, and N. Migita, 1958, Mokuzai Gakk., **4**: p. 1 - 4.
38. Venverlo C.J.1971, Holzforschung, **25**: p. 18 - 24.
39. Monties, B. and C. Lapierre, 1981, Physiol. Veg., **19**: p. 327 - 348.
40. Morrison, T.A., *et al.,* 1998, Crop Sci., **38**: p. 455 - 460.
41. Hartley, R.D., 1972, J. Sci. Food Agric., **23**: p. 1347 - 1354.
42. Provan, G.J., L. Scobie, and A. Chesson, 1994, J. Sci. Food Agric., **64**: p. 63 - 68.
43. Henry, R.J. and P.J. Harris, 1997, Plant Molec. Biol. Rep., **15**: p. 216 - 218.
44. Kellog, E.A., 2001, Plant Physiol, **125**: p. 1198 - 1205.
45. Billa, E., E. Koukios, and B. Monties, 1998, Polymer Deg. Stability, **59**: p. 71 - 75.
46. Higuchi, T., Y. Ito, and I. Kawamura, 1967, Phytochemistry, **6**: p. 1551 - 1556.
47. Lozovaya, V.V., T.A. Gorshkova, and et. al., 1999, Phytochemistry, **50**: p. 395 - 400.
48. He, L. and N. Terashima, 1989, Mokuzai Gakk, **35**: p. 123 - 129.
49. Molgaard, P. and H. Ravn, 1988, Phytochemistry, **27**: p. 2411 - 2421.
50. Piquemal, J., C. Lapierre, and et al., 1998, Plant J., **13**: p. 71 - 83.
51. Hu, W.-J., S.A. Harding, and et al., 1999, Nature Biotechnol., **17**: p. 808 - 812.
52. Dixon, R.A., *et al.*, 2001, Phytochemistry, **57**: p. 1069 - 1084.
53. Jouanin, L., T. Goujon *et al.,* 2000, Plant Physiol., 123 : p. 1363 - 1373.
54. Meyer, K., *et al.,* 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**: p. 6619 - 6623.
55. Franke, R., *et al.,* 2000, Plant J., **22**: p. 223 - 234.
56. Fujita, M. and H. Harada, 1991; *Ultrastructure and formation of wood cell wall,* in *Wood and cellulosic chemistry,* D.N.-S. Hon and N. Shiraishi, Editors. Marcel Decker Inc.: New York. p. 1 - 57.

57. Chapple, C., *et al.,* 1992, Plant Cell, **4**: p. 1413 - 1424.
58. Wilson, J.R., 1993, *Organisation of forage plant tissues,* in *Forage cell wall structure and digestibility,* H.G. Jung, Editor. ASA-CSSA-SSSA: Madison, Wi. p. 1 - 32.
59. Higuchi, T., 1985, *Biosynthesis of lignin,* in *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, A. press, Editor. T. Higuchi: Orlando. p. 141 - 160.
60. Li, L., *et al.,* 2001, Plant Cell., **13**: p. 1567 - 1585.
61. Li, L., *et al.,* 2000, J. Biol. Chem., **275**: p. 6537 - 6545.
62. Yamauchi, K., S. Yasuda, and K. Fukushima, 2002, J. Agric. Food Chem., 50 , 3222 - 3227.
63. Ye, Z.-H., *et al.,* 1994, Plant Cell, **6**: p. 1427 - 1439.
64. Allina, S.M., *et al.*, 1998, Plant Physiol., **116**: p. 743 - 754.
65. Hu, W.-J., A. Kawaoka, *et al.,* 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**: p. 5407 - 5412.
66. Tsutsumi, Y., T. Nishada, and K. Sakai, 1994, Mokuzai Gakk., **40**: p. part III : 1348 - 1354 and previous papers.
67. Takahama, U. and T. Oniki, 1997, Plant Cell Physiol., **38**: p. 456 - 462.
68. Takahama, U., T. Oniki, and H. Shimokowa, 1996, Plant Cell Physiol., **37**: p. 499 - 504.
69. Fleuriet, A. and A. Deloire, 1982, Z. Naturforschung, **107**: p. 259 - 268.
70. Pang, A., A.-M. Catesson, and R. Goldberg, 135, J. Plant Physiol., **135**: p. 325 - 329.
71. Goldberg, R., A.-M. Catesson, and Y. Czaninski, 1983, Z. Pflanzenphysiol., **110**: p. 267 - 279.
72. Yamazaki, I., 1974, *Peroxidase,* in *Molecular mechanisms of oxygen activation*, O. Hayaishi, Editor. Academic press: New York. p. 535 - 561.
73. Elstner, E.F. and A. Heupel, 1976 Planta, **130**: p. 175 - 180.
74. Gross, G., C. Janse, and E.F. Elstner, 1977, Planta, **136**: p. 271 - 276.
75. Catesson, Y., Y. Czaninski, and B. Monties, 1978, C. R. Acd. Sc. Paris , serie D, **286**: p. 1787 - 1790.
76. McDougall, G.J., 1992, Phytochemistry, **31**: p. 3385 - 3389.
77. Zhang, X.-H. and V.L. Chiang, 1997, Plant Physiol, **113**: p. 65 - 74.
78. Takabe, K., *et al.*, 2001, J. Plant Res., **114**, 509 - 515.
79. Rubinstein, B. and D.G. Luster, 1993, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **44**: p. 131 - 155.
80. Doring, O., S. Lüthge, and M. Böttger, 1998, Prog. Bot., **59**: p. 328 - 354.
81. Pedreno, M.A., *et al.*,1996, Plant Perox. Newsl., **5**: p. 3 - 8.
82. Barcelo, A.R. and F. Pomar, 2001, Phytochemistry, **57**: p. 1105 - 1113.
83. Monties, B., 1985, *Recent advances in lignin inhomogeneity,* in *The biochemistry of plant phenolics,* C.F.V. Sumere and P.J. Lea, Editors. Clarendon press: Oxford. p. 161 - 181.
84. Bacon, E. and D.J. Morré, 2001, Plant Physiol. Biochem., **39**: p. 487 - 494.
85. Kondepudi, D. and T. Bushe, 2001, *Hàsard et réactions chimiques de non équlibre,* in *L'homme devant l'incertain,* I. Prigogine, Editor. Odile Jacob: Paris. p. 77 - 90.
86. Prigogine, I. and I. Stengers, 1979; *Les trois stades de la thermodynamique*, in *La nouvelle alliance.* Gallimard: Paris. p. 201 - 237.

87. Kondepudi, D.K., *et al.*, 1993, J. Am. Chem. Soc., **115**: p. 10211 - 10216.
88. Donaldson, L.A.,1994, Wood Sci. Technol, **28**: p. 111 - 118.
89. Yamazaki, I., K. Yokota, and R. Nakajima, 1965, Bioch. Bioph. Res. Com., **21**: p. 582 - 586.
90. Olsen, L.F. and H. Degn, 1977, Nature, **267**: p. 177 - 178.
91. Kummer, U., *et al.*, 1997, J. Am. Chem. Soc., **119**: p. 2084 - 2088.
92. Moller, A.C., A. Lunding, and L.F. Olsen, 2000, Phys. Chem. Chem. Phys., **2**: p. 3443 - 3446.
93. Srivastava, L.M., 1966, TAPPI J., **49**: p. 173 - 183.
94. Fisher, J.B. and J.W. Stevenson, 1981, Bot. Gaz., **142**: p. 82 - 95.
95. Donaldson, L.D., 1992, IAWA Bul. N.S., **13**: p. 381 - 387.
96. Saka, S. and D.A.I. Goring, 1985, *Localization of lignins in wood cell walls,* in *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, T. Higuchi, Editor. Academic press: Orlando. p. 51 - 66.
97. Donaldson, L.A., 2001, Phytochemistry, **57**: p. 859 - 873.
98. Donaldson, L.D., J. Hague, and R. Snell, 2001, Holzforschung, **55**: p. 379 - 385.
99. Singh, A.P. and L.A. Donaldson, 1999, Can. J. Bot., **77**: p. 32 - 40 and related 41 - 50.
100. Fukushima, K., 1990, *Studies on the formation and structure of ligninin tree xylem by micro autoradiography*, Dr. Thesis, *Faculty of Agriculture.* University of Nagoya: Nagoya. p. 94.
101. Fukushima, K., T. Imai, and N. Terashima, 1994, Mokuzai Gakk., **40**: p. 958 - 965.
102. Buvat, R., 1989, *Sclerenchyma : chap 8; Phloem: chap 6., in Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants.* Springer vlg.: Berlin. p. 465 - 479.
103. Walker, W.S., 1957, Proc. Iowa Acad. Sci., **64**: p. 177 - 186.
104. Esau, K., 1977, *Sclerenchyma : chap. 6; Phloem : chap 11.*, in *Anatomy of seed plants.* John Wiley: New York. p. 64 - 69.
105. Mueller, W.C. and C.H. Beckman, 1979, Can. J. Bot., **57**: p. 2776 - 2781.
106. Zhai, H.M. and Z.Z. Lee, 1989, J. Wood Chem. Tech., **9**: p. 387 - 406.
107. Lopez, S., *et al.*, 1993, Acta Bot. Neerl., **42**: p. 165 - 174.
108. Scobie, L., *et al.*, 1993, J. Sci. Food Agric., **61**: p. 217 - 225.
109. Vallet, A., *et al.*, 1996, Ann. Bot., p. 625 - 632.
110. Duchaigne, A., 1955, Ann. Sci. Nat. Bot., **16**: p. 455 - 479.
111. Gibbs, R.D., 1958, *The Maüle reaction, lignins, and the relationship between woody plants*, in *The physiology of forest trees*, K.V. Thimann, Editor. Ronald press. p. 269 - 313.
112. Bland, D.E., G. HO, and W.E. Cohen, Australian 1950, J. Chem. Res., serie A, **3**: p. 642 - 648.
113. Logan, K.J. and B.A. Thomas, 1985, New Phytol., **99**: p. 571 - 585.
114. Gross, G.G., 1980, Adv. Bot. Res., 3: p. 25 - 63.
115. Erdtmann, H.G., 1968, *Chemical prnciples in chemosystematics*, in *Rec. Adv. Phytochem.* ACC: New York. p. 13 - 59.
116. Lange, W., O. Faix, and O. Beinhoff, 1983; Holzforschung, **37**: p. 63 - 67.
117. Bailléres, H., *et al.*, 1997, Phytochemistry, **44**: p. 35 - 39.
118. Yoshinaga, A., *Cellular distribution of guaiacyl and syringyl lignins in oak wood analyzed by microscopic specrophotometry*, Dr. Thesis, *Faculty of Agriculture.* 1995, Kyoto University of Forestry: Kyoto. p. 99.

119. Yoshinaga, A., M. Fujita, and H. Saiki, 1997, Mokuzai Gakk., **43**: p. 377 - 383.
120. Freudenbrg, K. and A.C. Neish, 1968, *Constitution and biosynthesis of lignin.* Heidelberg: Springer vlg. 129.
121. Adler, E., 1977, Wood Sci. Technol., **11**: p. 169 - 218.
122. Sarkanen, K.V., 1971, *Precursors and their polymerization , chap.4,* in *Lignins: occurence, formation, structure and reactions*, K.V. Sarkanen and C.H. Ludwig, Editors. Wiley- Interscience: New York. p. 95 - 163.
123. Ikeda, T., *et al.* . 2001, in *Int. Symp Wood Pulp. Chem.* 1 , 282 - 284, Nice, Fr: CTP, Grenoble, Fr.
124. Terashima, N., R.H. Atalla, and D.L. Vanderhart, 1997, Phytochemistry, **46**: p. 863 - 870.
125. Fukushima, K. and N. Terashima, 1991, Wood Sci. Technol., **25**: p. 371 6 381.
126. Terashima, N. and K. Fukushima, 1988, Wood Sci. Technol., **22**: p. 259 - 270.
127. Brunow, G., 2001, *Methods to reveal the structure of lignin,* in *Biopolymers*, M. Hofrichter and A. Steinbüchel, Editors. Wiley- VCH: Weinheim, Ge. p. 89 - 116.
128. Freudenberg, K. and G.S. Siduh, 1961, Holzforschung, **15**: p. 33 - 39.
129. Marques, A.V., *et al.,* 1966, Holzforschung, **50**: p. 393 - 400.
130. Marques, A.V., *et al.,* 1999, Holzforschung, **53**: p. 167 - 174.
131. Billa, E., M.-T. Tollier, and B. Monties, 1996, J. Sci. Food Agric., **72**: p. 250 - 256.
132. Boudet, A.M., C. Lapierre, and J.G. Grima-Pettenati, 1995, New Phytol., **129**: p. 203 - 236.
133. Dean, J.F., 2001, *Synthesis if lignin in transgenic and mutant plants*, in *Biopolymers,* M. Hofrichter and A. Steinbüchel, Editors. Wiley- VCH: Weinheim, Ge. p. 65 - 88.
134. Kondo, R., Y. Tsutsumi, and H. Himamura, 1987, Holzforschung, **41**: p. 83 - 88.
135. Chang, H.M. and K.V. Sarkanen, 1973, TAPPI J., **56**: p. 132 - 135.
136. Rio, J.C.d., et al. 2001, *Lignin and hemicellulose analysis during manufacturing high quality Flax and Kenaf pulps.* in *11th Int Symp. pulp. Paper Chem.*, 3, p 523 - 526 , Nice, Fr: CTP, Grenoble ,Fr.
137. Garland, C.P., *et al.,* 1986, APPITA, **39**: p. 361 - 368.
138. Lapierre, C., D. Jouin, and B. Monties, 1989, Phytochemistry, **28**: p. 1401 - 1403.
139. Musha, Y. and D.A.I. Goring, 1975, Can. J. Forest Res., **5**: p. 259 - 268.
140. Musha, Y. and D.A.I. Goring, 1974, Wood Sci., **7**: p. 133 - 134.
141. Bland, D.E. and A.F. Logan, 1967, Phytochemistry, **6**: p. 1075 - 1083.
142. Yamasaki, T., K. Hata, and T. Higuchi, 1978, Holzforschung, **32**: p. 44 - 4è.
143. Fukugawa, N., G. Meshitsuka, and A. Ishizu, J. 1992, Wood Chem. Technol;, **12**: p. 91 - 109.
144. Hori, K. and G. Metshisuka, 2000, *Structural heterogeneity of hardwood lignin: chracterisation of end-wise fraction,* in *Lignin: historical,biological and material perspetive,* W. Glasser, Editor. ACS Soc.: Washington,DC. p. 172 - 185.
145. Hori, K., T. Shimizu, and G. Meshitsuka. 2001, Quantitative evaluation of endwise lignin fraction by treatment with TMSil, 3, p 541 -544, in *11th Int. Symp Wood Pulp. Chem.* 2001. Nice, Fr: CTP, Grenoble, Fr.
146. Akim, L.G., *et al.,* 2000, *Comparative analysis of the lignin of cork from Quercus suber and from wood from Eucalyptus globulus*, in *Lignin historical, biological and materials perspective,* W.G. Glasser, Editor. ACS Soc.: Washington, DC. p. 291 - 302.

147. Thring, R.W., M.N. Vanderlaan, and S.L. Griffin, 1996, J. Wood Chem. Technol., **16**: p. 139 - 154.
148. Bailléres, H., 2002, *projet Biotech*, CIRAD - Forets: Montpellier, Fr.
149. Kim, Y.-s., A. Kurahashi, and G. Metshisuka, 1996, Mokuzai Gakk., **42**: p. 782 - 788.
150. Agossin, E. *et al.,* 1990, Appl. Env. Microb., **56**: p. 65 - 74.
151. Martinez, A.T., *et al.,* 1991, Holzforschung, **45**: p. 279 - 284.
152. Suzuki, S., T.B. Tuyet, and K. Iiyama, 1997, Phytochemistry, **46**: p. 695 - 697.
153. Higuchi, T., M. Shimada, and M. Tanahashi, 1977, Wood Sci. Technol., **11**: p. 153 - 167.
154. Tollier, M.-T., *et al.,* 1986, Holzforschung, **40**: p. 75 - 79.
155. Monties, B., 1990, *Hetrogeneity of monomeric composition in gramineae lignins,* in *Dietary fibres: chemical and biological aspects*, D.A.T. Southgate, Editor. Royal Soc. Chem.: Cambridge, UK. p. 50 - 55.
156. Gaudillere, M. and B. Monties1989, *Biochemical and biosynthetic studies on lignification of Gramineae,* in *Plant cell wall polymers*, N.G. Lewis and M.G. Pace, Editors. ACS Soc.: Washington,DC. p. 182 - 192.
157. Lapierre, C., D. Jouin, and B. Monties, 1989, *Lignin characterization in wheat straw samples, as determined by chemical degradation methods*, in *Physico-chemical chracterisation of plant residues,* A. Chesson, Editor. Elsevier Applied Sci.: London. p. 118 - 130.
158. Sun, R., J. Fang, and P. Rowlands, 1998, Polymer J., **30**: p. 289 - 294.
159. Chabbert, B., M.-T. Tollier, and B. Monties, 1994 a, J. Sci. Food Agric, **64**: p. 455-460.
160. Chabbert, B., M.-T. Tollier, and B. Monties, 1994 b, J. Sci. Food Agric., **64**: p. 349 - 355.
161. Kuc', J., O.E. Nelson, and P. Flanagan, 1968, Phytochemistry, **7**: p. 1435 - 1436.
162. Ralph, J., *et al.,* 1994, J. Am. Chem. Soc., **116**: p. 9448 - 9456.
163. Halpin, C. *et al.,* 1998, Plant J., **14**: p. 545 - 553.
164. Lewin, M., 1958, TAPPI J., **41**: p. 403 - 415.
165. Anderson, D.B., 1927, Amer. J. Bot., **14**: p. 187 - 210.
166. Tiver, N.S., 1942, Austral. J. Exp. Biol. Med; Sci., **19**: p. 149 - 160.
167. Gorshkova, T.A. and e. al., 2000, Ann. Bot;, **85**: p. 477 - 486.
168. Heude, M. and V. Bossuyt, 1959, Bul. Scient. ITF, **82**: p. 89 - 102.
169. Couchman, J.F.,1967, J. Text. Inst., **46**: p. T735 - T741.
170. Henriksson, G., *et al.,* 1998, Textile Res. J., **68**: p. 942 - 947.
171. Ralph, J.,1996, J. Nat. Prod., **59**: p. 341 - 342.
172. Seca, A.M.L. and *et. al.,* 1998, J Agric Food Chem, **46**: p. 3100 - 3108.
173. Morrisson, W.H., *et al.,* 1999, Ind. Crops Prod., **10**: p. 21 - 34.
174. Lam, T.B.T. and K. Iiyama. 2000, *Structural details of Kenaf cell wall and fixation of carbon dioxide.* in *The 2000 Int. Kenaf Symp. p 81 - 90,* Hiroshima: G. Yasuura.
175. Neto, P. and *et al.,* 1996, Ind. Crops Prod., **5**: p. 189 - 196.
176. Aloni, R., M.-T. Tollier, and B. Monties, 1990, Plant Physiol., **94**: p. 1743 - 1747.
177. Stant, M.Y., 1961, Ann. Bot., **25**: p. 453 - 462.
178. Monties, B., 1993, *Variability of plant cell walls in relation to prduction of cellulosic fibres, in New crops for temperate regions*, K.R.M. Antony, Editor. Chapman and Hall: London. p. 137 - 142.

179. Musso, H., 1967, *Phenol coupling, in Oxidative coupling of phenols*, W.I. Tatlor and A.R. Battersby, Editors. Marcel Dekker: New York. p. 1 - 94.
180. Syrjäne, K. and G. Brunow, 1998, J. Chem. Soc. , Perkin Trans 1, p. 3425 - 3429.
181. Elder, T., G. Brunow, and R.C. Fort. 2001, *Cross-coupling reactions of lignin model compounds, 1 , p* 55 - 58, in *11th Int. Symp. Wood Pulping Chem.* Nice, Fr: CTP, Grenoble Fr.
182. Sainsbury, M., 1980, Tetrahedron, **36**: p. 3327 - 3359.
183. Hall, H.K. and A.B. Padias, 199à, Acc. Chem. Res., **23**: p. 3 - 9.
184. Nakatsubo, F., K. Sato, and T. Higuchi,1976, Mokuzai Gakk., **22**: p. 29 - 33.
185. Steelink, C., 1972, *Biological oxidation of lignin phenols,* in *Rec. Adv. Phytochem.*, V.C. Runeckless, Editor. p. 239 - 271.
186. Steelink, C., 1965, J. Am. Chem. Soc., **87**: p. 2056 - 2057.
187. Seino, T., *et al.* 2001, *Electron spin resonance studies of free radicals of woods.* in *10th Int. Symp. Wood Pulping Chem.* 2001, 2 , 218 -221, Yokohama, Fr: Japan TAPPI.
188. Harvey, P.J., G.F. Gillardy, and J.M. Palmer, 1989, *Importance of charge transfer reaactions in lignin biodegradation,* in *Enzyme systems for lignocellulose degradation,* M.P. Coughlan, Editor. Elsevier Applied Sci.: London. p. 111 - 119.
189. Bardet, M., *et al.,* 1998, Magn. Res. Chem., **36**: p. 597 - 600.
190. Brunow, G., K. Lundquist, and J. Sipalä, 1993, Wood Sci. Technol;, **27**: p. 281 - 286.
191. Ralph, J. and R.A. Young, J. 1983, Wood Chem. Technol., **3**: p. 161 - 181 and 183 - 194.
192. Gottlieb O.R,1972, Phytochemistry, **11**: p. 1537 - 1570.
193. Burlat, V., *et al.,* 2001, Phytochemistry, **57**: p. 883 - 897.
194. Terashima, N. *et al.,* 1995, Holzforschung, **49**: p. 521 - 527.
195. Terashima, N. Holzforschung, **50**: p. 9 - 14.
196. Touzel J.-P. *et al.,* 2003, J. Agric. Food Chem., accepted: in press.
197. Cathala, B., *et al.* 1999, *Association behaviour of lignins and lignin model compounds.* in *10th Int. Symp. Wood Pulping Chem.* 1 , p 212 - 215, Yokohama: Japan TAPPI.
198. Cathala, B., *et al.,* 2000, Langmuir, **16**: p. 10444 - 10448.
199. Metzger, J.O. *et al.,*1992, Angew Chem, **31**: p. 762 - 764.
200. Srzic, D. and *et. al.,* 1995, Rapid Com. Mass Spec., **9**: p. 245 - 249.
201. Bocchini, P. *et al.,* 1996, Rapid Com. Mass Spec., **10**: p. 1144 - 1147.
202. Angelis, F.d., *et al.,* 1999, Angew Chem. Int. Ed., **38**: p. 1283 - 1285.
203. Hergert, H.L., G.C. Goyal, and J.H. Lora, 2000, *Limiting molecular weight of lignin from organosolve pulping of hardwood,* in *Lignin: historical, biological and material perspectives,* W.G. Glasser, Editor, ACS Soc.: Washington, DC. p. 265 - 277.
204. Yan, J.F., 1982, Science, **215**: p. 1390 - 1392.
205. Donaldson, L.A., 1994, Wood Sci. Technol., **28**: p. 111 - 118.
206. Carpita, N.C. and D.M. Gibeault, 1993, Plant J, **3**: p. 1 - 30.
207. Cosgrove, D.J., 2001, Plant Physiol., **125**: p. 131 - 134.
208. Walker, W.A., 1960, Amer. J. Bot., **47**: p. 717 - 724.
209. Jarvis, M.C., W. Forsyth, and H.J. Duncan, 1988, Plant Physiol., **88**: p. 309 - 314.

210. Kellershohn, N., R. Prat, and J. Ricard, 1996 a, Choas, solitons and fractals, **7**: p. 1103 - 1117.
211. Prat, R., N. Kellershohn, and R. Ricard, 1996 b, Chaos, solitons and fractals, **7**: p. 1119 - 1125.
212. Okuyama, T. *et al.*, 1998, J. Wood Sci., **44**: p. 83 - 89 and cited papers.
213. Abasolo, W., *et al.*, 1999, IAWA J., **20**: p. 45 - 58.
214. Yamamoto, H., *et al.*, 2002, J. Biomech. Engin. (ASME), 124 , p 432 - 440.
215. Yamamoto, H., 2000, Cellulose Com. (Japan), **7**: p. 9 - 15.
216. Kucera, L.J. and W.R. Philipson, 1977, New Zeeland J. Bot., **15**: p. 649 - 654.
217. Fisher, J.B. and J.W. Stevenson, 1981, Bot. Gaz., **142**: p. 82 - 95.
218. Yoshizawa, N. and T. Idei, 1987, Wood Fiber Sci., **19**: p. 343 - 352.
219. Chabbert, B., *et al.*, 1993, Plant Physiol. Biochem, **31**: p. 241 - 247.
220. Morohoshi, N. and A. Sakakibara, 1971, Mokuzai Gakk., **17**: p. 393 - 399 and 400 - 404.
221. Lapierre, C. and B. Monties. 1981, *Etude de la lignine des bois de reaction de Peuplier. in Colloque Science et Technique du Bois*, 1 , 135 -145, Grenoble, Fr: CTP, Grenoble.
222. Scurfield, G. and A.B. Wardrop, 1963, Aust. J. Bot., **11**: p. 107 - 116.
223. Scurfield, G., 1972, Aust. J. Bot., **20**: p. 9 - 26.
224. Baba, K., *et al.*, 1996, Mokuzai Gakk., **42**: p. 795 - 798.
225. Yoshizawa, N., *et al.*, 1993, Wood Sci. Technol., **27**: p. 1 - 10.
226. Höster, H.-R. and W. Liese, 1966, Holzforschung, **20**: p. 80 - 90.
227. Yoshizawa, N., *et al.*, 1999, Holzforschung, **53**: p. 156 - 160.
228. Hoffmann, B., 2001, *Funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur Holzdifferenzierung bei tropischen Lianen.*, in *Plant biomechanic group*. Dr. Thesis, Fak. Biologie, Albert Ludwigs Univ.: Freiburg/Br., 229 p.
229. Hoffman, B., *et al.* 2000, *Fine tunning' of mechanical properties in Two tropical liana*. in *Plant Biomechanics 2000, p.* 10 -18, Freiburg-Badenweiler: Thieme pub..
230. Hoffman, B. *et al.*, 2003, Planta, accepted: in press.
231. Spatz, H.-C., C. Boomgaarten, and T. Speck, 1993, Bot. Acta, **106**: p. 254 - 264.
232. Spatz, H.-C. and T. Speck, 1994, Biomimetics, **2**: p. 149 - 175.
233. Bosshardt, H.H. and J. Stahel, 1969, Holzforsch. Holzverwert., **21**: p. 109 - 113.
234. Arslan, N. and T.A. Bennet-Clark, 1960, J. Exp. Bot., **11**: p. 1 - 12.
235. Jouin, D., M. Gaudillére, and B. Monties, 1986, (*unpublished data*). Inra internal report.
236. Bridges, I.G. and M.B. Wilkins, 1973, Planta, **112**: p. 191 - 200.
237. Dayanandan, P. and P.B. Kaufmann, 1984, Ann. Bot., **3**: p. 29 - 44.
238. Smith, B.W. and P.J. Harris, 1999, Biochem. Syst. Ecol., **27**: p. 33 - 53.
239. Fry, S., S.C. Willis, and A.E.J. Paterson, 2001, Planta, **211**: p. 679 - 692.
240. Ward, G., *et al.*, 2001, J. Biol. Chem., **276**: p. 18374 - 18741.
241. Stafford, H.A., 1964, Plant Physiol, **39**: p. 350 - 360.
242. Yashuda, S., K. Fukushima, and A. Kakehi, J. 2001, Wood Sci., **47**: p. 69 - 72.
243. Lüdtke, M., 1961, Holzforschung, **15**: p. 141 - 151.
244. Batra, S.K., 1998, *Other long vegetal fibres, in Handbook of fiber chemistry*, M. Lewin, Editor. Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 505 - 575.
245. Bolker, H.I., 1982, Holzforschung, **36**: p. 224.

246. Venverloo, C., 1969, Acta Bot. Neerl., **18**: p. 241 - 314.
247. Lapierre, C., 1993, *Application of new methods for the investigation of lignin structure,* in *Forage cellwall structure*, H.G. Jung, Editor. ASA-CSSA-SSSA: Madison, Wi. p. 133 - 166.
248. Rakass, S., Y. Leroy, and C. Rolando. 2001, *Methanethiol: a new reagent for the analysis of lignin by thioacidolysis.* in *11th Int. Symp. Wood Pulping Chem.,1 , p* 285 - 288, Nice, Fr: CTP pub., Grenoble, Fr.
249. Önnerud, H. and G. Gellerstedt. 2001, *Inhogenities in the chemical structure of spruce lignin.* in *11 th Int. Symp. Wood Pulping Chem.*, 1, p 59 -62, Nice, Fr: CTP, Grenoble.
250. Durot, N., 2002, *Destructuration des parois vegetales par le carbonate et les métaux de transition:,* in *Département de Chimie.,* Dr. Thesis, Univ. Reims Champagne Ardenne: Reims, Fr. p. 179.
251. Terashima, N., 2001, *Possible approaches for studying three dimensional structure of lignin,* in *Molecular breeding of woody plants,* N. Morohoshi, Editor., Elsevier pub.: Amsterdam. p. 257 - 262.
252. Gil, A.M., *et al.,* 1997, Int. J. Biol. Macromol., **20**: p. 293 - 305.
253. Hintertroisier, B. and L. Salmen, 1999, Cellulose, **6**: p. 251 - 263.
254. Äkerholm, M. and L. Salmen. 2001, *Intractions between wood polymers studied by dynamic FT- IR Spectroscopy.* in *11th Int. Symp Wood Pulping Chem.*, 1 , p 17 - 21, Nice, Fr: CTP, Grenoble, Fr.
255. Donaldson, L.D., *et al.,* 1999, Can. J. Bot., **77**: p. 41 - 50.
256. Attala, R.H. 2001, *The species specificty of the structure of native celluloses.* in *11th Int. Symp. Wood Pulping Chem.,* 1 , p 13 - 16, Nice, Fr: CTP, Grenoble, Fr.
257. Whitney, S.E.C., *et al.,* 1999, Plant Physiol, **121**: p. 657 - 663.
258. Wu, L., C.P. Joshi, and V. Chiang, 2000, Plant J, **22**: p. 495 - 502.
259. Olsson, A.-M. and L. Salmen, 1997, Nord Pulp Paper Res. J., **12**: p. 140 - 144.
260. Berlyn, G.P., 1979, Wood and Fiber, **11**: p. 109 - 126.
261. Ricard, J., 1999, *Biological complexity and the dynamic of life process, chap 9 and 10, p* 308 - 333 , Elsevier pub. Amsterdam.
262. Castets, V., *et al.,* 1990, Phys. Rev. Letters, **64**: p. 2953 - 2956.
263. Stockmann, V.E., 1971, TAPPI J., **54**: p. 2033 - 2037 and p. 2038 - 2041.
264. Stockmann,V.E.,1972, Biopolymers , **11**: p. 251 - 270.
265. Prigogine, I., 2001, *Le futur n'est pas donné, in L'homme devant l'incertain,* I. Prigogine, Editor. Edit. Odile Jacob: Paris. p. 13 - 30.
266. Haslam, E., 1981, *Vegetable tannins, in The biochemistry of plant products,* E. Conn, Editor. Academic press: New York. p. 527 - 556.
267. Bergson, H.,1941, *mécanisme et conceptualisme,* (chap IV) : in *L'évolution créatrice.* (7me ed.), p. 282 - 294., PUF: Paris.
268. Monties, B., 1991, Anim. Feed Sci. Technol, **32**: p. 159 - 175.
269. Bukkio dendo kyokai, 1988, *L'enseignement du Bouddha (transl.: The teaching of Buddha),* (3rd ed.), p. 148 -149, Tokyo: Toppan Print. Co. Ltd..
270. Brillouin, L., 1959, chap. *Thermodynamique et information,* in *Vie, matière et observation,* A. George, Editor. 1959, Albin Michel: Paris. p. 79 - 132.
271. Feynman, R.P., 1968, *Work and potential energy,* in T*he Feynman lectures on physics,* G. Delacote, biling. edit., chap 14 ,p. 14:1 - 14:14, Addison-Wesley Pub. cp.: London..

Note

Recent and very interesting data by Zhong and coworkers reported in Plant Cell (2002, vol 14, 165-179) deserve attention as illustrative of the botanical variability of the tissular lignification patterns and of the complex regulation of the phenolics secondary metabolism itself. In this, the mutation of a chitinase-like gene in Arabidopsis was found to affect both #1: 'ectopic' deposition of lignin in the cell walls of stem pith and of root and hypocotyl endoderm, #2: 'aberrant' shappe of cells with partial protruding lignified walls, #3: 'alteration' in the growth and development of the seedlings grown in light cycle or the total darkness. These pleiotropic effects have been correlated to both ethylene-dependent and -independent mediated inductions. It is worth noting that althought described as 'alteration', 'aberant' and 'ectopic', (that is 'occuring at places where they are not 'normally' located), these phenotypic changes express in fact the 'normal' underlaying adaptability (and thus a kind of 'secondary' plasticity) of plants according to environmental conditions, and their normal morphogenetic capacities of differentiation and of dedifferentiation, emphasized in the reference text-books (102, 104). Entirely similar comments also hold for the recent confirmation of the occurence of higher lignin contents in genetically modified Bt corn (modified to express a protein to kill pests) than the corresponding isogenic non-Bt corn lines (Saxena and Stotzky, 2001, Amer. J. Bot., 88 , 1704-1706). As intriguing as these observations and these difficulties to define normal (lignification) states and to adjust them to the primary or secondary metabolic pathway categories, the 'overly simple' current definitions of tracheids and vesel (lignified) elements was also very recently, pertinently emphasized by Carlquist and Schneider (2002, Amer. J. Bot., 89 , 185-195). It is thus tempting to suggest that the commonly expressed negative generalizations concerning the 'normal / ectopic' lignin locations or the 'primary / secondary' lignin types does not have a universal validity. This suggestion directly extend the very relevant comment emphasized by Katerine Esau, long time ago, in relation to the absence of resemblance between stems of herbaceous- and related woody-species (p 307, in ref 104). This could also well contribute to explain the endless quest of not only 'the structural model of lignin' (2, 13) but also of 'the model tree'; a last dilemna which was very properly discussed recently, by Chaffey (2002, New Phytol., 153 , 213-223). '

Biological variability of lignification and mechanical behaviour of woody plants

clic here for the next

Bernard MONTIES

***INRA**: Equipe Paroi Végétale et Matériaux Fibreux, 51686, Reims;*

***INA P-G**: Chaire de Biochimie, 78760, Thiverval-Grignon; France.*

Abstract

Both lignification "patterns" (molecular structure and macromolecular organisation) and "processes" (biosynthetic metabolism and phenotypic / genetic plasticity) were emphasized in relation to the plant biological variability. Illustrated through specific cases ranging from cell wall layers to whole plant organs of crops and trees, these four topics are accounted to recall and discuss few selected correlations reported between lignification types and some mechanical behaviour of woody plants, not only woods and trees. Few illustrative macromolecular mechanisms underlaying these patterns and processes (growth stresses, plant form adaptation,...) are discussed in the cases of rose, flax, kenaf, wheat, grasses, lianescent and trees species (*Buxus, Eucalyptus, Ficus, Phytolacca, Populus,...*). Three main metabolic sources of variability are suggested: distributed metabolic control, growth factors regulation and peroxidasic polymerisation. The need of more elaborated studies on :1: the macromolecular organisation of lignin-networks, on :2: their peroxydatic formation and reticulation within the other cell-wall components, on :3: the global metabolic basis of the phenotypic variability and on :4: the possible epigenetic heritability of some lignification traits is underlined.

1 : Introduction :

Even when the chemical diversity of technical lignins had been unambiguously and authoritatively recognized more than 25 years ago with a plural in the title of the K. Sarkanen and C. Ludwig's book: 'Lignins: ...', both the biochemical heterogeneity and the biological variability of the *in situ* lignins and their corresponding isolated lignins fractions become acknowledged only since about two decades (1). This trend was explosively accelerated, over the last decade, by number of manipulations of the expression of structural and regulatory genes involved in lignification patterns and processes. Now, a very large number of papers and extended reviews are avalaible. This review thus consider only the biological variability of both lignification -patterns (the molecular structure and the macromolecular organisation) and -processes (the lignins biosynthesis and their phenotypic / genetic plasticity) in relation to the mechanical behaviour of woody plants, not only woods and trees. These four topics account for a biochemist's view only, and thus recall and discuss selected effects of the so called 'lignins' on the mechanical properties and behaviour of lignocellulosic-woody materials and plants gravitropic reactions, at the levels of the lignified cell wall layers, of plant organs and whole plant form.The following items thus follows on:

1 : lignin fractions variability and their macromolecular organisation,
2 : variability of lignification pattern and plant mechanical behaviour,
3 : variability of lignification proces and peroxidatic origin of lignins inhomogeneity,
4 :phenotype/genotype plasticity and form adaptations of woody plants.

Due to space limitation, the list of references was however limited to books and mainly reviews, particularly those published at INRA-Reims and -Grignon laboratories, recalling thus here some cited publications as (Rc i), in addition to more recent reviews and reports.

Before discussing experimental data related to lignin biochemistry, three main recurrent methodological questions have to be briefly emphasized, as previously done (1-5) and as recently again emphasized (6,7), concerning respectively the 'total lignin' content determination, the cytochemical identification and the characterisation of lignin monomeric composition. Avoiding here any controversies, one have to first underline the importance of the selective formation of 'acid-soluble lignin fractions', nicely confirmed and specified during Klason type determinations (8): such possiblity

is seldom discussed in the case of transformed plants (Rc 1,3). Second, concerning dyes currently used for cytological detection, the contrasted specific changes of staining pattern clearly confirmed for exemple in the region of compression failure but not in the intact wood tracheids (9) which suggest that the physical state of lignins, and not only the content, affect such cytochemical identification. These data , which recall the well known metachromatic staining of lignified tissues by safranin or toluidine blue (Rc 5), can be also compared to the changes in the fluorescence spectra of pyrene adsorbed during the polymerisation on lignin model compounds (10) later discussed (§ 4), and likely related to self-organisation effects (1,2), into the lignocellulose macromolecular networks. Third, concerning the difficulties to quantify lignin composition, (currently polemized at the level of the 'significance' of the variations in the monomeric composition only!), and as unambiguously stated earlier with C. Lapierre (Rc 3-5, 11), it is sufficient to underline here again, that the combination of usual chemical methods allows exact, concordant and complementary estimations of not only "qualitative" (non-condensed / condensed molar monomeric units ratio) but also "quantitative" (relative yields / total 'global' lignin content) views of the monomeric composition of the lignin fractions (Rc 1, 4). The origin of all these difficulties seems to rests more at the level of the biological 'explanations' than of the chemical 'significance' of the data. Much less discussed, a second critical level lies in the macromolecular organization of lignins later discussed here, which can be correlated with the functional behaviour of *in situ* lignocellulosic complexes.

2 : Lignin fraction variability and their macromolecular organisation :

The concepts of 'macromolecular organisation' at the levels of both the monomeric composition, the molecular size and the shape distribution of isolated lignin fractions have been extensively studied and theoretically analysed more than 20 years ago by mainly D. Goring, H. Bolker and J. Yan (Rc 3) in the case of wood chemical delignification (pulping). An extended paradigm was even proposed by D. Goring, assuming the occurrence of 'several types of lignin networks' in wood: a proposal extending the previous 'inhomogeneity models' by F. Brauns or J.Gravitis, for examples (12). At our knowledge, such concepts have not been systematically introduced into model studies of the mechanical properties and behaviour of plant organs and cell walls. 'Lignin' is thus most frequently viewed as an 'amorphous isotropic' material. Looking now plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites (2,13) with reference to the well demonstrated data indicating strong correlations between the macromoleclar structure and the mechanical properties reported in synthetic composites polymers, a correlation between 'lignin inhomogeneity' and 'plant cell walls mechanical properties' is proposed here. Assuming as previously (3), four lignin organisation formal levels, both the spatio-temporal organisation of the polymer chains in the lignin networks and the interactive effets between them, (the *tertiary* / *quaternary* level) appear as main determining macromolecular factors. For the same reason, it seems justified to account the type and frequency of respectively the monomeric units and of the intermonomeric linkages (the *primary / secondary* level) as the corresponding 'molecular' determinants of the mechanical behaviour of the lignified cell walls.

These interdependant factors are thus discussed here assuming the Sarkanen's hypothesis that 'lignins may represent composites of bulk and end-wise polymers, respectively 'rich' and 'poor' in ' strong' ,**condensed** (**cd**.), and 'easily cleaved', **non-condensed** (**n-cd**.) intermonomeric bonds. Proposed in 1971 as a 'speculative idea' by K. Sarkanen, this end-wise / bulk model, was experimentally studied and validated at INRA (Rc 1-5).

2 .1 : monomeric units and intermonomeric linkages heterogeneity in lignin fractions.

Experimental evidences of inhomogeneity, called in preference 'heterogeneity', from monomeric unit point of view, are briefly reviewed here defining then as 'lignins': any natural polymers arising from enzyme-initiated and chemically driven polymerisation of three main phenylpropane (*p*-hydroxycinnamyl alcool) units: respectively 3,5-dimethoxylated or **syringyl (**S**)**, 3-monomethoxylated or **guaiacyl (**G**)** and non methoxylated or 4-**phenyl (**H**)** units (fig 1).

From botanical and biochemical view, lignin heterogeneity is clearly illustrated by the very broad spectrum of the relative proportion in S, G and H monomeric units recovered after progressive depolymerisation of lignin fractions. In the case of Angiosperm woods at Grignon, three lignin fractions were succesively isolated: LM: **m**illed wood- ,LE: **e**nzyme- and LR: **r**esidual- fractions from

Poplar with C. Lapierre (11), from six other Angiosperm species with M.-T. Tollier et al. (Rc 5) and were systematically characterised using four independant methods. Constantly, the LE fractions were found richer in S syringyl units (highest S/G molar ratio) and in non-condensed intermonomeric linkages (highest S + G molar yield /KL content). In the case of Monocotyledons, similar qualitative results were obtained with M. Gaudillère for Graminae (straw internode) stems lignin fractions: the differences being qualitatively and quantitatively greater in Maïze lines than Wheat (Rc 1, table 1).

Table 1: Experimental evidences of the variations in lignification pattern (heterogeneity) in vascular plants: *references cited here in 1, 2 and 3 and added unpublished data with M.-T. Tollier and D. Jouin (1986).*

Monomers recovered (µMol./g KL)	Fraction 1 (MWL ext. : LM type) ratio	yield	Fraction 1 (Enzyme ext. : LE type) ratio	yield	Refrence, [method]
Populus	1.20	1020	1.67	1240	Lapierre, 1986
Cerasus	1.37	1122	2.51	1532	
Alnus	1.40	993	1.95	1344	Tollier , Jouin 1986
Quercus	1.14	807	2.47	1388	
Acer	1.27	1160	2.45	1710	
Triticum	1.39	1080	1.14	1530	Gaudillère, 1990
Zea 'normal'	1.19	370	1.53	360	
Zea 'mutant'	0.45	290	0.44	420	[thioacidolysis]
Pinus	n.s.	51.1 %	n.s.	56.9 %	Ikeda,2001[dfrc]

In agreement to Sarkanen's views and recent pulping data (14), these results are consistent with the *in situ* occurence of two types of lignin fractions: an '*end-wise non-condensed S rich*' LE fraction and a '*bulk more condensed G rich'* LM fraction, none of them being thus representative of the Angiosperm 'total lignin'!. Strenghening this view, in the case G-lignin of Pine wood (Gymnosperm), similar figures were recently reported (15) indicating the occurence of non-condensed lignin fractions, rich in β-O-4 aryl-alkyl-ether linkages (fig 1): the recovery yields in G units being also found higher in LE type than in corresponding LM fraction.

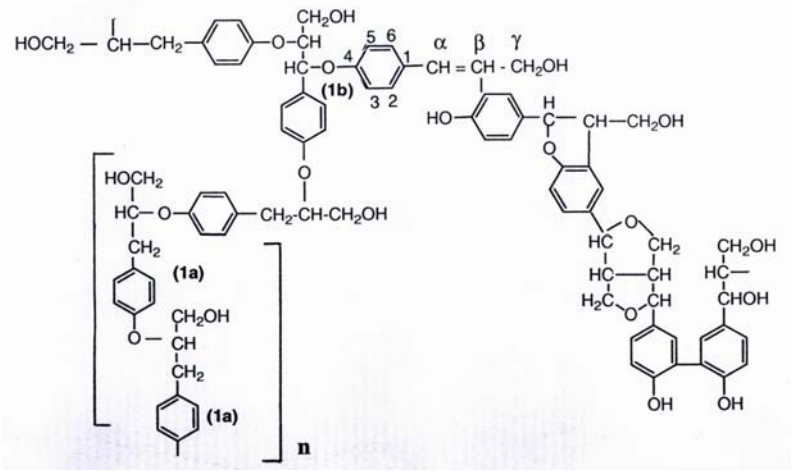


Figure 1: Cluster of a 'bulk' condensed oligomer (right) linked by a labile benzyl-ether (**1b**) linkage to a 'end-wise' alkyl-ether (**1a**) linear chain of **n** monomeric units (left); **1a**, **1b**: non condensed bound.

From biochemical view, these data provide an unambiguous, but indirect, evidence of the general occurrence of significant proportions of β-O-4 rich end-wise lignin fractions in vascular plant cell walls, in agreement furthermore with physical SS-NMRdata (Rc:1) and more directly, with some rare direct evidences, by isolation of β-O-4 rich end-wise fraction lignin (14, 16, Rc 2).

2 .2 : macromolecular inhomogeneity and organisation.

From a biopolymer organisation point of view, a 'qualitative' morphological image of lignin heterogenity can be found in the two Sarkanen's extreme schema: a rather 'linear', one dimension end-wise structure rich in non-condensed, mainly b-O-4, linkages and a rather 'bulky', three dimension branched structure rich in condensed, mainly C-C, linkages. Named, in simplified terms here, as respectively chain- and block- lignin 'clusters' (fig 1), these scheme were previously used to qualitatively discuss some possible mechanical effects of lignin networks in relation to the molecular architecture of the plant cell wall (2, 13).

At our knowledge these scheme were never systematically accounted in relation to mechanical behaviour of 'woody' products, with however the very interesting exception of the J. Gravitis's 1987 data concerning fractal self-similarity of lignin polymer models (13). Thanks however, to the recent advances in the pulping macromolecular chemistry, more quantitative parameters becomed avalaible for further lignins biomechanical studies, concerning particularly :**1**: the lignin-polysacharide physical and chemical connectivity, :**2**: the diverses evidences of ordered patterns in lignocellulosic structures, :**3**: the random 'cluster-cluster' aggregation and mainly :**4**: elaborated lignin-network degradation theoretical models related to the architecture of *in situ* lignins, nicely reviewed in 17. This is particularly the case when trying to apply the different 'gelation parameters' into lignin networks which are assumed to result ,(in agreement to the 1968 Freudenberg's views: Rc 1), from the reticulation of short and polydisperse primary oligomeric 'clusters' through random-oxidative branching (fig 1) occuring with or without formation of 'indefinite-network', depending on the functionality of these oligomers, (in agreement to the P. Flory's principles: 18). Due to the current lack of experimental values of such 'cluster' parameters, it is only possible to emphasize here qualitatively, the probable general importance in the wood mechanical behaviour of :**1**: the lignins-polysaccharides connectivity and of :**2**: the related percolation effects through lignin networks. However, clear evidences of percolation and of network cross-linking were reported, using F. Pla's wood chemical delignification data (Rc 17, 19), indicating the occurrence of two distinct cross-linked lignin fractions in cell walls layers: a '*three dimensional condensed gel'* type in the middle lamella and a '*low-cross-linked two-dimensional mono-layer'* type in the secondary wall (19). Furthermore, according to recent structural investigations on G-lignin models at the air-water interface, evidences of the formation of structured layers with different dilatational relaxation behaviour were described (20). The possibility of self-organisation effects related to lignin G /S inhomogeneity itself is thus again underlined (1, 13), in combination to the geometric mechanical constraints likely imposed by the polysccharidic microfobrils network, as previously suggested in the 'organised' secondary wall lamellae (17, 22).

3 : variability of lignification pattern and plant mechanical behaviour :

The variability of lignification patterns, extensively studied and reviewed in the case of the normal- and reaction-woods (xylem) of Gymnosperm (Rc:1,2), is thus only briefly reviewed, focussing on biochemical basis of the the 'mechanical properties' and the possibilities of quantitative modelling. Emphasizing the biological variability, qualitative correlations between lignification patterns and mechanical behaviour are thus discussed in the cases of woody Angiosperms and Monocotyledons. Choosing here plants which differ from the common, 'normal', plant lignification pattern, some 'anomalous' or 'variants' (21) types were selected in order to enlighten this natural variability, later discussed also.

In Conifers woods, very nice demonstrations of the relations between growth stresses intensity and both the lignin concentration in the LM, S1 and S2 cell wall layers and the gradual processes of lignification have been provided by respectively T. Okuyama and H.

Harada and coworkers (Rc 2). The Fujita and Harada's 1991 views (Rc 2) are particularly illustrative of 'lignin heterogeneity', when identifying two **I**- and **S**-lignification-stages and -types, in tracheid walls; the **I**nitial- lignin, deposited intercellularly would be richer in condensed type lignin when the **S**econdary- lignin, more slowly deposited finally in the S2 would be less condensed. Furthermore, in the compression tracheids, the highest lignin accumulation was found, by UV microscopy, in the outer S2 layer indicating a finer variability of the lignin content distribution, also reported later by L. Donaldson (22), more quantitatively however, between samples of mild compression wood and between cell to cells also.

Corresponding 'fine' data concerning the molecular heterogeneity of lignin fractions in these layers are lacking, at our knowledge. From mechanical point of view however, the generation of growth- and reaction-stresses has been frequently studied and correlated with variations of the 'rough' total lignin content and the cellulose microfibrill angle in the S2, not only in the Gymnosperm's hyperlignified compression woods, but also in the Angiosperm's hypolignified tension woods. Theoretical models were constructed in order to mathematically describe these correlations providing a nice way to numerically explore the possible effects of lignin inhomogeneity on the mechanical properties of the 'woody products'. Thanks to particularly to T. Okuyama's team (23, Rc 2), a 'unified hypothesis' is avalaible explaining the generation of these stresses on the double assumption that :**1**: tensile stress originate from cellulose microfibrill partial cristallisation when :**2**: compressive stress results from deposition of lignin matrix during the secondary wall lignification. Due to space limitation, one can only underline the nice qualitative fit between the calculated / experimental values for both tension and compression wood, with however a much better adjustement of the values in the case of longitudinal (ε_L) than for tangential (ε_T) surface growth stress (23, 24). According to this model, the lignin matrix substance domain appears as a kind isotropic elastomer. In order to improve this yet good fitnees, it is suggested to account for percolation and connectivity effects (§ 2) into the macromolecular lignin fractions of LM and S2, as function of not only the progressive spacio-temporal development of walls but also of moisture content (24). Gelification, hydratation effects through the two-dimensional lignin gel monolayers, along the cellulosic lamellae of the S2 at scale of few nm. could be for exemple numerically introduced using avalaible scalling parameters (13, 19). Being 'universal' (19), which means that "the values of these parameters depend only on the network topology and are not affected by the details or process at the micro(molecular)-scale", this suggestion would also solve a recurent controversial question (7), concerning the "actual importance of the lignins [monomeric units] composition" in natural *versus* transgenic plants as related to the *in situ* lignin functions (3, Rc 1).

In the case of Angiosperm tension woods, variations in lignification pattern have been also correlated to reaction- and growth-strains at the surface of stems, even when typical arcs of 'tension' cells with slightly- or non-lignified distinct-gelatinous (G) layers were specifically observed frequently but not in every species, in the tissues of the upper side of the leaning stems (Rc:1, 2). Most often positively correlated with changes in orientation of branches and stems, some 'cells with G layers' were also reported in straight stems of fast growing Angiosperms and even some time also, as isolated cells of Conifer-compression wood, illustrating the large 'natural' variability: the 'variant' character or the 'anomalies of lignification', emphasized later, § 5.

With H. Bailléres et al. in 1997 (Rc:2,3), an 'anomalous' lignification type of compression wood was thus characterized in *Buxus sempervirens* wood, a primitive Angiosperm. Occuring 'normally', in the lower side of the leaning stem, it was characterized with reference to the opposite, 'normal', upper side wood by a progressive increase of

compressive strain correlated to :1: opposed variations in **n-cd.** monomer ratio (lower S but higher G and H) and to :2: a decrease of the (S+G+H) total **n-cd.** monomer yield, yet lower in the 'normal' wood. Thus, with this highly condensed reaction lignin type, boxwod looks like a Gymnosperm variant. Furthermore, tension wood of *Eucalyptus* clones was similarly characterized in 1995, by changes in the molecular structure of lignin. Both variations in the **n-cd**. S/G molar ratio and S+G yield were studied in function of the intensity of the growth stresses even when no clear cytochemical evidence of defined G layers were found. Trends for possible formations of two G- rich and S-rich lignin fractions were however observed in function the stress intensity when also correlated to the variations of the microfibrill angle; these data require confirmation.

Less unexpected were the 1993 observations with B. Chabbert et al. (Rc 1, 2), on the resistance to bending of the Rose flower peduncle, an important post-harvest quality factor. Comparing *Rosa* cultivars genetically identified by 'straight-rigid' and 'bending-soft' peduncles, significant differences were found in the Klason, total, lignin contents :**1**: being particularly high in the 'wood', (xylem mainly), and lesser in 'bark', (mainly phloem), of the stronger cultivar and :**2**: higher in the basal part of peduncle than in the distal one. Even more interesting, lower **n-cd.** S+G yields were found in the softer cultivar, particularly in the bark, despite lignin fractions from both 'phoem' and 'xylem' showed similar S/G molar ratio. Suggesting a mechanical role of the S-rich non-condensed lignin fraction, these data also enlighten the great importance to describe the molecular structure of lignins not only with S/G ratio but more quantitatively with S+G yield (table 1), a concept apparently often neglected even in the most recent comprehensive critical reviews on lignification.

In the case of Monocotyledons, similar anomalous exemples of variant types can be cited; the generation of internal stresses in rattan, *Calamus* sp., being one of the clearer illustration (25). At the opposite of 'normal' wood, the occurrence of compressive stresses was found at the periphery of the rattan stem and was related to the lignification of a specific ring of sclerenchyma. Apparently related to a structural support function, another type of 'anomalous ' reaction fibres was comprehensively described in the leaves base of the woody monocotyledon *Xanthorea australis* (26). Furthermore, comparison of 'variant' ecotypes and mutants of crops: Maïze (table 2), brittle leaves Fescue (27) and brittle stem Rice (28), were characterised by very different lignification patterns with changes of **n-cd.** S/G and S+G associated to specific differences in both tissues anatomy: thickness of sclerenchyma bridges between the epidermis and vascualr bundles, and global chemical composition: hemicelluloses / celluloses mainly (3, 31). In this respect, the various effects of 'lignification' on the mechanical behaviour among Monocots seem particularly very important but difficult to study. This is also clearly illustrated by P. Dayanandan's implication of a 'non-lignified sclerenchyma' sheath, located at the lower part of the 'stem node', pulvinus, during the reversible gravitropic reactions of *Graminaea* stems. Contributing to such an adaptative and reversible motion, this behaviour enlighten, *a contrario,* the mechanical significance of the lignification variability and strengthen the interest to view plant cell walls as self-organized complex 'systems' (Rc 1, 2, 13).

Similar mechanical 'effects' of lignins, or lignin-like compounds, likely occurs in 'primitive' plants, such as *Equisetales* according to H. Spatz's *et al.* very nice data (Rc 2), and likely also in the 'specialized' tissues of seeds and fruits allowing 'mechanical effects' (29).

4 : variability of lignification proces and sources of lignin inhomogeneity:

Extending previous suggestions (2, 3), the possibility of a biochemical discrimination between one 'common': G-type primary metabolism and one 'specific': S-type secondary metabolism was recently discussed in relation to the concepts of the 'plant phenolic secondary metabolism' (1). In the same way, the biosynthetic pathways of "monolignols" were comprehensively reviewed in transgenic plants (6, 7), accounting for the possible formation of distinct "G- and S-G-biopolymers" through respectively "sophisticated" and "independant metabolic channeling" pathways of the monomeric units. Interestingly, but perhaps fortuitously, such chanelling' would be related to the higher oxidability of S- compared to G-units (1), the more reactive and bulky S-units being 'treated' in the more organized complexes. Metabolic diversity is thus viewed here as one main source of variability in lignification; only three systemic and complementary points, often neglected or forgotten, can be however emphasized here, as potential main sources of this variability.

A first one, can be related to the well accepted (2,6,7) high complexity of the monolignol biosynthesis network, assuming thus a possibility of a control of the corresponding metabolic fluxes depending not only on the activities of 'isolated' enzymes but resulting at first, on 'distributed' control kinetic parameters (30), based on the flux / activity ratios and tracing thus, some global interactive feed-back effects in the network as a whole 'system' (1) .

A second source can be related to the varied and well established role of plant growth factors on plant-organ-, on cell- and cell-wall layers- development determining multiple possibilities of ecophysiological changes in the lignification patterns and processes, such as induction of reaction tissues. This systemic of variability is interesting, but difficult to analyse, as based on modifications of the 'regulation of lignification processes' and not only of 'molecular patterns'. For exemple with R. Aloni et al., dramatic changes in lignins total content, in alcaline extractibility and in **n-cd.** S/G ratio and S+G yields were induced by hormonal treatments in both the bark, 'phloem', and the core, 'xylem', of the stems of Coleus and of Kenaf (31). Allowing global 'ecophysiological' modifications of plant mechanical behaviour, such 'treatments' can be compared to the naturally occuring 'genetic' differences in G-bulk and S-end-wise lignin fractions, observed in the case of Roses (§3). Furthermore, very recently, clear evidences of such types of 'genetic' variability: ectopic, epigentic or pleiotropic effects (32), have been reported. Thus, a mutation of a chitinase-like gene in *Arabidopsis* (33) affecting both the pith-cells lignification ectopic patterns, the pith- but not root- cell-walls shape and many others aspects of plant growth and development was partly related to ethylene metabolism perturbations. Much more unexpected is the case of isogenic lines of Bt-Maïze, engineered to produce a proteic toxin, in which significant increases in total lignin content were confirmed (34) in combination with pleiotropic effects on lignin distribution in the vascular bundles. Awaiting metabolic explanations, these effects of 'genes' acting on the regulation of the 'processes of lignification' were not finely studied in relation to the probable changes in the plant mechanical behaviour and to the likely related lignin- and polysacharide-reorganisations in the cell wall layers and sub-layers. Such types of 'mechanical effects' were however, sometimes, reported after manipulations of 'structural genes' affecting the patterns of lignification: the biosynthesis of monomeric units themself, as recently reviewed (7). For the same reasons, it seems untimely to try to 'explain' these last effects, even when very nice evidences of selective deposition of S/G lignin fractions in S_1 / S_2 layers were for exemple observed by A. Yoshinaga and B. Chabbert, in transformed plants (35).

The third source of variability is related to the oxidative polymerisation process of lignins. Assuming again (Rc 1, 2), both the validity of the 'random coupling model' well confirmed recently (36), and the occurence of variations in the lignin model polymers structure in function of the conditions of peroxidasic polymerisation (table 2) reported with

M.-T.Tollier and confirmed with N. Terashima (37) and B. Cathala (10, 43), the importance of the related and now apparently forgotten, peroxidatic mechanims is emphasized here.

Table 2: Experimental evidence of the effect of the oxidative polymerisation process on the strutural variability of **G**-DHP: dehydropolymer models of **G** -lignins; *references cited in 1, 2 and 3.*

Reference :	Polymerisation conditions of lignin models: product,	reaction state,	oxidation reagent,	support	Depolymerisation yield /**n-cd**. unit: (µMol./g DHP)
Tollier et al. (1991)	**G**- DHP,	sol,	H_2O_2,	no	**740**
	G- DHP,	sol,	glucose/ gluc.-oxidase,	no	**700**
Terashima et al. (1996)	**G**- DHP,	sol,	glucose/ gluc.-oxidase,	no	**810**
	G- DHP,	sol,	glucose/ gluc.-oxidase,	pectin	**1050**
Cathala et al. (1998)	**G**- DHP,	sol,	H_2O_2 : fast addition,	no	**540** (st.d.: 5 %)
	G- DHP,	sol,	H_2O_2 : slow addition,	no	**620** (st.d.: 5%)
Cathala et al. (2003)	**G**- DHP,	gel/cellulose,	H_2O_2 : slow addition,	no	**860**
	G- DHP,	gel/cellulose,	H_2O_2 : slow addition,	pectin	**1180**
Control	***wood*** ,	*(G- lignin*	*from Spruce)*		**1260**

The peroxidatic formation of H_2O_2 by peroxidases in the presence of O_2 and NADH, first described first *in vitro* (38) and later observed *in vivo* with A.-M. Catesson (39), provides a first outset of variability due to the NADH-shuttle connecting the polymerisation rate of the 'lignin-clusters', thus the lignins structure, with the changes of primary metabolism. A more subtle second outset can be found in oscillatory oxidation of NADH by peroxidases *in vitro* (40) whose potential function *in vivo* and complex dynamic were comprehensively studied (41). Seldom discussed among the factors potentially affecting lignification patterns (1), these peroxidatic factors could likely contribute to the formation of discrete and distributed lignified spatial patterns (Rc 1, 22) controlled by convective- (42), or more likely diffusive-motion in the hetrogeneous cell wall cellulosic microdomains networks, studied with B. Cathala (10, 20, 43).

5 : phenotype/genotype plasticity and adaptation of woody plants

Enligthened by the variability of both the structural patterns and the regulatory processes of lignification, more general suggestions seems then allowed in relation to the plasticity and adaptatbility of plants, "obviously characterized in the short term, by regulating their physiology and in long term, by changing their development"(44). Such large phenotypic /genotypic variations can be brightly illustrated by evidences on seasonal and enviromental effects on lignification patterns (22), by the correlated growth stress control of the negative gravitropic movement in woody plant stems (45) and by the optimizations in the geometry of the polysacharide microfibril network (46) for exemple. Similarly phenotypic and genetic differences and modifications of lignification affecting environmental fitness have been reported in perennial herbaceous plants (47). In this respect, global systemic approaches of the correlations between lignification and mechanical behaviours seems particularly difficult. The final form and lignification of plants indeed depends both on cumulative effects of endogenous programs (48), of external stimulations by light and gravity for exemple (49); only four exemples of liana, tree and crop are emphasized here.

At first, the liana's case is noteworthy for a switch from a 'self-supporting growth' phase forming a very stiff stem to a 'non self-supporting' phase, established after contact with a support with formation of a more flexible stem. Comparing the dense self-supporting-wood and the corresponding less dense lianescent-wood isolated from stems of the

neotropical liana *Condylocarpum guianense*, significant differences were found in **n-cd**. S/G and S+G monomeric units (50). With reference to the case of 'normal' xylem, a functional significance was thus suggested, assuming that the occurrence of more condensed G-richer lignin fraction in vessel walls of lianescent wood would facilitate the conductance of water. At the opposite in self-supporting stem, a less condensed S-richer lignin was found in the self-supporting stem compatible with a supporting function in the lignocellulosic fibres. Qualitative variations in lignification pattern, in microfibril angle and in rough polysaccharide composition were also observed in a second liana *Bauhunia guianensis* and were more comprehensively correlated with changes in E- and T-modulus (51). Even when limited to two liana species only, the occurrence such different types of lignification in the same plant, clearly illustrate the importance and the diversity of the adaptative aspects of lignification.

Second, recalling the formation of the reaction wood and the related function assigned to growth stresses, one could assume that such regulatory effects of growth by changes in lignification invariably occur in plants, contributing for exemple, to restaure the 'normal' vertical position of the upper part of stems. As shown in Figure 2A, this is not always the case with the behaviour of a figtree, *Ficus carica* L., 'normaly' growing from the ceiling of an antic arch, verticaly in the direction of the soil. Likely resulting from a particularly favorable combination of gravity and light stimulation, this tree was found in the archeological, and bradyseismic, site of Baia-Pozzuoli at the 'Bath of Mercury', near Napoli (Italy). Taken in April 2002, the picture clearly shows the occurrence of normal, positive, phototropic reaction of some upper branches with apparently, no dominant negative geotropic reaction of the stem 'in the direction of the soil'. At our knowledge, such extreme anomalous type of tree has not been reported. However according to F. Kjelberg, (personal communication), this behaviour could well illustrate the complex hemi-epiphytic character, soon known in others *Ficus* species.

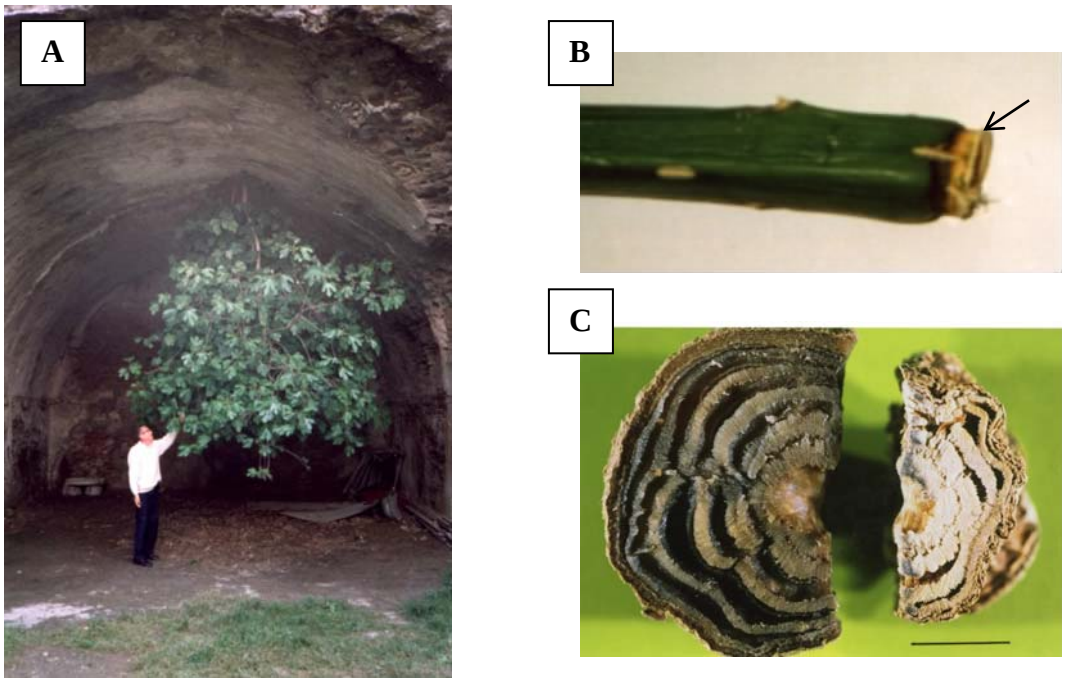


Figure 2: Adaptation and variability of woody plants: **A**:anomalous growth of *Ficus carica* L. without dominant negative geotropic stem reaction; **B**: schrinkable parenchymatized young stem end (arrow) and **C**: diametral swelling (left)- shrinkage (right) according to water content in the *Phytolacca dioica* end of stem (bar: 1cm).

Third, regarding also anomalous growth and lignification, the case of 'cambial variants' or 'anomalous secondary growth' (21) deserve interest in term mechanical behaviour and formation of wood containing concentrically alternating and irregular xylem, phloem and even conjunctive parenchyma bands. In addition to a specific lignification pattern under study by B. Chabbert at Reims, the case of the large and reversible shrinkage of the stem-wood of *Phytolacca dioica* L., apparently not reported before, seems noteworthy here . Earlier recognized for its biological plasticity and rapid growth, *Phytolacca dioica* develops, in the shoot of the year even in temperate regions (52), a wood characterized by several irregular rings of vascular bundles which are not annual rings. The schrinkage on air drying was observed at the end of one year old stems (fig 2B). Very strong in radial direction, $l/l_0 = 40$ %, it was completed after only few days and was totaly reversible by water saturation during at least 10 cycles (fig 2C). In the case of *Condylocarpum* stem slices, also characterized by a cambial variant structure of the stem vascular bundle, a normal and reversible shrinkage of only 9 % was unexpectedly observed, suggesting that the 'anomalous macroorganisation' of Phytolacca woody tissue was directly related to this effect. Due to the limited number of samples, these behaviours were not further studied.

Fourth, the typical case of 'unusual' lignification pattern of Flax fibres and of the noteworthy heritable environmentally induced changes in Flax phenotypes (53, 54) deserve comment, as unfrequently correlated. Illustrating again the 'natural' variability of plant lignification patterns (1, 3), Flax stem is noticeable by a 'normal' lignification in the woody center of the mature stem, 'xylem', which is associated at the stem periphery to an 'atypical' lignification of the phloem fibres. These fibres are characterized by thick and practically non-lignified secondary walls and by discrete intercellular 'islets' or 'patches' of lignin-like compounds (22, Rc 1). Furthermore, heritable changes of the form of Flax lines, genotrophs, have been reported according to the growth conditions (53) and were characterized by quantitative changes in :**1**: plant morphology and in :**2**: DNA content and in :**3**: patterns of the anionic peroxidases isozyme bands, which are frequently associated to lignins polymerisation (44, 54). At our knowledge, no specific study of the corresponding adaptative changes in the lignification patterns of Flax- or of the other plants were published; according however to Ch. Cullis, (personal communication), it was clear that the secondary thickening was delayed in the 'large' Flax genotroph compared to the 'small', especially at low light level. The possibility of heritable changes in the atypical lignification of Flax genotrophs is thus highly probable; it would be also interesting to correlatively study their heritability. These data also forward the importance of 'epigenetic heritability' now more currently recognized (32, 54, 55). Recent evidence of epigenitically regulated accumulation in Maïze kernel of respectively 'soluble' phenolic pigments (56) and 'cell wall linked' lignin like derivatives (57) strengthen this view. The possibility of epigenetic and inheritable adaptative variations in lignification could be of great academic and practical interest and thus requires further validation.

Prospective conclusions :

Emphasizing first of all, that 'water conduction', *cf:* parenchymatization of axial shrinkable wood in Phytolacca *versus* Liana, is at least of equal biological importance in plant stems than 'mechanical strength', four conclusive comments are proposed which all assume as an experimental evidence that lignification types and plant mechanical behaviours are strongly correlated.

 # 1 : the need to **a:** assess during mechanical experimentation, and to **b:** include during theoretical model conception, as much as possible data at the cell-wall layers level, concerning macromolecular factors and parameters describing lignin fractions such as

condensation, connectivity, percolation in-between the ligno-polysaccharide structures, looking cell-walls as a whole complex self-organized systems (1).

2 : the possibility to identify and quantify such factors, usind mild- and chemically-specific- treatments such as enzymatic, alcaline and acidolytic reagents (58), not only at the mature state but also during development stages; in this respect care has to be taken to pleiotropic effects on lignification when comparing mutant, ecotype and transgenic plants.

3 : the importance to cover as many wood feature and components as possible that vary with relation to functional behaviours and to related woody organs anatomy (21: *cf.* preface by S. Carlquist). Don't focuss on one component only, even on lignification..., remembering the Katherine Esau admonition: " the commonly expressed generalization that herbaceous stem ressembles the stem of related woody species does not have an universal validity" (29).

4 : the merit to consider the occurence of lignification variability as a result of both :**a**: the specific physiological and developmental adaptative plasticity of plants, as compared to animals (44, 47), :**b**: their capacity to manage epigentic effects in for exemple the case of phenolic metabolism (54, 57) and of heritable traits in a 'whole plant crucial context' (55, 59), :**c**: the effects of environmentally driven self-organisation of lignin and lignocellulose components, as results of physico-chemical 'fluctuations' or ' organisating noise' (1, 55, 60).

Acknowledgements :

The author is indebted to Dr Richard K. Bamber, for unpublished cytochemical data on wood compression failure, to Pr. G. Valdeyron and Dr Fin Kjelberg (CNRS, Montpellier) for comments on *Ficus* ecology, to Pr. Ch. Cullis for unpublished observations on Flax genotrophs and wish to thank gratefully Mme Suzanne Marnier-Lapostolle and Mr Marc Tessier for phenological observations and provision of samples of *Phytolacca dioica*, grown in the marvellous botanical garden 'Les Cèdres', at Saint Jean Cap-Ferrat (France).

References :

1 : Monties, B. (2003): *Botanical variability and mechanical function of lignins: two critical aspects of the plant phenolic secondary metabolism*, in *Phytochemistry of secondary compounds*, F. Imperato Editor, Research Signpost pub.:Trivandrum (India). *in press*; see also (1991) *Recent advances in structural and biosynthetic variability of lignins* at *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Melbourne, **I** , p. 113-123.

2 : Monties, B. (2001): *Occurrence, function and biosynthesis of lignins,* in *Biopolymers,* vol. 1 : *Lignin, humic substances and coal,* Höfrichter, M. and Steinbüchel, A. Editors, Wiley VCH v.: Weinheim. p.1-64.

3 : Monties, B. (1998): *Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants.* Polym. Degrad. Stab. **59** , 53 - 64.

4 : Lapierre, C. (1993): *Application of new methods for the investigation of lignin structure*, in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility,* Jung, H.-J. *et al.* Editors, ASA-CSSA-SSSA pub.: Madison, p.133-166.

5 : Monties, B. (1989): *Lignins* in *Methods in plant biochemistry,* vol 1: *Plant phenolics* , Harborne, J.B. Editor, Academic press: London, p. 113-157, see also (1995) in *Recent Progress in the analysis of dietary fibre*, (COST 92 Meeting, DG XII), Sörensen, A.-M. et al. Editors, E.C. office Official pub., Luxembourg, p. 79-86.

6 : Dixon, R. A. Chen, F. Guo, D. and Parvathi, K. (2001) *The biosynthesis of monolignols: metabolic grid or independant pathways to guaiacyl ans syringyls?* Phytochemistry, **57** , 1069-1084.

7 : Anterola, A.M. and Lewis, N.G. (2002) *Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations on lignification and vascular integrity*, Phytochemistry, **61** , 221-294.

8 : Yasuda, S. Fukushima, K. and Kakehi, A. (2001) *Formation and chemical structure of acid soluble lignin I.* J. Wood Sci., **47** , 69 - 72, see also chap. 1, 2 by Lin, S.Y. and Dence, C.W.in *Methods in lignin chemistry*, Lin, S.Y. and Dence,C.W. Editors, Springer Verlag:Berlin, p. 3-63.

9 : Bamber, R.K. (2001) *A general theorie for the origin of grow stresses in wood*, IAWA J. , **22** , 205-212.

10: Cathala, B. Touzel, J.-P. and Monties,B. (2003) *Impact of pectin on the reactivity of coniferyl alcool: model investigation in liquid and solid state*, at *Int. Symp. on Wood and Pulping Chemistry,* Madison, **1** , 249-252.
11 : Lapierre, C. (1986) *Hétérogénéité des lignines de peuplier*, Thêse Doctorat, Université d'Orsay: Paris-Sud, 305 p., see also Rolando, C. Monties, B. and Lapierre, C. (1992) *Thioacidolysis* in *Methods in lignin chemistry*, Lin, S.Y. and Dence,C.W. Editors, Springer Verlag:Berlin, p. 334-349.
12 : Monties, B (1985) *Recent advances in lignin inhomogeneity*, in *Annual proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, Van Sumere C.F. and Lea P.J. Editor,Oxford Univ.press, vol **25** , p. 161-181.
13 : Monties, B. (1991) *Plant cell walls as lignocellulosic composites: relations between lignin structure and function* . Anim. Feed Sci. Technol., **32** , 159-175, citing Gravitis et al. (translation); see also. *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, (1995) at Helsinki, **I** , p. 93-100 and (2001) at Nice, **II** , p.11-14.
14 : Hergert, H.L. Goyat, G.C. and Lora, J.H. (2000) *Limiting molecular weight of lignin from auto catalyzed organosolv pulping*, in *Lignin: historical, biological, material perspectives*, ACS Symp. Ser.n° **742** , 265-277.
15 : Ikeda, T. Chang, H.-m. and Jameel, H. (2001) *A modified DFRC method for lignin structural analysis* at *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Nice, **I** , p.281 -284.
16 : Hori, K. and Meshitsuka, G. (2000) *Structural inhomogeneity in hardwood lignin: characteristics of end-wise lignin fraction* in *Lignin: historical, biological, material perspectives*, ACS Symp. Ser., n° **742** , 172-187.
17 : Argyropoulos, D. and Menachem. S.B. (1997) *Lignin* in *Misc. Rep. Pulp Paper Research Insitut of Canada*., February, n° **350**, 35 p.
18 : Painter, P.and Coleman, M. (1994) *Fundamentals of polymer science*, Technomics pub.:Lancaster, p 90-99
19 : Leclerc, D.F. and Olson, J.A. (1992) *A percolation model of lignin degradation*, Macromolecules, **25** , 1667-1675.
20 : Cathala,B. Aguié-Begin,V. Douillard,R. and Monties,B. (2000) *Structural investigations of polymer lignin models at air -water interface by neutron reflectivity*, in *Lignin: historical, biological, material perspectives*, ACS Symp. Ser.n° **742** , 278-290; see also same aut. (1998) Polymer Degrad. Stab. **59** , p. 77-80.
21 : Carlquist, S. (1988) *Cambial variants (anomamalous secondary growth)*, in *Comparative wood anatomy*, Springer series in wood science, Timell, T.E. Edit., Springer vlg.: Berlin, p.256-266.
22 : Donaldson, L. Singh, A. Yoshinaga, A.and Takabe, K. (1999) *Lignin distribution in mild compression wood of Pinus radiata*, Can. J. Bot., **77** , 41-50; see also (2001) Phytochemistry, **57** , 859-873 and Holzforschung, **55** , 379-385
23 : Yamamoto, H. *Generation mechanism of growth stresses in wood cell walls: roles of lignin deposition and cellulose microfibril during cell wall maturation*, Wood Sci. Technol., 32 , 171-182 ; see also (2002), same auth., Wood Sci. Technol., 36 , 55-74. and ref. (9) here.
24 : Grill, J. *personnal communication*; see also Yamamoto,H. et al. (2001) *A model of anisotropic swelling and shrinking process of wood*, Wood Sci. Technol., 35 , 167-181, see also Thibault, B. at al. (2001) C. R. Acad. Sci. , **329** , 701-716.
25 : Abasolo, W. Yoshida, M. Yamamoto, H. and Okuyama, T. (1999) *Internal stress generation in rattan canes*, IAWA J. , **20** , 45-58.
26 : Boyd, J.D. and Foster, R.C. (1987) *Anomalous 'reaction' fibres in the woody monocotyledon Xanthorea australis,* Austral. J. Bot. , **35** , 193-217.
27 : Gaudillère, M. and Monties, B. (1989) *Biochemical and biosynthetic studies on lignification of Gramineae* in *Plant cell wall polymers*, Lewis, N.G. and Peace, M.G. Editors, ACS Symp. Ser. **n° 399**, p: 182-192,
28 : Monties, B. Mestres, Ch. and Baghdadi, K. (1981) *Chemical and physical properties of a brittle culm lignin rich mutant of Rice* at *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Stockolm, **V** , 40-43.
29 : Kiesselbach, T.A. and Walker, E.A. (1952) *Structure of certain specialized tissues in the kernel of corn*, Amer. J. Bot., **39** , 561-569, see also Esau, K. (1977) *Anatomy of seed plants*, Wiley pub. p.431-436.
30 : Mazat, J.-P. and Letellier, T. (1991) *La théorie du controle du metabolisme: controle et régulation*. Acta Biotheor., **39** , 207-212.
31 : Monties, B. (1993) *Variability of plant cell walls in relation to production of cellulosic fibres*, in *New crops for temperate regions*, Antony, K.R. et al. Editors, Chapman et Hall pub., p. 130-142., see also ref.1,3.
32 : Rubin, H. and C.-T. Wu, (2001) *Etymology of epigenetics*, Science,**294**, 247-248.,*cf.* related 'Forum' papers.
33 : Zhong, R. Kays, S.J. Schroeder, B.P. and Ye, Z.-H. (2002) *Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberant cell shape and overprodution of ethylene*, Plant Cell, **14** , 165-171.
34 : Saxena, D. and Stotzky, G. (2001) *Bt corn has higher lignin content than non-Bt corn*, Amer. J. Bot. , **88** , 1704-1716.
35 : Chabannes, M. Ruel, K. Yoshinaga, A. Chabbert, Jauneau, A. and Boudet, A. (2001) *In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals differential impact on the spatial pattern of lignin deposition at the cellular and subcellular levels*, Plant J. , **28** , 271-282. and *personal communication* by A.Y. and B. Ch.

36 : Hatfield, R. and Vermerris,W. (2001) *Lignin in plants:the dilemna of linkage specificity*, Plant Physiol. ,**126**, 1351-1357.
37 : Terashima, N. Atalla, R. Ralph, J. Landucci, L. Lapierre, C. and Monties, B. (1996) *New preparations of lignin models under conditions that approximate cell wall lignification*, pt: II, Holzforschung, **50** , 9-14 , see also Tollier et al. at *International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Melbourne, **II** , 35-40.
38 : Gross, G. Janse, C. and Elstner, E. (1977) *Involvement of malate, monophenols and superoxide radical in hydrogen formation by isolated cell walls from Horseradish*, Planta, **136** , 271-276.
39 : Catesson, A.M. Czaninsky, Y. and Monties,B. (1978) *Caractères histochimiques des peroxidases parietales dans les cellules en cours de lignification*, C. R. Acad. Sci. Paris, **286** , 1787-1790.
40 : Yamazaki,I. Yokota, K. and Nakajima, R. (1965) *Oscillatory oxidations of reduced pyimidine nucleotide by peroxidase*, Bioch. Bioph. Res. Comm., **21** , 582-586.
41 : Moller, A.C. Hauser, M. Olsen, L.F. (1998) *Oscillations in peroxidase-catalysed reactions and their potential function in vivo*, Biophys. Chem., **72** , 63-72, see also (1997) J. Am. Chem. Soc., **119** , 2084-2087.
42 : Kummer,U. and Baier, G. (1996) *Pattern formation in an aqueous iodine/starch system caused by evaporating cooling or an enzyme reaction*, Naturwissenschaften, **83** , 522-524.
43 : Touzel, J.P. Chabbert, B. Monties, B. Debeire, Ph. and Cathala, B. (2003) *Synthesis and characterisation of dehydrogenation polymers in Gluconoacetobacter xylinus cellulose and celluose/pectin composites*, J. Agric. Food Chem., **51** , 981-986.
44 : Walbot,V.and Cullis,Ch. (1985) *Rapid genomic changes in plants*, Ann. Rev. Plant Physiol., **36** ,367-396.
45 : Yamamoto, H. Yoshida, M. and Okuyama, T. (2002) *Growth stress controls negative gravitropism in woody plant stems*, Planta, **216** , 280-292. and ref 23, 24 .
46 : Lichtneger, H. Reiterer, A. Stanzl-Tschegg, S. and Fratzl, P. (1999) *Variation of the cellulose microfibril angles in softwoods and in hardwoods:a possible strategy of mechanical optimisation*, J. Structural Biol. , **128** , 257-269; see also Färber, J et al. (2001), J. Mater. Sci., **36** , 5087-5092.
47 : Casler, M.D. Buxton, D.R. and Vogel, K.P. (2002) *Genetic modification of lignin concentration affects fitness of perennial herbaceous plants,* Theor. Appl. Genet., **104** , 127-131.
48 : Yoshida, M. Hosoo, Y. and Okuyama, T. (2000) *Periodicity as factor in the generation of isotropic growth stress between microfibrils in the cell wall during a twenty four hour period*. Holzforschung, **54** , 469-473.
49 : Handgarter, R. P.(1997) *Gravity, ligth and plant form*, Plant Cell Envir. , **20** , 796-800.
50 : Chabert, B. Monties, B. Rowe, N. and Speck, T. (1997) *Variability of lignin composition and lignification pattern in the lianescent and self-supporting phase of the liana Condylocarpum guianense*, in *Plant Biomechanics 1997*, Jeronimidis,G. and Vincent J. Edit., Univ. Reading pub., vol **1** , p. 73-78.
51 : Hoffman, B. Chabbert, B. Monties, B. and Speck, T. (2003) *Mechanical, chemical and X-ray analysis of wood in the two tropical lianas Bauhinia guianensis and Condylocarpum guainense: variations during ontogeny*, Planta, **217** , 32-40.
52 : Martin, Ch. (1855) *De la croissance du Bel-sombra (Phytolacca dioica)*, Rev. Horticole Montpellier, ser. 4, 122-124; see Wheat, D. (1977) *Successive cambia in stem of Phytolacca dioica*, Amer. J. Bot., **64** , 1209-1217.
53 : Durrant, A. (1962) *The environmental induction of heritable change in Linum*, Heredity, **17** , 27-61.
54 : Cullis, C.A. (1986) *Phenotypic consequencesof environmetally induced changes in plant DNA*, Trends in genetics , **Dec**., 307-309.
55 : Atlan, H. (1999) *La fin du "tout genetique": vers de nouveaux paradigmes en biologie*, INRA pub.ser: *La science en question*: n° 01407, p. 38-41: (Epigenetic*);* p. 25-28: questions and p.77-78: (Organisating noise*)*.
56 : Cocciolone, S.M. Chopra,S. Mc Mullen, M.D. and Peterson T. (2001) *Tissue specific patterns of a Maïze Myb transcription factor are epigenically regulated*, Plant J. **27** , 467-478.
57 : Grotewold, E. Chamberlin,M. Snook, M. Siame, B. Butler,L. Swenson,J Maddock,S. St Clair, G. and Bowen,B. (1998) *Engineering secondary matabolism in Maïze cells by ectopic expression of transcription factors*, Plant Cell, **10** , 721-740.
58 : Vallet, Ch. Chabbert, B. Czaninsky, Y. and Monties, B. (1997) *Extractibility of structural carbohydrates and lignin deposition in maturing Alfalfa internodes*, Int. J. Biol. Macromol., **21** , 201-206.
59 : Speybroek, van, L. (2000) *The organism: a crucial genomic context in molecular epigentics?* Theory Biosci. , **119** , 187-208.
60 : Monties, B. (1989) *Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organisation of lignin networks*, Ann. Sci. Forest. , **46 suppl**., 848s-855s.

Note added during edition: In agreement with the Bamber's observations discussed here in §1, a confirmation that mechanical dislocation of wood could change the physical state and thus the *in situ* reactivity of lignin can be also found in the very interesting, related variations in the *kappa* number and brightness of the corresponding pulps, reported during this conference by N. Terziev, G. Daniel and A. Marklund (this volume, p xxx-xxx).

European Society for Wood Mechanics

STFI-PACKFORSK

Proceedings of the

Second International Conference of the European Society for Wood Mechanics

May 25th – 28th, 2003, Stockholm, Sweden

Lennart Salmén
Editor

Published by

STFI-Packforsk AB
Box 5604,
SE-114 86 Stockholm, Sweden
www.stfi-packforsk.se

© 2004 STFI-Packforsk AB

ISBN 91-86018-10-8

Cover picture shows the cross section of the fiber structure of a spruce wood sample after 50% compression

©STFI-Packforsk AB (F. De Magistris, J. Hornatowska, L. Salmén)

Contents

1. Origin of variability and heterogeneity

Biological variability of lignification and mechanical behaviour of woody plants
B. Monties 3

Mechanical properties of timber from wind damaged Norway spruce
P. Hoffmeyer 15

Role of the gelatinous layer (G-layer) on the physical properties of tension wood xylem
H. Yamamoto, T. Okuyama, J. Gril, K. Abe, Y. Arakawa 21

Micro-structural diversity of Lignin in wood cell walls revealed by immuno-electron microscopy
K. Ruel, T. Imai, J-P. Joseleau 27

Effects of heat treatment on the hygroscopicity of wood
E. Obataya, T, Higashihara, J. Gril 33

Analysing the hygro-thermo-mechanical behaviour of round wood.
P. Berard, O. Dumonceaud, B. Thibaut 39

Variation and changes in cell wall structure, as reflected in phase transformations of wood cell wall water
P. Tynjälä, P.P. Kärenlampi, P. Ström 45

Determination of microfibril angle in compression wood by means of X-Ray diffraction technique
M. Fioravanti, S.Federici 51

Heat and moisture transfer in laminated wooden beams
S. Srpčič, J. Srpčič, M. Gams, G. Turk 57

The possible relationship between dislocations and mechanical properties of different spruce fibres: a single fibre study
P. Ander, I. Burgert, K. Frühmann 63

2. Time depending behaviour

Mechanical properties of wood in unstable states caused by changes in temperature and/or swelling
Y. Ishimaru 69

Modelling transient viscoelasticity of green wood
S. Bardet, J. Gril 79

Viscoelastic creep prediction from stress-grading data
D. Hunt, A. Matar 85

The reliability of timber columns -Computer simulations regarding long-time effects-
K. Rautenstrauch, R. Hartnack, P. Becker 91

Progress in the modelling of reversible and irreversible mechano-sorptive creep of softwood
A. Matar, D. Hunt 97

The viscoelastic properties of wood in unstable states caused by changes in moisture content – The comparison between creep behaviors in the changing process of moisture and that just after changing moisture –
C. Takahashi, Y. Ishimaru, I. Iida, Y. Furuta 103

Effect of test piece size on creep behaviour of wood based panels
M. Fan, P. Bonfield 109

Duration of load effects in straight and notched LVL beams under varying ambient conditions: Interpretation by a damage approach
M. Chaplain, G. Valentin 115

Mechanical behaviour of low density fibres mats
J-M. Haeffelin, P. Castéra, C. Delisée 121

Restraining forces preventing twist in the in-service condition in timber studs
M. Bäckström, M. Johansson, R. Kliger 127

Modelling of creep behaviour of wood in variable climate conditions
H. Randriambololona, F. Dubois, C. Petit 133

Numerical analyses of timber structures under variable humidity
E. Bou Saïd, J. F. Jullien 139

Monitoring of glulam structures by theodolite intersection
W. F. Price 145

3. Micromechanics

Micromechanics of wood - structure-function relationships at the tissue and fiber level
I. Burgert, K. Frühmann 153

Simplified three-dimensional analysis of micro- and macro-structural behaviour based on two-dimensional finite element models
H. Petersson, O. Dahlblom, S. Ormarsson 163

Finite element simulation of the transverse compressive deformation of a tropical hardwood
W. Rangsri, J. Gril, G. Jeronimidis 171

Modeling the logitudinal shear properties of softwood with regard to macro- and micro-structural variability
U. Müller, W. Gindl, A. Sretenovic, A. Teischinger 177

Theroretical analysis of unsteady temperature field in wood-based board with arbitrary grading structure
Y. Obata, M. Kawazoe, F. Abe, K. Kanayama 183

Nanoindentation technique -mechanical measurements at the sub-micron scale
W. Gindl, R. Wimmer, H. Gupta, T. Schöberl 189

Hygromechanical modelling of layered parquet using the finite element method
P. Blanchet, A. Cloutier, G. Gendron, R. Beauregard 195

Modelling the wood fibres behaviour under tensile force
M. Sedighi-Gilani, V. Pittet, P. Navi 201

Determination of transverse elastic constants of wood using a cylindrically orthotropic model
J. C. Hermanson, S. M. Peyer, J. A. Johnson 207

Fracture mechanical parameters for the TR – crack propagation
K. Frühmann, I. Burgert, G. Sinn, S. E. Stanzl-Tschegg 213

Comparison of two composite descriptive approach of cell wall anisotropy in normal wood of softwood
C. Gachet, D. Guitard, J. Gril 219

4. Fracture mechanics

Crack propagation in wood and wood products
P. J. Gustafsson 227

Lattice models for wood fracture and failure
E. N. Landis, W. G. Davids, P. Parrod, S. Vasic 237

Fracture energy release rate determination in the LR plane of wood
N. Dourado, S. Morel, G. Valentin, J. Morais 243

Cracking and rupture of notched LVL beams
M. Chaplain, R. Bouadjel, G. Valentin 249

A thermal imaging approach for monitoring static and torsional fatigue testing of wood
B. Gabbitas, Z. Chen 255

Viscoelastic crack growth process in wood constructions. An approach by the Jv integral
F. Dubois 261

Influence of knots in structural timber
C. Foley 269

Mode I fracture toughness of five different European hardwoods
P. Becker, A. Döhrer 275

FEA-models for cracking behaviour in wood under torsional loading
B. Gabbitas, Z. Chen 281

Design method of mechanical performance of fibre reinforced glulam beams
N. Itagaki, Y. Iijima, H. Mihashi 287

Testing the timber glulam beams strengthened with CFRP plates
M. Haiman, M. Rak 293

Comparison of the block-shear test and a new modified shear test set-up for the determination of shear modulus and shear strength in a single test
A. Sretenovic, U. Müller, W. Gindl, A. Teischinger 299

FEA model of the edge crack in wood element under tensile stresses
V. Rajčić, A. Bjelanović 305

5. Composite design based on natural materials

A review on wood composite products in relation to sustainability and durability
J. Van Acker, M. Stevens 313

Macroscopic test methods to estimate hygroelastic properties of wood fibres for composite applications
E. K. Gamstedt, C. Neagu, F. Berthold, M. Lindström 327

Study of the effect of compatibiliser on the mechanical properties of wood flour - polypropylene composites using dynamic mechanical analysis (DMA)
M. Tajvidi, R. H. Falk, G. Ebrahimi 333

Failure analysis and finite element modelling of timber-steel-timber composites connected by shot-fired bainitically-hardened nails and subjected to short-term lateral shear
P. Alam, M. P. Ansell 339

Shape stabilisation of densified wood through Thermo-Hydro-Mechanical (THM) post-treatments with a new multiparameter reactor
F. Heger, F. Girardet, P. Navi 345

Effect of dislocations in Norway spruce fibres on the mechanical properties of paper
N. Terziev, G. Daniel, A. Marklund 351

Microstructure and 3D simulation of wood based fibrous insulators
M. Faessel, C. Delisée, J. Lux 357

Numerical analysis of thick bark particleboard wilth grille grooves during mould-pressing
P. Yang, Y. Ohsako, H. Yamauchi, H. Sasaki 363

Development of a finite element model to predict the flexural response of steel-LVL composite beams connected by fired nails and subjected to static bending loads
P. Alam, M. P. Ansell 369

Study of a wood-based composite under torsion
T. Enab, P. Francescato, J. Pastor 375

Short-term creep behaviour of natural fibre/polypropylene composites
G. Ebrahimi, R. H. Falk, M. Tajvidi 381

Author index 387

Original (Exp Bon)

clic here for
the next

4 Lignins

BERNARD MONTIES

Institut National de la Recherche Agronomique,
Laboratoire Chimie Biologique, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France

I. Historical background: the definitions of lignin 114
II. Chemical structure and biochemical properties 115
A. The general structural scheme of lignin 116
B. Biochemical variations in the general scheme of lignin 118
C. Occurrence and role of lignins 121
D. Macromolecular structure of lignin 123
III. Determination of lignins 123
A. Acid-insoluble and acid-soluble lignin 124
B. Spectroscopic methods 125
C. Special procedures 126
IV. Cytochemical and ultrastructural characterisation 127
A. Cytochemical coloration: dyes and reagents 128
B. Ultrastructural microscopic localisation 128
V. Isolation and purification 130
A. Supercritical and organosolv lignin extraction 130
B. Milled wood lignins and related lignin preparations 130
VI. Chemical methods of characterisation 132
A. Chemical degradation methods 132
B. Functional group analysis 136
C. Molecular weight determinations 136
VII. Physical methods of characterisation 138
A. Tracer techniques and isotopic labelling 139
B. Spectroscopic methods 139
VIII. Conclusion 146
Acknowledgements 147
References 147

METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY Vol. 1
ISBN 0-12-461011-0

Copyright © 1989 Academic Press Limited
All rights of reproduction in any form reserved

I. HISTORICAL BACKGROUND: THE DEFINITIONS OF LIGNIN

During the past two decades fundamental advances have been made in the characterisation and structure determination of lignins. While few basic changes have been made in the isolation methods, the development of degradation procedures and localisation techniques, as well as increasing application of spectroscopic methods to lignins in solution and in solid state, have led to a gradual differentiation of lignin from other polyphenolic compounds and to the recognition of lignins as a family of heterogeneous phenylpropane polymers.

It has taken a long time for scientists to recognise the complexity of lignins. While wood was still considered to be a uniform chemical compound, De Candolle (1819) coined the word '*la lignine*' to describe the fraction of wood insoluble after treatment with solvents and mild acid. In 1838, Payen established that this compound, also named '*le ligneux*', was a mixture of two distinct products: '*la cellulose*' and '*l'incrustation ligneuse*', i.e. lignin incrustation. The chemical identity of this incrustation was clearly recognised in the beginning only by Fremy (1859), under the name of '*la vasculose*', on the basis of its insolubility in mineral acids, its solubility in strong alkali and its biochemical properties (occurrence in vessels and strengthening of wood), now frequently attributed to lignin. Much other relevant information concerning the history of the definition of lignins has been assessed in the irreplaceable monograph of Brauns (1952), which provides a comprehensive review of state of knowledge on all aspects of lignin chemistry up until the 1950s. Brauns described lignin not as a 'constitutionally defined compound', but as a 'group of high molecular weight, amorphous compounds', built up mainly, if not entirely, of phenylpropane monomeric units which are not hydrolysed by acids, but which are readily oxidisable, soluble in hot alkali and bisulphite and which condense readily with phenols and thio compounds. Even today, Brauns's definition remains correct.

Until 1960, as indicated in the supplementary volume of Brauns's monograph, little progress was made on the elucidation of the structure of lignin. Only in 1964 did Freudenberg and his coworkers succeed in proposing the first unambiguous structural scheme for spruce lignin. Modifications of the original scheme were introduced later and were comprehensively reviewed in 1968. Freudenberg's molecular scheme for spruce wood lignin has been constructed as an 'average' or 'statistical' fragment of a larger molecule including a minimum number of about 20 monomers. This model summarises and allows the prediction of analytical and reactivity data assuming that spruce lignin is the polymeric product of the dehydrogenation of coniferyl alcohol.

Other molecular schemes were published later for conifer (softwood) lignin by Sakakibara (1980) and Glasser and Glasser (1981) and for angiosperm (hardwood) lignin by Nimz (1974) and Adler (1977), for example. These various formulae provide an unified view of the available information but, as stressed by Sakakibara (1977), 'these formulae are only temporary and will have to be altered when further information is acquired'. Furthermore, the reductionist approach which began with these individual molecular formulae tended to overshadow the concept of lignin heterogeneity which has been put forward more and more frequently during the last two decades.

The plural 'Lignins', in the title of the comprehensive monograph edited by Sarkanen and Ludwig (1971a), illustrates the concept of lignin structural variety and of heterogeneity, mainly in relation to pulping technology. It is noteworthy that the same plural

was also used, but earlier, by biochemists and plant physiologists such as Nord and De Stevens (1958), Barnoud (1965) and Brown (1966) to illustrate the fact that lignins analysed in different organs (stem, root, branches), different tissues (wood, bark), different cells (primary and secondary xylem, phloem, periderm, fibre, vessels), or even in tissue culture (callus), are not the same as lignin from secondary xylem, which is assimilated to mature healthy wood.

As the result of the gradual advance of knowledge, a more exact definition of lignins has been suggested by Sarkanen and Ludwig (1971b). According to this definition, lignins are described as polymeric natural products arising from enzyme-initiated and chemically driven dehydrogenative polymerisation of primary precursors possessing a *p*-hydroxycinnamyl alcohol structure. In the cell wall, these polymers are always associated with polysaccharides and, in some cases, with certain phenolic acids.

II. CHEMICAL STRUCTURE AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

Figure 4.1 summarises the structure of the common phenylpropane monomer, the common notation of the carbon C_6–C_3 carbon skeleton and the main substitution patterns encountered in lignin chemistry. Inconsistencies in nomenclature and compound names have been reviewed by Sarkanen and Ludwig (1971b). Table 4.1 summarises the customary common names most frequently encountered in lignin

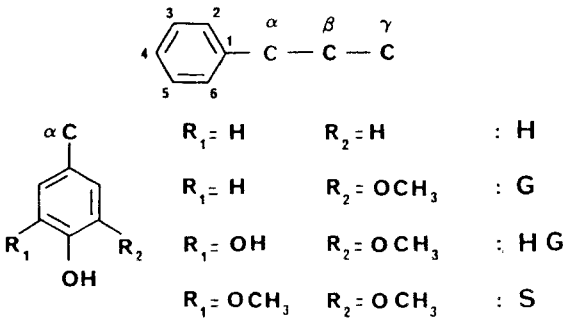


FIG. 4.1. Structure of the carbon skeleton of the monomeric unit, substitution pattern of aromatic rings, usual notation and names mainly encountered in lignin chemistry (cf. Table 4.2).

TABLE 4.1. Preferred radical names in lignin nomenclature.

Usual		Desirable	Common
(H)[a]	Hydroxyphenyl	4-Hydroxyphenyl	Phenyl
(C)	Catechol	3,4-Dihydroxyphenyl	Diphenyl
(G)	Guaiacyl	3-Methoxy-4-hydroxyphenyl	Methoxyphenyl
(M)	Methoxy catechol	3-Methoxy-4,5-dihydroxyphenyl	Methoxydiphenyl
(S)	Syringyl	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl	Dimethoxyphenyl
(A)	Anisyl	4-Methoxybenzyl	
(V)	Veratryl	3,4-Dimethoxybenzyl	Dimethoxyphenyl
(T)		3,4,5-Trimethoxybenzyl	Trimethoxyphenyl
	Cinnamyl	3-Benzyl-allyl	Phenylpropenyl
	Coniferyl	3-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-allyl	Guaiacylpropenyl

[a] Abbreviation according to Fig. 4.1.

TABLE 4.2. Structure and trivial name of current phenylpropenoic- and benzoic alcohols, aldehydes, or acids.

Substitution pattern	Aromatic type		
	Phenyl (H)	Guaiacyl (G)	Syringyl (S)
C_6–C_1 acid	*p*-Hydroxybenzoic (b)	Vanillic (v)	Syringic (s)
C_6–C_1 aldehyde	*p*-Hydroxybenzaldehyde (B)	Vanillin (V)	Syringaldehyde (S)
C_6–C_3 alcohol or aldehyde	*p*-Coumaryl	Coniferyl	Sinapyl
C_6–C_3 acid	*p*-Coumaric (PC)	Ferulic (FE)	Sinapic (SI)

chemistry. This duality must be tolerated until international nomenclature has been established. Table 4.2 shows the usual names of the corresponding benzoic (C_6–C_1) and cinnamic (C_6–C_3) acids, aldehydes or alcohols most often encountered in lignin chemistry with their abbreviations

A. General Structural Scheme of Lignin

The general chemical structure of lignin which is currently accepted stems from the ideal one, '*Idealbild*', described by Freudenberg (1955) for conifer lignin and, more particularly, for spruce lignin. According to Venverloo's (1969) comparison of poplar lignins obtained from primary and secondary xylem, from phloem and periderm and from tissue cultures, it should be stressed that the structure of 'gymnosperm lignin' or of 'angiosperm lignin' found in the literature only holds for secondary xylem lignin from corresponding woods. Once these reservations have been accepted, the general chemical structure of lignin can be explained by the theory of dehydrogenative polymerisation of coniferyl, sinapyl and coumaryl alcohols whose experimental foundations have been established by Freudenberg and coworkers using mainly peroxidase-initiated dehydrogenative polymerisation of coniferyl alcohol (Freudenberg, 1955, 1968; Sarkanen and Ludwig, 1971a).

The process of dehydrogenative polymerisation of monomeric lignin precursors was first studied *in vitro* using crude oxidase preparations from fungi. Numerous dimers, trimers and oligomers, 'oligolignols', have been isolated and their bonding pattern has been determined. These types of bonds have been identified in isolated polymeric lignin as well, giving strong evidence in favour of a random polymerisation process of lignin *in vivo*.

The general complexity of the chemical structure of lignin in terms of intermonomeric linkages can be explained by the random reactions of the phenoxy radicals produced by peroxidase oxidation of the three phenylpropane monomers. The four main mesomeric forms of the coniferyl alcohol radical are shown in Fig. 4.2. The 16 possible types of intermonomeric linkages formed by coupling of such radicals are shown in Table 4.3. The probability of formation of these different linkages depends on steric, solvation, and electronic effects which have been discussed by Sarkanen (1971), Tanahashi *et al.*

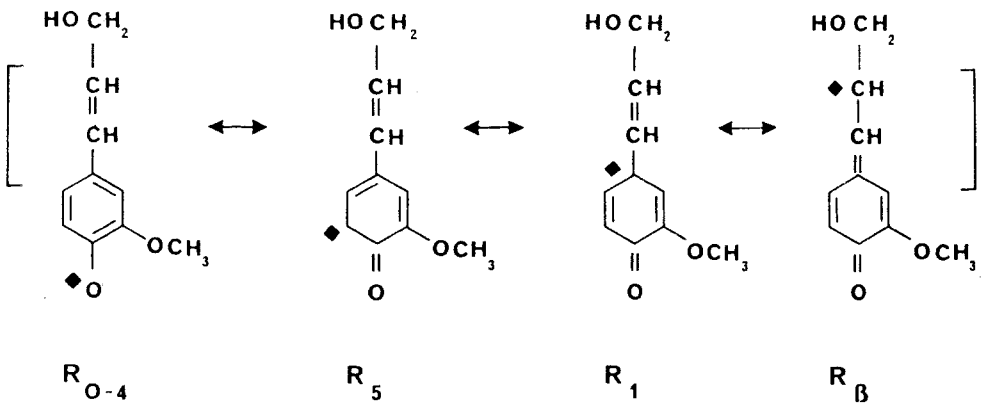


FIG. 4.2. Main mesomeric forms of phenoxy radicals produced by peroxidative oxidation of coniferyl alcohol.

TABLE 4.3. Possible intermonomeric linkages formed by free radical coupling of the four main coniferyl alcohol radicals.

Radical type[a]	$R_{4\text{-}O}$	R_β	R_5	R_1
$R_{4\text{-}O}$	4-O–O-4′[b]	4-O–β′	4-O–5′	4-O–1′
R_β	β–O-4′	β–β′	β–5′	β–1′
R_5	5–O-4′	5–β′	5–5′	5–1′
R_1	1–O-4′	1–β′	1–5′	1–1′

[a] See Fig. 4.2.
[b] Unstable: peroxide.

TABLE 4.4. Relative frequency of some prominent intermonomeric linkages, per 100 monomeric C_6–C_3 unit, in typical conifer lignins.

Linkage type	Freudenberg (1964)	Adler (1977)	Sakakibara (1980)	Glasser and Glasser (1981)
β–O-4′	35	48	43 }	55
α–O–4′	20	6–8	11 }	
β–5′	15	9–12	14	16
β–1′	0	7	11	9
5–5′	15	9.5–11	21	9
4–O–5′	5	3.4–4	7	3
β–β′	10	2	14	2

(1976) and Glasser (1980). The relative frequencies of the most prominent intermonomeric linkages found in typical conifer lignin according to Freudenberg, Adler, Sakakibara and Glasser are collected in Table 4.4. The corresponding molecular structures are shown in Fig. 4.3. Several discrepancies can be observed in Table 4.4; these may be more a consequence of the use of different analytical methods and of the limitations in quantitative techniques than in formation of lignin through a non-random polymerisation process.

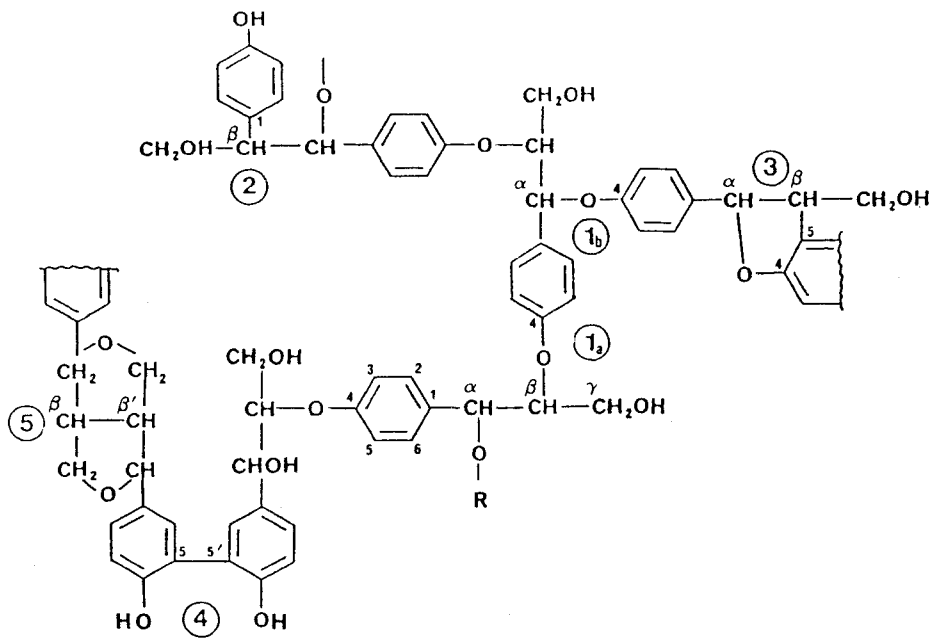


FIG. 4.3. General scheme of prominent molecular structure in softwood lignin; relative frequencies of β–O–4′, α–O–4′, β–5′, β–1′, 5–5′, 4–O–5′ and β–β′ linkages shown in Table 4.4 are indicated by number 1 to 5. R, α-ether unit linked to non-lignin components (polysaccharide, phenolic acids).

B. Biochemical Variations in the General Scheme of Lignin

Biochemical variations, mainly due to differences in plant species, stage of development and cytological origin, could change the monomeric composition, alter the nature and the proportions of the intermonomeric bonds and thus modify the general molecular scheme of the 'prototype of lignin, namely spruce lignin' (Freudenberg, 1968).

TABLE 4.5. Frequency of prominent intermonomeric linkages, per 100 monomeric C_6–C_3 unit, in spruce (*Picea abies*) and birch (*Betula verrucosa*) wood lignins.

Linkage	β–O–4′	α–O–4′	β–5′	β–1′	5–5′	4–O–5′	β–β′
Spruce	48	6–8	9–12	7	9.5–11	3.5–4	2
Birch	60[a]	6–8	6	7	4.5	6.5	3

Data from Adler (1977).
[a] Total corresponding to about 25 guaiacyl and 35 syringyl units.

Table 4.5 shows the characteristic differences between typical gymnosperm (spruce), and angiosperm (birch) lignin according to Adler (1977). Clear differences in the frequency of 5–5′ and in 4–O–5′ linkages are shown. They can be explained by the additional methoxyl group found at carbon 5 of syringyl monomers (Fig. 4.1). In guaiacyl lignin of conifers, there are about 20–25% of very stable carbon–carbon linkages at C-5 of the guaiacyl unit; this value is only about 10% in the case of the syringyl-guaiacyl lignin of angiosperm. This difference has been related by Glasser and Kelley (1987) to the longer pulping time of conifer woods compared to that of angiosperm woods.

Furthermore, large quantitative differences in the β-O–4′ linkage content can be observed in Table 4.5. Such differences may be related to the additional methoxyl group present in syringyl monomers. They can be also explained by the structural variations in dehydro-polymers of coniferyl alcohol reported by Lai and Sarkanen (1975). These differences confirm the necessary adaptability of the general structural scheme of conifer lignin. During *in vitro* polymerisation experiments of coniferyl alcohol by peroxidase and hydrogen peroxide, these authors have reported a relative increase in the proportion of β–O–4′ linked dimers to β–β′ and β–5′ dimers when the substrate was added 'dropwise', over a long period of time, instead of very rapidly in one portion, 'at once'. These two processes, first described by Freudenberg and coworkers as '*Zutropf-*' and '*Zulauf-verfahren*', have been extensively discussed by Sarkanen and Ludwig (1971c). These authors suggest that in the 'dropwise' procedure, the coupling of monomer radicals gives a polymer, via mainly β–O–4′ linkages, by successive coupling of the monomer to progressively formed oligolignol radicals producing an 'end-wise', linear type polymer. In the case of the 'at once' procedure, the formation of dimers, via mainly 4–O–5′ and 5–5′ linkages, would produce 'bulk', branched type polymers.

According to these data, it seems that lignification of plant cell walls and the corresponding lignin structural scheme could vary in relation to the rate of supply of the monomer, even in the ideal case of homopolymerisation of coniferyl alcohol in spruce wood. Model experiments reported by Tanahashi and Higuchi (1981) of *in vitro* polymerisation in a dialysis tube, involving diffusion of smaller oligolignols across the cellulose membrane, strongly corroborate this hypothesis. In the case of heteropolymers such as syringyl–guaiacyl (S-G) lignins in hardwoods, or syringyl–guaiacyl–hydroxyphenyl (S-G-H) lignins in monocotyledons, it is thus very likely that differences in stability and reactivity of the radicals corresponding to the various monomers (Fig. 4.1) should affect the general molecular structure of lignins even more. In the case of *in vitro* dehydrogenation polymers, such variations in molecular structure, as evidenced by combination of independent physical and chemical methods (Faix and Schweers, 1975; Faix and Besold, 1978), have been related to differences in monomeric composition.

The *in vivo* formation of syringyl lignin now appears as only a particular case of such variation. Chemical evidence for the occurrence of syringyl lignin in angiosperms was first obtained by Yamasaki *et al.* (1978a), who separated a syringyl-rich lignin fraction, containing more than 85% syringyl units, from three angiosperm woods. Furthermore, the *in vitro* formation of syringyl dehydropolymers which had been questioned by Freudenberg's group, has been established by the former authors (Yamasaki *et al.*, 1978b). These results indicated that sinapyl alcohol could polymerise to a syringyl lignin, very likely enriched in β-O–4′ linkages, and that angiosperm lignins were not uniformly copolymerised statistical syringyl–guaiacyl polymers. The systematic isolation of lignin fractions with different monomeric compositions from several poplar woods (Lapierre, 1986), from six different types of angiosperm woods (Tollier *et al.*, 1986) and from maize stems (Queral and Monties, unpublished) is in complete agreement with this hypothesis, confirming the general molecular heterogeneity of angiosperm lignins (Higuchi, 1985; Monties, 1985).

Similar, and very likely even larger, variations in the general structural scheme are to be expected for lignification of different species, organs, tissues and even cell fractions. Large variations in monomeric compositions have been reported between species, for example by Shimada *et al.* (1973) who classified a number of terrestrial vascular plants

forming lignin (two gymnosperms, three angiosperms and one monocotyledon) into six categories. Furthermore, gymnosperm lignin in angiosperms, angiosperm lignin in gymnosperms and a progresssive evolution of the gymnosperm-type to the angiosperm-type lignin have been respectively reported by Kutsuki and Higuchi (1978) in the legume *Erythrina crista-galli*, Shio and Higuchi (1981) in the vessel-less angiosperm genus *Sarcandra*, and Shio and Higuchi (1978) in seven species of Podocarpaceae. These variations suggest a progressive evolution of lignin from a guaiacyl to a syringyl type.

Qualitative differences in lignification between organs and tissues in the same plant have also been reported, mainly using cytochemical methods but frequently without chemical confirmation. This is the case for wood, bark, leaves and root in trees reported by Bland (1966) and Srivastava (1966). This is also the case for stem and leaves in herbaceous angiosperms reported by Stafford (1964) and Wardrop (1981), confirming that lignins of modified chemical structure do occur in certain cases in different organs of the same plant.

Studies on the distribution of lignin in different morphological cells and cell wall fractions have also confirmed the lack of uniformity in lignification. Through extensive use of microscopic techniques to examine *in situ* lignin in thin sections of woods, Goring and his coworkers demonstrated that in angiosperm wood, the guaiacyl to syringyl ratio of lignin varied in the different morphological regions investigated. The secondary wall of the fibre was richer in syringyl units, while the secondary wall of the vessel consisted mostly of guaiacyl residues. Differences in composition of the lignin in the middle lamella were also observed in relation to the types of contiguous cells: fibre/fibre, fibre/vessel, fibre/ray and ray/ray. Discrepancies in contents and monomeric composition were found when different cytochemical techniques were used, suggesting that physical separation of various types of tissues would resolve these difficulties (Saka and Goring, 1988). Such fractionation has been done recently by Hardell *et al.* (1980a,b) in the case of birch wood and by Whiting *et al.* (1981), Westermark (1985a,b) and Sorvari *et al.* (1986) in the case of spruce. The results obtained in the case of birch wood were in excellent qualitative agreement with those of Goring and coworkers. Fractions of spruce tissue from secondary wall and middle lamella, isolated by Whiting, were compared by a pyrolytic method (Whiting and Goring, 1982a), indicating a low relative content of guaiacyl monomers for the middle lamella. Assuming that spruce lignin contains only hydroxyphenyl (H in Fig. 4.1) and guaiacyl residues, then 43% of the middle lamella lignin would consist in H units. This conclusion has been questioned by Westermark (1985a,b) who reported a negligible content of H units in her spruce middle lamella sample and who suggested contamination of Whiting's fraction by compression wood which is well known for its high content in H units (Erickson *et al.*, 1973a). Larger contents of hydroxyphenyl- or other methoxyl-deficient units were however suggested by Sorvari *et al.* (1986) for isolated middle lamella than for the corresponding secondary wall lignin of spruce. Even if few or no differences in monomeric units can be detected between middle lamella and secondary wall lignins, a clear difference in reactivity has been recognised by these three authors, for, on the one hand, these two types of hydroxyphenyl lignins and, on the other hand, the whole wood guaiacyl-type lignin. Furthermore, the large differences in relative reactivity of middle lamella and secondary wall lignin of spruce wood observed by Whiting and Goring (1982a,b) with certain pulping reagents (Cl_2, ClO_2 and $NaHSO_3$) has shown inherent chemical structural differences for these two types of lignin. Confirming the extent of the biochemical

variations of the general guaiacyl scheme of gymnosperm lignin, Whiting and Goring (1982c) have suggested that two lignin precursors, *p*-coumaryl alcohol and coniferyl alcohol (Table 4.2) must be present during the biosynthesis of the middle lamella in spruce tracheids. This hypothesis has been very clearly confirmed by Terashima and coworkers. In a recent review of their extensive studies carried out by selective labelling of *in vivo* lignin with tritium labelled H-, G- and S-alcohol glycosides, Terashima and Fukushima (1988a,b) have concluded that lignin, in angiosperms as in gymnosperms, matures under changing biochemical conditions to a macromolecule which is heterogeneous in structure as a function of its morphological location. 1:H units are mainly incorporated in the middle lamella of angiosperms and gymnosperms, 2:S units are incorporated mostly in the secondary wall of fibres of typical angiosperms and 3:G units are incorporated in both types of plants from early to late stage of cell wall differentiation in both vessels and fibres or tracheids.

Biochemical variations in the general structural scheme of lignin reported recently have been observed in normal, healthy plants grown under standard conditions. Variations in lignin chemical properties and monomeric composition have been repeatedly reported under non-standard conditions of development, for example in the case of *in vitro* culture (Stafford, 1964; Wolter *et al.*, 1974; Nimz *et al.*, 1975; Grand *et al.*, 1979; Mollard and Robert, 1984; Fukuda, 1983; Hoffman *et al.*, 1985), in the case of diseased plants (Asada *et al.*, 1975; Kimmins and Wuddah, 1977; Vance *et al.*, 1980; Friend, 1981; Maule and Ride, 1983; Uchiyama *et al.*, 1983; Hammerschmidt, 1984; Doster and Bostock, 1988). Variations have also been reported for plants under particular growth conditions such as: lignin differentiation in hardwood xylem and in grasses (Eom *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1967), formation of compression wood (Morohoshi and Sakakibara, 1971; Erickson *et al.*, 1973a; Yasuda and Sakakibara, 1976), mechanical stress (Jaegher *et al.*, 1985), anomalous mineral and water metabolism (Wardrop, 1976; Graham, 1976, 1983; Dugger, 1984; Brown *et al.*, 1984), vitrification (Downes and Turney, 1986; Kevers *et al.*, 1987), genetic variation and mutation (Kuc and Nelson, 1964; Bucholtz *et al.*, 1980; Sharma *et al.*, 1986; Gaudillere and Monties, 1988) and possibly also during post-harvest transformations (Sealy, 1982; Stanley and Aguilera, 1985; Smith *et al.*, 1987). In these anomalous cases, variations in lignification have been frequently reported without structural characterisation of the lignins or of the lignin-like compounds. Considering the variations already reported for lignins from angiosperm secondary walls and from gymnosperm middle lamella, one can also expect large structural variations in these anomalous lignins. Very recently, the occurrence of an additional 5-hydroxyguaiacyl (HG, Fig. 4.1) monomeric unit incorporated in the lignin of a mutant of maize (*Zea mays* L.) has been reported, strengthening the concept of qualitative variability of lignins and possibilities of genetic manipulation of lignification (Lapierre *et al.*, 1988).

C. Occurrence and Role of Lignins

Freudenberg (1955) has clearly stressed the main morphological roles of lignin: 'by permeation of polysaccharidic walls and filling up of the intercellular woods, lignin makes them more mechanically-resistant'. By comparing the mechanical properties of normal woods, beech and poplar, and of the corresponding chemically delignified woods, 'holocellulose', Klauditz (1952) clearly illustrated the strengthening functions of

lignins. Furthermore, considering the lower mechanical properties of wood and, particularly, of holocellulose in the wet state, this author has also pointed out the water-repellency of lignification. Such an effect can be related to the waterproofing of vessels which also appears to have been a main function of lignin during plant evolution. Raven (1977) has suggested that lignified tissue did not have a major mechanical role in the vascular plants until the Lower Devonian and that a more important structural role for lignified tissue was found from the Middle Devonian, in the proangiosperms. Raven hypothesises that vegetative advances in the latter Devonian period were due to evolution of xylem in plants through the use of lignified tissues for mechanical support in combination with the occurrence of primary waterproof vascular tissue. The absence of lignin from vessel-less plants such as 'giant' mosses (*Polytrichales* sp.) (Miksche and Yasuda, 1978) and algae (*Fucus* sp.) (Ragan, 1984), as well as the reduction in lignification in the aquatic Lemnaceae (McClure, 1970), and the weak lignin content in the aquatic monocot *Elodea* (Chen *et al.*, 1980), corroborate Raven's theory. These data strongly underline the importance of the hydrophobic function of lignins. Other functions have been suggested such as a role as waste material or a protection against predators, pathogens and ultraviolet light (Kratzl, 1958; Neish, 1968; Vance *et al.*, 1980; Lowry *et al.*, 1980).

Both the ability to hydrophobise and to strengthen the other cell wall polymers appear to be essential roles for lignin in terrestrial plants. Furthermore, a progressive change in the qualitative nature of lignin, i.e. from the H-G lignins of conducting vessels to the S-G lignins of supporting fibres, may have occurred during evolution. Recent comparisons by Logan and Thomas (1985) of the monomeric composition of lignins in the plant kingdom have shown that the syringyl monomer is more widespread in plants than previously thought and that it may be associated with the evolution of fibres and of their mechanical function.

The old incrustation theory, according to which lignin permeates the 'cellulosic membranes' and fills up the 'voids of the plant walls', fits in well with the above ideas. According to such views lignin should be in chemical combination with polysaccharides (Freudenberg, 1968) and other cell wall components. Strong evidence of this has been obtained during the last decade. Thus lignin can occur linked to hemicellulosic sugars such as xylose, arabinose, mannose and glucose (Eriksson *et al.*, 1980; Das *et al.*, 1981; Minor, 1982; Watanabe *et al.*, 1986; Takahashi and Koshijima, 1988), to cellulose (Bach Tuyet *et al.*, 1985) to pectic substances (Das *et al.*, 1981; Meshitsuka *et al.*, 1982; Tanabe and Kobayashi, 1988) or to phenolic acids by ether or ester linkages (Whitmore, 1976; Higuchi, 1980; Monties and Lapierre, 1981; Atsushi *et al.*, 1984; Scalbert *et al.*, 1985; Azuma *et al.*, 1985a, Tai *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1987). Furthermore, associations between lignins and other cell wall polymers such as glycoproteins (Whitmore, 1982; Dill *et al.*, 1984; Eom *et al.*, 1987) and tannins are possible (Haslam and Lilley, 1985; Stafford, 1988; Jouin *et al.*, 1989). Tannins can contribute to the strengthening of the cell wall, during heartwood formation, by so-called 'secondary lignification' (Hergert, 1977; Jouin *et al.*, 1989) but they are not essential components of the plant cell wall (Freudenberg, 1955). Lignins, however, are (Roberts *et al.*, 1985) and the chemical cross-linking and physical entanglement of these macromolecules are characteristic not only of the secondary, i.e. lignified, but also of the primary plant cell wall (Northcote, 1972; Lamport and Epstein, 1963; Fry, 1986). The essential role of lignin thus appears to provide a 'cross-linked hydrophilic cell wall composite' (Monties, 1990b). Accordingly, lignification involves a progressive displacement of water with replacement of a

reversible hydrogen-bonded structure by a more closed cross-linked cage (Northcote, 1972). This general role may result from the self-organisation capacities of lignin when the plant cell wall is considered from the point of view of the information theory (Atlan, 1974; Bernier, 1986) as discussed elsewhere (Monties, 1989, 1990a,b).

D. Macromolecular Structure of Lignin

Lignin macromolecular structure is of paramount technological interest, both as regards topochemical effects during pulping (Goring, 1971; Favis and Goring, 1984) and the generation of mechanical growth stress in trees (Boyd, 1972; Bamber, 1987). Macromolecular properties of lignins have remained largely hypothetical until now. Evidence for the original three-dimensional random polymer (Goring, 1971) has been questioned and, very recently, a modified scheme has been proposed in which lignin in wood comprises several types of network which differ from each other both ultrastructurally and chemically (Goring, 1989). Similarly, its solubilisation behaviour is poorly understood. A mechanism for formation of stable chains joined by cleavable cross-links has been described (Yan, 1981; Berry and Bolker, 1984; Yan and Johnson, 1980) in which there is a certain regularity in the distribution of weak and strong bonds in lignin. Earlier Freudenberg (1968) reported the occurrence in spruce lignin, of 'more resistant clusters of, on an average, 14 monomeric units glued by about 7 to 9 weak bonds randomly distributed among 100 units'. Whatever the macromolecular details, the complete insolubility of *in situ* lignin, 'protolignin', in organic solvents and the solubility (or the ability to swell) of the corresponding isolated lignin (Schuerch, 1952) provide conclusive evidence of a cross-linked structure which is the main characteristic of lignins.

Occurrence of 'soluble lignins', designated as 'native' or 'Brauns's' lignins, isolated by 95% ethanol extraction of finely ground material has been reviewed (Brauns, 1952; Lai and Sarkanen, 1971). According to the theory of network formation (Flory, 1975; Yan and Johnson, 1980), 'soluble lignin' could be related to the soluble fraction resulting from a gelation process and thus may have a 'lignin nature', according to Lai and Sarkanen (1971). Soluble lignin has to be thoroughly separated from lignans; see Freudenberg and Knof (1957), Sakakibara *et al.* (1987) and Ozawa and Sasaya (1987). As with lignins, lignans comprise a family of plant products formed, in principle, by dehydrogenative polymerisation of simple phenylpropane units (Erdtman, 1955; Gottlieb, 1972; MacRae and Towers, 1984). Their structures are reminiscent of the structural scheme of lignin dimers (Freudenberg and Weinges, 1961) and oligomers (MacCreadie *et al.*, 1969). With only rare exceptions (Miki *et al.*, 1980), lignans can be characterised by an optical activity which has never been demonstrated, until now, in isolated lignin fractions. The importance of lignans in the field of lignin chemistry stems from the fact that they can be very easily confused with lignin degradation products during analysis and that they accumulate in heartwoods during the so-called 'secondary lignification' process (Hergert, 1977; Sakakibara *et al.*, 1987).

III. DETERMINATION OF LIGNINS

In view of the complexity and structural variations in lignins, it is not surprising that no single method has been found satisfactory for lignin determination. Thus a combination

IES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

of independent methods provides the safest way for evaluating lignin content. Results must be then interpreted within the limitations of each analytical procedure; most of these limitations have been thoroughly discussed (Browning, 1952, 1957; Lai and Sarkanen, 1971).

The most commonly used methods for lignin determination are based on acid treatments, leaving an insoluble residue, weighed as 'acid-insoluble lignin' in combination with UV spectroscopic determination of either the corresponding 'acid-soluble lignin' or the 'total lignin', after complete solubilisation of the sample.

A. Acid-insoluble and Acid-soluble Lignin

The common Klason type procedure in which lignin is precipitated after sulphuric acid treatment (Tappi standard) has been throroughly discussed by Browning (1967) and has been adapted for both woody and herbaceous plants (Effland, 1977; Bagby *et al.*, 1971).

The procedure for woods calls for extraction of ground air-dried wood previously extracted in a Soxhlet with ethanol–benzene, ethanol and water. For safety, toluene or acetone can replace benzene. One ml of 72 wt% H_2SO_4 is added to each 100 mg of sample (about 200–300 mg sample size). The Micro-Klason technique is the same except that a sample as small as 1 mg can be analysed after adaptation of the reagent and the Soxhlet apparatus (Whiting *et al.*, 1981). After frequent stirring for exactly 1 h, to ensure dissolution at 30°C, the mixture is diluted using 25 ml of water for each 1 ml of acid. According to Browning (1967) a longer time (2 to 3 h) at a lower temperature (20° to 25°C) is equally satisfactory. A second hydrolysis is carried out in an autoclave (120°C, 1 h) or under reflux (4 h). Insoluble lignin is recovered by filtration on a glass crucible, with an asbestos filter, washing and drying to constant weight and weighing. Klason lignin is usually contaminated with appreciable quantities of proteins and sugar and the structure of these contaminants has been recently studied (Dill *et al.*, 1984; Matsumoto *et al.*, 1984a).

In the case of herbs, corrections for the content of ash and of co-condensed proteins are necessary. Furthermore, a mild acid pre-hydrolysis procedure has been suggested for reducing co-condensation with humin-like degradation products of polysaccharide (Moon and Abou-Raya, 1952; Sullivan, 1959). In place of asbestos, the use of ceramic fibres has also been suggested as a filter aid (MacQueen, 1986). Application of the Klason procedure after mild acid pre-hydrolysis (4 h, reflux, 5% H_2SO_4) provides a determination of the 'acid-insoluble lignin' content, which is systematically lower than the 'Klason lignin' content (Monties, 1984). As acid hydrolysis does not allow quantitative precipitation of lignin, a fraction of 'acid-soluble lignin' can be lost during pre-hydrolysis in the 'acid-insoluble' procedure or during the post-hydrolysis in the standard 'Klason' method. Alkaline pre-treatments, which have been suggested for removing tannins in the case of woods (Browning, 1967), suffer from the same limitation. Furthermore, possible changes in lignin solubility according to tree species and stage of maturity (sapwood to heartwood transition) may affect the accuracy of these procedures (Garland *et al.*, 1986).

Quantitative determination of acid- and of alkali-soluble lignins has been attempted by ultraviolet (UV) spectroscopy at both 205 and more usually at 280 nm (Bobier *et al.*, 1981; Wegener *et al.*, 1983) directly on the clear solution recovered after Klason lignin isolation (Marraccini and Kleinert, 1959; Bland and Menshun, 1971), or after chromato-

graphic purification on cation exchange resin (McKenzie *et al.*, 1955) or after steam distillation (Sawai *et al.*, 1984). Such procedures involve several possible sources of error: formation of UV-absorbing humic-like components during hydrolysis; incomplete precipitation and variations in the degree of condensation as a function of the experimental conditions and of the structure of the lignins; and uncertainties in the determination of the absorption coefficient of the soluble fraction.

Empirical procedures, adapted to overcome these drawbacks in special cases, must be extrapolated with caution. Differences in monomeric composition among alkali-soluble, acid-soluble and corresponding *in situ* wood lignins have been reported (Bland and Menshun, 1970; Musha and Goring, 1974). Furthermore, variations in the chemical structure of sulphuric acid lignins have been clearly related to substitution patterns of monomers and to their reactivity (Yasuda *et al.*, 1980; Yasuda and Terashima, 1982; Leary *et al.*, 1986a; Yasuda and Ota, 1987). Since these molecular features may change solubility and spectroscopic properties of the soluble lignin fractions, unambiguous characterisation of acid- and of alkali-soluble lignin is not possible. In conclusion, total lignin determination seems difficult without the use of summative analysis (Smeltorius and Steward, 1974) and a consideration of the particular molecular structures that are present.

B. Spectroscopic Methods

Numerous spectroscopic methods have been adapted for total lignin determinations either in the liquid state, after lignin solubilisation or in the solid state, with or without dispersion on a solid support. The main advantages put forward are greater sensitivity, the totality of an analysis achieved on the whole sample and reproducibility. The main limiting factor is the precision in the determination of the absorbance coefficient.

The inherent problem with liquid-state spectroscopic methods is solubility. Johnson *et al.* (1961) have achieved the dissolution of lignin from dry and extractive-free woods by acetylation with acetyl bromide in acetic acid, as previously described by Karrer and Bodding-Wiger (1923). The procedure has been adapted to forage plants by Morrisson (1972). In brief, the method consists of treating a dry, extractive-free and powdered sample (10–50 mg) in a loosely-stoppered glass vial with the acetyl bromide reagent (25 vol % of commercial acetyl bromide in acetic acid, 10 ml) at 70°C for 30 min. After cooling, dilution in acetate buffer and decomposition of polybromide ion by addition of hydroxylamine hydrochloride, the absorbance is measured at 280 nm after dilution with acetic acid (50 to 250 ml). Calibrations of this determination with the Klason lignin procedure have shown very strong linear correlations. Calibration against vanillin has been recommended in order to facilitate interlaboratory comparisons (Bagby *et al.*, 1973) but other stable simple phenolic substrates, such as ferulic acid, can be used. Absolute determinations have been attempted by determination of the absorption coefficient. Variations in the shape of the absorption spectra have been observed, however, in the case of woods (Kawamura and Shinoda, 1975), of forages (Robertson, *et al.*, 1979) and pulps (Marton, 1967). Ethanol has been used to obtain sharper bands and more pronounced inflections (Bagby *et al.*, 1973), illustrating the potential limits of the method for absolute determinations. Improvements in the accuracy and reproducibility of the acetyl bromide method have been obtained by controlling the presence of water, the freshness of the reagent and the time of analysis (Van Zyl, 1978). This

procedure has been recently modified by Iiyama and Wallis (1988) who suggested the addition of small quantities of perchloric acid (200 µl for 5 ml of standard reagent) to facilitate both dissolution of the material and the use of coarser samples, and the use of sodium hydroxide to avoid the hydroxylamine treatment. Exhaustive solubilisation of lignin from lignocellulosic products is also possible in triethylene glycol containing 0.2–0.4 vol % of HCl after heating for 1–4 h at 120–140°C (Grondal and Zenczak, 1950). This procedure has been used by Edwards (1973) as a simple and safe alternative to the Klason procedure for the indirect gravimetric determination of lignin. Quantitative determination of a lignin sample prepared in this manner is, however, also possible by UV spectrophotometric measurement of lignin absorbance of the triethylene glycol solution recovered after filtration and removal of the lignin-free cellulosic residue. Linear correlation between lignin contents and absorbances have been observed, in the case of woods and straws, which compare favourably with the range and precision of the acetyl bromide procedure. Simplicity is the main advantage of this new method (B. Monties, unpublished).

Quantitative analysis of lignin in the solid state has been limited mainly to the use of infrared (IR) measurements. Resolution enhancement methods by Fourier transform (FT-IR), development of powerful software for storage and for manipulation of data have been the major advance of the last decade. Until now, however, the use of FT-IR has been limited. Transmission and reflexion procedures have been developed for lignin estimation in unbleached pulp and for lignosulphonate estimation in aqueous solutions (Faix *et al.*, 1987; Berben *et al.*, 1987). Using a circular cell for attenuated total reflectance measurement in aqueous solution, Faix has reported a linear relationship between absorbance at 1487 cm^{-1} and lignin content. In the range 0.5 to 10%, the data were in good agreement with Klason determinations. Diffuse reflectance has also been successfully used, by these authors, for measurement of residual lignin in hardwood and softwood pulp in the range of 1 to 20%; the air-dried powder is placed in the solid sample attachment and the area of the 1510 cm^{-1} peak is measured after base line correction against pure cotton cellulose as reference.

Solid state carbon-13 NMR spectroscopy has been used for lignin determination in woods, with standard deviations in the range of 2% (Leary *et al.*, 1986a). This is based on the signals occurring between 141 and 159 ppm which have been assigned to the two oxygen-linked aromatic carbons (C-3, C-4) of guaiacyl units and (C-3, C-5) of syringyl units. This procedure had been developed by Hemingson and Newman (1985) who claimed the non-destructive advantage of the method over the Klason procedure and the ability of controlling sample purity.

C. Special Procedures

Numerous other methods of lignin determination have been developed, mainly for biological samples. Most are modifications of standard determinations by spectroscopic or insolubilisation procedures and suffer the limitations discussed above; only the most frequently used are briefly discussed here.

Detergent methods for total lignin determination in forages, grasses and fibres have become popular because of the apparent simplicity of these variations of the Klason procedure with pre-treatments for removal of lipids, phenolics, proteins and hemi-

cellulose. Extraction with acid detergent (acid detergent fibre method: ADF) has been developed by Van Soest (1963) and standardised according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (Horwitz, 1980). The influence of the extraction conditions, the time and temperature of reactions have been discussed (Christian, 1971; Southgate *et al.*, 1978). The gravimetric triethylene glycol procedure has been also compared with two modifications of Van Soest's procedure, indicating that lignin is more precisely determined by Christian's detergent method (McLeod and Minson, 1974).

Thioglycolic acid determination of lignin has been relatively frequently used, since the formation of lignothioglycolic acid (LTGA) was reported as a criterion of 'genuine lignin' by Freudenberg (1968). LTGA were furthermore not suspected of extensive contamination by biopolymers such as proteins in herbs. In brief, the LTGA procedure requires that 500 mg of dry powdered sample be treated either with 15 ml of anhydrous thioglycolic acid, containing 0.9 ml of BF_3, for 3 days of 25°C, or with 15 ml of a 1:10 mixture of thioglycolic acid and 2 N HCl, for 4 h at 100°C. After washing with water, lignothioglycolic acid can be extracted from the insoluble residue either in 0.5 N NaOH (Venverloo, 1969; Whitmore, 1978) or in dimethyl formamide (Kimmins and Wuddah, 1977) in the case of spectroscopic estimation by ionisation difference spectra (Goldschmidt, 1954; Aulin-Erdtman and Hegbom, 1957). After acidification, thioglycolic lignin has been recovered for chemical characterisation and, occasionally, for gravimetric determination (Brauns, 1952; Venverloo, 1969). Frequently used in pathogen-induced lignification studies, the LTGA photometric procedure provides a more accurate determination than the gravimetric variant which may suffer from protein contamination (Whitmore, 1978). Finally, the importance of material losses during the formation and during the precipitation of lignothioglycolic acid reported by Venverloo (1969) has never been quantitatively evaluated; such relatively large losses may result from solvolytic degradation, with formation of soluble low-molecular weight oligolignols.

Occasionally, lignin has also been quantified after alkaline extraction at 70°C in 0.5 N NaOH, for a few hours, in combination with ionisation difference spectra analysis (Stafford, 1960; Jeffs and Northcote, 1966; Ride, 1975); the main drawback is incomplete and selective extraction of lignin alkali-soluble fractions. Quantification of lignin has also been sporadically based on colorimetric reactions sensitive for special functional groups such as the reaction of phenolic aldehydes with acid phloroglucinol, and that of *p*-hydroxybenzyl alcohol with chloro-*p*-quinoneimide (Geiger, 1985). The main drawback of such reactions is possible variations in chromophore content and type (Hartley and Keene, 1984); in special cases such procedures compete favourably with other available procedures (Garcia and Latge, 1987).

IV. CYTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISATION

In situ or isolated lignins have been characterised cytochemically after interactions with stains or after chemical reaction with colour reagents, and ultrastructurally by ultraviolet and electron microscopy.

A. Cytochemical Coloration: Dyes and Reagents

Coloration with dyes such as toluidine blue, safranin, fast green and zinc chloride have been frequently used for lignin localisation. Standard reaction procedures have been reported (Feder and O'Brien, 1968; Fengel and Stoll, 1975; Locquin and Langeron, 1978). Due to variations in cell wall affinity (Marlow, 1941), these stains cannot be used as trustworthy indicators.

Colour reactions given by various functional groups present in lignin have been extensively reviewed by Nord and De Stevens (1958) and by Wardrop (1971). Formation of a characteristic red colour with chlorine water–sodium sulphite (Cross and Bevan reagent), chlorine water–ammonia (Vincent reagent) and permanganate–HCl–ammonia (Maule reagent) is specific for free syringyl units (Campbell and McGowan, 1939; Meshitsuka and Nakano, 1979, 1981; Iiyama and Pant, 1988). From the model studies of Adler *et al.* (1948), Geiger and Fuggerer (1979) and Hartley and Keene (1984), it has been shown that the formation of a red colour with phloroglucinol–HCl (Wiesner reagent) is indicative not only of coniferaldehyde and cinnamic aldehydes, but also of cinnamic alcohols and related benzaldehydes (Table 4.2). According to Geiger (1985), the blue colour obtained with halogeno-quinone-chloroimide can be attributed, not only, to *p*-hydroxybenzyl alcohols (Gierer, 1954) but also to other phenolic compounds, such as hydroxycinnamyl alcohols and acids (Table 4.2). The specificity of stabilised diazonium salts suggested by Harris *et al.* (1982) for contrasting lignified cell walls would appear questionable, according to Geiger's data (1985). Barskaya (1962), Bland (1966) and Ivanov (1988) have used colour reactions extensively for lignin determinations but these are unreliable unless they are followed up by microchemical analysis.

Fluorescence microscopy has been used either directly, by autofluorescence determination, or indirectly, in combination with reagents such as phloroglucinol–HCl, in fluorescence quenching experiments for lignin and cell wall phenol characterisation (Biggs, 1984; Aist and Israel, 1986; Eastmann *et al.*, 1988). Discrepancies between authors have been related to differences in the sensitivity of the methods and to the reliability of the procedures. Fluorescence characterisation requires also careful evaluation of the cell wall linked non-lignin phenolics, such as phenolic acids, whose fluorescence may appear relatively more intense than that of lignin and which cannot be easily removed without changing the lignin itself.

B. Ultrastructural Microscopic Localisation

Ultrastructural data for wood, in the range below 0.2 μm (Cote, 1981), have been significantly extended during the last two decades by the use of electron microscopy. Transmission electron microscopy (TEM) has revealed fine ultrastructural variations in 'lignin skeletons' obtained after acid hydrolysis. The mechanisms of permanganate and osmium fixation have been compared in the case of lignin and cell wall phenolics (Bland *et al.*, 1971). It has been shown that $KMnO_4$ is not a specific stain for lignin, as has been generally assumed (Hoffman and Parameswaran, 1976). The ethanolamine–silver nitrate reagent (Coppick and Fowler reagent) has been used for lignin TEM characterisation, even though its functional specificity is low (Czaninski, 1979). Preliminary extraction of cell wall with methylamine has provided a better resolution of lignin–polysaccharide interactions (Czaninski and Monties, 1982; Czaninski *et al.*, 1987).

The distribution of lignin in the wood cell wall has been quantitatively studied, in transverse sections or in fragments, by a variety of microscopic techniques. UV microscopy has two important advantages over visible light microscopy: improvement in resolution by a factor of about two and the presence of characteristic lignin UV bands at about 280 nm. Absorbance has been measured in two different ways: by microdensitometry of negatives from microphotography (Scott *et al.*, 1969) or microphotometry by direct recording of the light intensity with a photomultiplier in the microscope (Lange, 1950). In brief, swollen and embedded samples, cut in ultrathin sections of about 0.2 μm, were examined in monochromatic light using quartz microscope optics and weight concentrations in the wall were calculated according to Lambert's law, after calibration with isolated lignin. This technique is discussed in detail by Scott *et al.* (1969), by Boutelje and Jonsson, (1980) and by Fukazawa and Imagawa, (1981). Uncertainties about the absorbancy value and the lack of uniformity of the lignin (Musha and Goring, 1975) constitute the major restrictions on this approach.

Recently, it has been shown that lignin content in fragments of pulps can be analysed directly by a combination of UV microscopy and interference microscopy (Boutelje and Eriksson, 1984), but the results are no more reliable than the method described above. In a critical assessment of interference microscopy for measuring lignin distribution in cell walls Donaldson (1985) has stressed the importance of specimen orientation and variations in the refractive index of the isolated reference compound, particularly lignin, to the accuracy of the technique. Interference microscopy has been adapted recently for lignin concentration measurement in the S_3 layer of tracheids by making porosity measurements of hydrolysed cell walls (Donaldson, 1987). Corrections for the possible influence of non-lignin phenolics have not been considered however, with regards to acid hydrolysis and content calculations. The effect of phenolic extractives on UV microscopy for lignin determinations must be stressed (Bauch *et al.*, 1974; Imagawa and Fukazawa, 1978).

Lignin distribution can be also studied by conventional electron microscopy in combination with the EDXA system. The technique involves selective substitution of lignin either by bromine (Saka *et al.*, 1978) or by mercury (Westermark *et al.*, 1988) under mild conditions in organic solvents.

Initial work employing bromination and scanning electron microscopy (SEM-EDXA) was carried out on bulk wood specimens under conditions of low spatial resolution; back scattering, fluorescence and absorption complications have been remedied by using thin specimens (Saka and Thomas, 1982). Transmission electron microscopy has also been combined with EDXA for studies on lignin distribution in tracheids and morphological fractions (secondary wall and middle lamella) of pine wood (Saka *et al.*, 1982) and birch wood (Saka and Goring, 1988). Procedures for brominating samples and model compounds (2 h at 28°C in solution of 0.25% v/v bromine in chloroform) and differences in reactivity have been dicussed (Saka *et al.*, 1988). Comparison of data obtained by UV microscopy and EDXA after bromination, has indicated that, in the case of pine secondary wall (S_2), a correction factor has to be applied to EDXA results to obtain good agreement with that of UV microscopy (Saka *et al.*, 1982). The variability of the correction factor, warranted by lower S_2 reactivity (Saka *et al.*, 1982), has been questioned by Westermark (1985b), who suggested that Saka's samples were contaminated with reaction wood. Recent studies of lignin distribution by mercurisation with SEM- and TEM-EDXA in spruce (Westermark *et al.*, 1988) and in birch (Eriksson *et al.*, 1988) have strengthened this view. Furthermore, these authors have

shown that, contrary to bromine whose reactivity depends on the molecular structure of lignin compounds (Saka *et al.*, 1988), mercury substitution occurs in a 1:1 ratio of mercury to monomeric C_9 unit in both spruce and birch lignin. As the procedure is rather simple (reflux in a solution of mercuric acetate and acetic acid in methanol for a few hours and washing) and, as this method seems to be independent of structural variations in the lignin, the mercurisation SEM- and/or TEM-EDXA procedure should be the future method of choice for lignin distribution studies.

V. ISOLATION AND PURIFICATION

Procedures for isolating lignin fractions on the laboratory scale have been thoroughly reviewed by Lai and Sarkanen (1971). Preparation and purification procedures on an industrial scale such as steam explosion lignin, organosolv lignins and bioconversion lignins have been reported by Glasser *et al.* (1983a,b). During the last two decades, however, supercritical extraction (SCE) and organosolv pulping are the only two really new techniques to have been applied.

A. Supercritical and Organosolv Lignin Extraction

The changes in wood during extraction with methanol and acetone SCE reported by Howard and McDonald (1981) have not been confirmed by Ritter and Campbell (1986) so that high pressure extraction does not seem to alter the wood structure. Lignin extraction has been described using SCE-methylamine (Beer and Peter, 1986), SCE-water (Bobleter and Binder, 1980) and SCE-dioxane (Calimli and Olcay, 1982). Structural characterisation of lignin has been reported only in the case of dioxane extraction, which revealed that extensive demethoxylation pyrolysis reactions occurred. On a laboratory scale, flow-through reactors adapted for treatment of lignocellulosic products in the range of 200–350°C under pressures of 200–300 bar have been described (Koll and Metzger, 1978; Bobleter and Binder, 1980).

Isolation of lignin in an undegraded form is generally considered to be one of the advantages of the new and numerous organosolv pulping processes. A wide range of 21 pure solvent delignification procedures has been listed by Johansson *et al.* (1987); most use mineral acids for solubilisation and concentrated extracts are poured into a large volume of water (1 to 10–20 vol) to isolate the lignin (Browning, 1967). The lignins so produced have not usually been characterised. It appears likely that most of these procedures cause condensation reactions and loss of loosely attached monomeric units during acidolysis (Section VI.A.3). In the standard case of dioxane-extracted lignins, the isolation procedure in dioxane–water (9:1; v/v) with acid catalyst at various temperatures has been recently reviewed (Monties, 1988c). The importance of condensation and rearrangement reactions during solvolysis has been stressed by Argyropoulos and Bolker (1987) and Lapierre *et al.* (1985a). Such degradations probably occur to varying degrees during all types of organosolv lignin preparations.

B. Milled Wood Lignins and Related Lignin Preparations

Milled wood lignin (MWL) and enzymatically liberated lignin (EL) are still the best available preparations (Browning, 1967; Lai and Sarkanen, 1971). Numerous modifi-

cations have been introduced to these procedures to improve the yields so that the fractions obtained are really representative of native lignin. In brief, these procedures call for very fine grinding of an extractive free-wood meal (granulometry of about 10 to 100 μm), followed by exhaustive extractions of the ultraground sample with dioxane–water, followed by concentration, precipitation in a large volume of water and, eventually in ether, and recovery of MWL which is finally dried. EL isolation procedures require enzymatic hydrolysis of cell wall polysaccharides after ultragrinding, water washing of the insoluble residue and dioxane–water extraction of lignin followed by purification by repeated precipitation, as in the case of MWL. Many modifications have been introduced in order to, first, increase the yield (usually less than 25% for MWL) and, second, to control the changes induced by milling. Isolation procedures differ thus from laboratory to laboratory. The type of cellulolytic enzyme preparative (Chang *et al.*, 1975; Koshijima *et al.*, 1983), the milling time and the type of mill (Salud and Faix, 1980; Lee *et al.*, 1981; Glasser *et al.*, 1983a; Fiserova *et al.*, 1985), and the extraction procedure (Wegener and Fengel, 1979) all affect the yield and nature of the final product.

Yields of up to 50% with respect to Klason lignin, and up to 100%, have been reported, following successive extraction of MWL and EL fractions (Bezuch and Polcin, 1978; Fiserova and Suty, 1980; Lapierre, 1986; Tollier *et al.*, 1986) or by combining the two procedures (Chang *et al.*, 1975; Sorvari *et al.*, 1986). The mechanism of mechanical depolymerisation which very likely occurs during these extraction procedures involves the formation of free radicals (Kleinert and Morton, 1962; Ranby *et al.*, 1969; Hon, 1983) and rearrangement reactions are also involved (Hon, 1987).

Characterisation of the so-called 'lignin–carbohydrate complexes' (LCC) and of associations between lignins and other polymers such as proteins and tannins, for example, is of paramount importance as regards the possible functions of lignin. The lignin fractions obtained by Bjorkman's or Pew's treatment of thoroughly milled lignocellulosic product, have been frequently used as sources of such complexes. Mild acid and/or alkaline procedures of cell wall fractionation have also been used with the aim of selectively cleaving non-resistant bonds (Morrisson, 1973; Stewart, 1973; Reis, 1981; Obst, 1982). Evidence for formation of stable C–C bonds between lignin and carbohydrate fragments has been reported under both strongly acidic and alkaline conditions (Gierer and Wannstrom, 1984). The purification procedures used for isolation of these complexes do not differ fundamentally from those used for lignin. Most involve permeation chromatography on hydrophobic gels in mixtures of water and organic solvents, according to methods extensively studied by Koshijima and coworkers (Azuma *et al.*, 1981; Takahashi *et al.*, 1982, 1988). Formation of molecular complexes between lignin and LCC has been reported by Yaku *et al.* (1979). After fractional precipitation of enzymatically degraded LCC followed by Hakamori's methylation, conventional CPG analysis of methylated sugars has indicated that alkali-stable linkages are present between lignin and polysaccharides (Azuma *et al.*, 1985b; Takahashi and Koshijima, 1987). Instead of Hakamori's strongly nucleophilic technique, a milder method of oxidative cleavage of LCC by action of 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone has been recently introduced to confirm the covalent nature of the lignin–polysaccharide association (Takahashi and Koshijima, 1988). Isolation and purification of LCC by electrophoresis, by successive extractions, and by liquid–liquid extraction in organic solvent mixtures have been described by Lindgreen (1958), Morck *et al.* (1988), Koshijima and Tanaka (1971), Lundquist *et al.* (1977) and Lundquist (1983).

VI. CHEMICAL METHODS OF CHARACTERISATION

Methods of chemical characterisation (chemical degradation, functional analysis and molecular weight determination) require degradation of the lignin network and analysis of mixtures of complex degradation products. During the last two decades, the introduction of high resolution chromatographic procedures coupled with selective detection systems has greatly enhanced the efficiency of these methods.

A. Chemical Degradation Methods

Chemical degradation of lignin is feasible by oxidative, reductive and acidic or alkaline solvolytic reactions. Degradation methods may involve direct or multistep procedures (Table 4.6). Browning (1967), Sarkanen and Ludwig (1971a), and particularly Adler (1977) have extensively reviewed some of these methods; only recent improvements and new methods are discussed here.

TABLE 4.6. Methods of lignin characterisation by chemical degradation.

Direct procedures (degradative depolymerisation in one main reaction step)	
Oxidation	· alkaline nitrobenzene · cupric oxide
Reduction	· rhodium on charcoal catalyst · copper arsenite catalyst · Raney nickel catalyst
Solvolysis	· acidolysis (dioxane, water, HCl) · thioacidolysis (dioxane, CH_3CH_2SH, BF_3) · nuclear exchange (phenol, BF_3)
Multistep procedures (chemical modification pre-treatment followed by degradative depolymerisation)	
Thioacetolysis (solvolysis and alkaline degradation)	
Permanganate hydrogen peroxide oxidation (alkaline degradation and oxidations)	
Ozonolysis (reduction, oxidation, saponification)	

1. *Oxidative methods*

Among the oxidative procedures, alkaline nitrobenzene and, to a lesser extent, cupric oxide oxidation, remain the standard methods. Both suffer the major limitation of degrading the phenylpropane chain of C_6–C_3 units into C_6–C_1 products and thus providing ambiguous results in the case of samples containing phenolic acids, proteins or suberin (Borg-Olivier and Monties, 1989). In brief, these procedures call for treatment of about 25–50 mg of lignin or a lignocellulose equivalent, with 0.2 to 2 N sodium hydroxide (1–10 ml) containing either nitrobenzene or cupric oxide, for 2 to 4 hours at 160–180°C in a glass or teflon-lined steel pressure vessel. After cooling, recovery of the solubilised fraction and acidification, the degradation products, mainly C_6–C_1 hydroxybenzaldehydes and acids (Table 4.2), are extracted in peroxide-free ethyl ether. Degradation yields are measured either directly after HPLC separation (Sharma

et al., 1986) or, after silylation, by gas chromatography on an open silicone column. A microscale nitrobenzene procedure (0.5–2 mg wood sample) has been adapted by Hardell *et al.* (1980b), who stressed that the precision in weighing is the main limitation of CPG-SM characterisation. In the case of cupric oxidation, a detailed microscale procedure has been reported by Hedges and Ertel (1982) who emphasised that a number of precautions have to be taken in both sample preparation and experimental techniques in order to avoid artifacts. As nitrobenzene oxidation produces by-products which can interfere with phenol analysis, cupric oxide oxidation has often been chosen for analysis of small quantities of lignin or as a depolymerisation procedure (Morohoshi and Glasser, 1979a). Cupric oxide oxidation has the disadvantage of producing relatively large quantities of C_6–C_2 ketonic phenols, in addition to the aldehydes and acids produced by nitrobenzene. A reversed phase HPLC procedure by gradient elution in methanol–water–acetic or phosphoric acid mixture, in combination with on-line UV-spectra recording with a diode array detector will separate these products (Scalbert *et al.*, 1985; Sharma *et al.*, 1986). Mechanisms of oxidative degradation have been studied with model compounds. Schultz and coworkers have recently shown that nitrobenzene and cupric oxidation proceed by a homolytic mechanism involving a benzylic alkyloxy radical rather than participation of the *para*-hydroxy group and formation of a methylenequinone as previously hypothesised (Schultz and Templeton, 1986; Fisher *et al.*, 1988; Dershem *et al.*, 1988). Such insight may help in improving the conditions of oxidative depolymerisation which remain still largely empirical. It may explain why there are differences between the syringyl-to-guaiacyl ratio obtained by oxidative degradation methods and by physical characterisation procedures such as NMR and IR spectroscopy (Sarkanen and Herghert, 1971; Tollier *et al.*, 1986; Manders, 1987).

2. *Reductive methods*

Greater attention has been given recently to lignin hydrogenolysis as a potential source of chemicals than as a procedure for lignin characterisation but this is not true of Pepper's and Sakakibara's extensive studies. Typical hydrogenolysis have been performed, by these authors, in dioxane–water mixtures under hydrogen pressure at 190–220°C with rhodium on charcoal and copper chromite catalyst respectively. With rhodium catalysts, only a portion of total *in situ* lignin has been amenable to reductive breakdown; several monomers and dimers have, however, been characterised (Sudo *et al.*, 1981). With copper catalyst, almost all lignin was dissolved within an hour, allowing low pressure preparative chromatographic fractionation of the monomeric and oligomeric products whose structures were elucidated by UV, IR, MS and NMR spectroscopy (Sakakibara *et al.*, 1980). In combination with dioxane–water solvolysis, hydrogenolysis is sufficiently quantitative to provide a structural model of softwood lignin (Sakakibara, 1980) as discussed previously (Table 4.4). A third method of reductive degradation has been recently suggested by Forss *et al.* (1987), in which wood meal is heated, at pH 7, in phosphate buffer for 4 h at 150°C in an autoclave in the presence of large quantities of freshly prepared Raney nickel without any addition of hydrogen gas. An almost quantitative depolymerisation of birch lignin has been reported with formation of polymeric ('glycolignin') and oligomeric ('hemilignin') fractions which require more elaborate characterisation.

3. *Solvolytic methods*

Solvolytic procedures have the major advantage of preserving the C_6–C_3 skeleton and thus providing an additional more specific criterion for the occurrence of lignin. In the case of acid solvolysis, 'acidolysis', depolymerisation occurs mainly by the breaking of arylalkyl–ether linkages with concomitant formation of characteristic substitution patterns of the propane chain in the C_6–C_3 products. In brief, the acidolysis procedure calls for refluxing of lignocellulosic products in organic solvents, mainly dioxane, with Bronsted or Lewis acids as catalysts for arylalkyl–ether linkage cleavage, solvent extraction of the fraction corresponding to uncondensed monomeric units. As pointed out by Bolker and Terashima (1966), lignin extraction depends especially upon the simultaneous presence in dioxane of both an acid catalyst and a solvolytic reagent such as water, alcohols or thiols. Refluxing of wood with dioxane–water (9:1; v/v) containing an equivalent of 0.2 M HCl, which has been termed 'acidolysis' (Peper *et al.*, 1959) produces numerous monomeric products (Lundquist, 1976; Adler, 1977). Quantitative characterisation of monomeric compounds from acidolysis of wood lignin has been performed on the corresponding trimethylsilyl derivatives by means of capillary gas chromatography on an open silicon-coated fused silica column coupled with mass spectrometry (Lapierre *et al.*, 1983; Westermark, 1985a). Silicon-packed stainless columns have also been used (Lundquist and Kirk, 1971; Pometto and Crawford, 1985), however, with poorer resolution. Irreversible condensation of lignin fragments (Adler, 1977; Argyropoulos and Bolker, 1987) and formation of a large number of products, at least 33 according to Lapierre *et al.* (1983), are the main disadvantages of acidolysis methods. The same limitation also applies to 'ethanolysis' and other alcoholysis procedures with formation of series of 'Hibbert ketones' (Hibbert, 1942; Brauns, 1952).

Treatment of wood with dioxane–ethanethiol (9:1; v/v) containing 0.2 N boron trifluoride etherate at 100°C for 4 h, which has been called 'thioacidolysis' (Lapierre *et al.*, 1984b), yields less complex mixtures of four uncondensed monomeric degradation products which are much more easily separated by chromatography. The yields from thioacidolysis are higher than for acidolysis and selective side reactions are greatly reduced (Lapierre *et al.*, 1985a; Rolando *et al.*, 1989). At present, the main limitation of thioacidolysis is the low yield of some α-substituted phenylpropane monomeric units such as α-carbonyl and α-acetic esters (Lapierre *et al.*, 1987a). Thioacidolysis has been used for lignin characterisation in some woods (Lapierre *et al.*, 1986; Tollier *et al.*, 1986), straws (Gaudillere and Monties, 1988) and industrial lignins (C. Lapierre and B. Monties, unpublished).

Taking advantage of the dealkylation of diphenylmethanes in the presence of boron trifluoride and excess phenol, Funuoka and Abe (1987) have developed a method for lignin degradation called phenyl nucleus exchange (NE). The NE procedure involves heating about 20–30 mg of lignin or lignocellulosic equivalent, in a mixture of phenol–xylene–boron trifluoride and phenol (19:10:3 to 4.5 volume ratio) at 180°C in a sealed tube followed by gas chromatographic determination of the silylated diphenylmethane products recovered from the reaction mixture by ethyl ether extraction. The NE method has been recently used for characterisation of industrial lignins (Chiang and Funuoka, 1989). A quantitative procedure for determining the monomeric composition of residual lignin during kraft delignification of gymnosperm (Chiang and Funuoka, 1988a) and of angiosperm (Chiang and Funuoka, 1988b) has also been reported. Since demethylation can occur and the free syringyl monomeric units are unstable the NE

reactions were carried out at both 180 and 110°C. Correction factors have to be applied to give absolute amounts of degradation products and reliable syringyl-to-guaiacyl ratios. However, if used for comparative purposes, the NE method appears competitive and actually complements the nitrobenzene oxidation procedure.

4. Multistep degradation procedures

Lignin degradation with thioacetic acid, 'thioacetolysis', was introduced by Nimz (1969) for fragmentation of lignin in oligomeric fragments and led to the first proposal of a structural scheme of angiosperm lignin (Nimz, 1974). Thioacetolysis combines acetolysis with thioacetic acid, alkaline hydrolysis of thioacetate and reductive elimination of sulphur; it has not yet been adapted to the routine characterisation of lignins.

Permanganate–hydrogen peroxide oxidation has been adapted to the degradation of lignin by Miksche and coworkers from the earlier fundamental work of Freudenberg (Freudenberg, 1968; Adler, 1977). In brief, the procedure calls for a preliminary depolymerisation step followed by methylation or ethylation to protect the aromatic units with free phenolic groups during permanganate oxidation. Notable amounts of monomeric and dimeric aromatic carboxylic acids, recovered after permanganate oxidation followed by hydrogen peroxide oxidation, are isolated by gas and gel permeation chromatography. Assuming that these products are representative of a given lignin preparation, the molecular structure can be computed from yields of oxidation products using 'theoretical' correction factors for degradation reactions during oxidation. The procedure described by Erickson *et al.* (1973b) and Miksche and Yasuda (1976), working with 25–50 mg samples, has been the subject of some minor modifications (Hardell *et al.*, 1980b; Hoffman *et al.*, 1985; Gellerstedt and Lindfors, 1984b). In a detailed study, Morohoshi and Glasser (1979a) have compared the effect of five preliminary depolymerisation procedures (sodium in liquid ammonia, thioglycolic and thioacetic acid degradations, nitrobenzene and cupric oxide oxidations) on the yield of the major degradation products. They suggested that, in the case of pine and alder MWL, the most suitable pre-treatment was cupric oxide oxidation for 5 h at 174°C. Several important parameters pertaining to quantitative evaluation, yield corrections and fractionation procedures have been critically evaluated (Morohoshi and Glasser, 1979b; Gellerstedt and Northey, 1989), suggesting some overestimations in the original procedure. Permanganate oxidation of ethylated wood has been also recently adapted by Garland *et al.* (1986) for the combined characterisation of lignin and tannins in woods.

Ozonolysis has been used by Nakano and coworkers for quantitative determination of bonding patterns of propanoid side chain structures in various lignins. Complete oxidation of lignin aromatic rings has been reported by Matsumoto *et al.* (1986) with formation of aliphatic esters whose stereochemistry has been used to characterise the ratio of the *erythro* to *threo* forms of arylglycerol-β-aryl ether structures in lignins. In brief, the procedure calls for a preliminary reduction of the lignin sample with $NaBH_4$ in order to increase the reactivity toward ozone, a degradation at 0°C by passing ozone (concentration about 3%) into an acetic acid–water–methanol solution, saponification of the aliphatic esters and CPG analysis of the fragments corresponding to the phenylpropane chain. The mechanism of the ozonolysis step in these reactions has been extensively analysed on model compounds (Kaneko *et al.*, 1983; Matsumoto *et al.*,

1984a). A milder ozonolysis procedure, under similar conditions but at −70°C, has also been reported by Tanahashi *et al.* (1975) for selective degradation of double bonds in phenylcoumarone structures of lignin. Aromatic rings are stable under these conditions; the procedure has been combined with acidolysis for characterisation of the condensed acidolysis residues which comprise about 50% of the original lignin sample.

B. Functional Group Analysis

During the last decade, advances in lignin functional group analysis have been mainly from the use of physical methods; only a few of the chemical methods, thoroughly described by Browning (1967), have been significantly improved in recent years.

Methoxyl group determination, according to Zeichel, has been adapted to microscale samples in the range of 0.1 to 10 mg. Analysis of methyl iodide is carried out by gas chromatography at 40°C on silicon column (Hardel *et al.*, 1980b; Girardin and Metche, 1983). Spurious results have been reported during methoxyl determination in the presence of trace amounts of dioxane in lignin (Kaneko *et al.*, 1981) and in the case of acetylated lignins (Obst and Ralph, 1983).

For determination of phenolic hydroxyl groups in lignins, a new rapid method has been developed by Manson (1983). In brief, the method calls for successive acetylation in an acetic anhydride–pyridine mixture, selective aminolysis of phenolic acetyl groups by pyrrolidine on 10 to 50 mg samples and determination of the resulting acetylpyrrolidine by gas chromatography; the procedure has been applied to wood and pulp samples (Gellerstedt and Lindfors, 1984b). A pyrolytic gas chromatographic procedure for phenolic hydroxyl group analysis in lignin has been developed by Whiting and Goring (1982a). The procedure requires special care for the sampling and pyrolysis conditions in order to obtain reproducible results and furthermore assumes that the pyrolytic constants of monomeric aromatic compounds are the same, a hypothesis which is validated by the experimental results.

A potentiometric titration method for acidic functions in lignin has been elaborated by Pobiner (1983). The procedure calls for the improved detection of inflection points in non-aqueous titration by using *p*-hydroxybenzoic acid as the internal standard in combination with an automatic titrator; the procedure has been used by Scalbert and Monties (1986b) for characterisation of phenolic acids associated with wheat lignin fractions.

C. Molecular Weight Determinations

Molecular weight determinations require lignin solubilisation. This rupture of the insoluble lignin network under rather severe conditions may cause major structural changes, making difficult the assignment of the structure of the *in situ* lignin. Gel permeation data have, however, pointed to a certain regularity in cross-linking between primary chains with an average distribution of the degree of polymerisation (Bolker and Brenner, 1970; Yan and Johnson, 1980; Yan, 1981) and bimodal distributions (Wayman and Obiaga, 1974; Garver and Sarkanen, 1986) of solubilised lignin fraction. These data, which agree with the Freudenberg model predictions of 'resistant clusters glued together by randomly distributed weak bonds' (Freudenberg, 1968), confirm the importance of molecular weight studies, even for *in situ* lignin characterisation.

Methods for estimating molecular weights can be classified as 'relative' and 'absolute' in the sense that molecular weights obtained from absolute methods do not depend on separate calibration (Goring, 1971; Wagner, *et al.*, 1986). The absolute methods, based on thermodynamic values such as vapour pressure osmometry, ultracentrifuge sedimentation equilibrium or light scattering methods, in most cases require extensive instrumentation and skilled experimentation not readily available and thus are rather infrequently used. Ultracentrifuge equilibrium, one of the most reliable methods, has been developed and discussed by Goring (1971), Wayman and Obiaga (1974), Pla and Robert (1984), Wagner *et al.* (1986) and Garver and Sarkanen (1986). Characterisations have been made on paucidisperse fractions, recovered after preliminary gel fractionation, either in an organic solvent or in aqueous NaOH solution in order to get both a complete solubilisation of the fractions and a dissociation of ionic molecular complexes. Detailed experimental procedures and particularly automated weight average calculations have seldom been thoroughly described. Vapour pressure osmometry is a very convenient method for determining average molecular weight (M_n) in the range of 100 to 10 000, in spite of some experimental difficulties, such as the purity of both solvent and lignin, the response time and control of the drop size, which have been critically discussed by Pla (1989). Vapour pressure osmometry has been more frequently used than the other absolute methods of lignin M_n determination such as membrane osmometry, ebulliometry or cryoscopy. Light scattering, which affords the determination of weight average molecular weight (M_w) and other important molecular shape parameters such as gyration radius, has been used as early as 1960 by Goring and coworkers. These authors stress difficulties related to the sensitivity of measurement of colloidal debris in solution and optical properties of lignin such as strong absorbance and fluorescence (Goring, 1971). Lack of adaptation of classical light scattering photometers to lignin characterisation has been mainly related to their low sensitivity. According to Pla (1989), these problems have been overcome by use of laser sources, particularly, use of low-angle laser light scattering (LALL) equipment which allows an overall accuracy of about 5% for average M_w determination after fluorescence, absorption and optical anisotropy have been carefully corrected for. For further details, see Pla *et al.* (1977) and Pla (1989).

Among the 'relative' methods, intrinsic viscosity determinations are still applied but the most rapid development has been with gel filtration procedures. Difficulties in interpreting intrinsic viscosity data in the case of cross-linked polymers such as lignin, have been carefully discussed by Goring (1971). Viscosity measurements have been successfully combined by Pla and Robert (1974, 1984) with light scattering and ultracentrifugation analysis in concordant determinations of the degree of branching of lignin fractions. Gel filtration is a deceptively simple procedure for molecular fractionation according to effective molecular size as opposed to molecular weight. In brief, the procedure calls for passing a solution of macromolecules through a column of solvent-filled gel. As macromolecules can diffuse in varying proportions according to their size into the porous volume of the column, the elution volume of any fraction is ideally a function of the dimensions of the pore in the gel and of the size of the macromolecules. The technique is thus more appropriately called 'size exclusion chromatogaphy' (SEC) than 'gel filtration' or 'gel permeation' which are currently used.

SEC fractionation of lignin has been reported at low pressure (LP) in organic and aqueous media using a large number of silica, polystyrene and dextran gels (Connors,

1978; Connors *et al.*, 1978; Plastre, 1983; Lapierre, 1986; Wagner *et al.*, 1986). LPSEC is relatively simple and easy to use, requiring low-cost apparatus but has two main disadvantages: low resolution and long duration. High performance SEC (HPSEC) has thus rapidly developed using high pressure pumping systems and higher performance, stable, homogeneous gels. Detailed experimental procedures have been carefully described, e.g. by Faix *et al.* (1980), Himmel *et al.* (1983) and Chum *et al.* (1987), showing the significant advantages of HPSEC in terms of resolution and speed of analysis. However, some shortcomings, such as the long-term stability of the gels, as discussed by Connors *et al.* (1980), Sarkanen *et al.* (1981) and Garver and Sarkanen (1986), have still to be overcome. Occurrence of such associative interactions has been inferred from changes in elution pattern as a function of chromatographic conditions according to gel type or solvent composition. Even if the occurrence of such associative interactions between lignin fractions is undeniable, circumspection must be used in the interpretation of such phenomena as specific interactions between solvent and gel may also change the elution pattern solely by gel saturation (Plastre *et al.*, 1982). Silylation and much more frequently acetylation have been used to prevent such adsorption and intermolecular effects. Such derivatisation procedures require both quantitative functionalisation and recovery of the sample (Pellinen and Salkinoja-Sallonen, 1985; Chum *et al.*, 1985, 1987). Furthermore, quantitative dissolution of lignin samples remains a major problem which can be often solved, according to Froment, by swelling in formic acid (5 mg of lignin sample in 0.1 ml of formic acid left overnight at ambient temperature) (Plastre *et al.*, 1982; Scalbert and Monties, 1986b). As UV absorbance measurement between 250 and 280 nm remains the most frequently used detection procedure, differences in absorption among lignin samples is another important, and frequently underestimated, drawback (Wagner *et al.*, 1986). It is very likely that the use of high resolution detection systems such as a diode array ultraviolet detector (DAUD) will contribute to solving this problem. Large differences in total UV spectra of lignin fractions have been already reported by Nicholson *et al.* (1984) and Monties (1988) using SEC-coupled DAUD detection. Linearity testing of these detectors is required in all cases (Pfeiffer *et al.*, 1983). Coupling SEC with low-angle laser light scattering (LALLS) seems a more promising method for molecular size characterisation of lignin fractions. Reliable M_w values have been obtained by LALLS which offers the advantage of providing absolute values of the light-scattering properties of lignin (Rayleigh factor) by direct comparison of the scattered and transmitted light, a procedure reported by Froment and Pla (1989).

VII. PHYSICAL METHODS OF CHARACTERISATION

Most of the physical methods have the potential advantage of being applied to solid samples and thus provide a means of studying lignin *in situ* which cannot be achieved by chemical methods. Furthermore, progress in computerised acquisition and treatment of data has significantly increased the sensitivity and the resolution of the classical physical methods such as infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectroscopy. Development of sophisticated technology such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), sometimes in combination with isotopic labelling, has provided significant insight into both the biochemistry and the biodegradation of lignin (Higuchi, 1986).

A. Tracer Techniques and Isotopic Labelling

Since the review of Neish (1964) on isotopic labelling of lignin and related compounds, only experimental modifications have been introduced to the procedure of feeding labelled compounds to plants. The main techniques employed are infusion of a cut surface by transpiration, absorption into intact roots still attached to the plant, and introduction through a wound into the cambium of detached or attached stem (Crawford and Crawford, 1978; Abbott *et al.*, 1986a; Fujita and Harada, 1978, 1979). Carbon-14 and tritium tracers have been preferentially used in biosynthetic and biodegradation studies, for chemical and cytological studies by radioautography (Saleh *et al.*, 1967; Fujita and Harada, 1979; Terashima *et al.*, 1986b). In the case of structural and biodegradation studies, carbon-13 and oxygen-18 labelled dehydropolymers and dimers have been synthesised (Gagnaire and Robert, 1977; Gagnaire *et al.*, 1979; Ellwardt *et al.*, 1981; Umezawa and Higuchi, 1985, 1986). A procedure for carbon-13 enrichment of lignin by photosynthesis of poplar cuttings under $^{13}CO_2$ enriched air has been also reported (Lapierre *et al.*, 1988). The precursors suitable for specific *in situ* labelling of lignin in living plants are L-phenylalanine (tyrosine in the case of grasses) *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids; coniferyl and sinapyl alcohol and their corresponding glucoside, coniferin and sinapin (Higuchi *et al.*, 1967; Saleh *et al.*, 1967; Fujita and Harada, 1979; Terashima *et al.*, 1986a,b). With the exception of [^{3}H]- and [^{14}C]-phenylalanine and tyrosine, which are commercially available, these precursors are synthesised by standard procedures. Double labelling with ^{3}H and ^{14}C has been extensively used by Terashima (1988) and by Terashima and Fukushima (1988a,b). Experimental details for the synthesis of precursors and autohistoradiographic studies of lignification of hardwood (*Magnolia* sp.) have been reported by these authors. Corresponding information for softwood (*Cryptomeria* sp.) has been reported by Fujita and Harada (1979), Takabe *et al.* (1985) and Takabe *et al.* (1988). Even when detailed procedures for *in vivo* isotopic labelling have been described, it should be stressed that labelling conditions have seldom been optimised. Properties of the labelled lignin sample may thus depend on the experimental procedure. For example, changes in monomeric composition and lignin reactivity have been related to photoperiod conditions during labelling (Grand *et al.*, 1979; Phelan *et al.*, 1979; Terashima *et al.*, 1986a; Terashima, 1988). Furthermore differences in uptake, translocation or cell metabolism have been reported after feeding with phenylalanine, *p*-hydroxybenzoic, cinnamic and ferulic acids by Shann and Blum (1987a,b), Barnes and Friend (1975), Fujita and Harada (1979) and Benner *et al.* (1984). Finally, solubilisation of relatively large proportions of labelled lignin fractions have been repeatedly observed either after acid prehydrolysis and Klason determination (Crawford and Crawford, 1976; Hatakka and Uusi-Rauva, 1983; Aumen *et al.*, 1983; Wilson, 1985; Monties *et al.*, 1987), or alkaline pre-treatment and nitrobenzene oxidation (Alibert and Boudet, 1979; Abbott and Bagby, 1986). This is due to the formation of a newly formed, less polymerised lignin which may be progressively glued to the pre-formed and unlabelled lignin (Higuchi *et al.*, 1967; Alibert and Boudet, 1979; Odier *et al.*, 1981).

B. Spectroscopic Methods

Valuable information may be obtained about the molecular structure of lignins by

detailed examination of their ultraviolet (UV), infrared (IR), magnetic resonance (MR) and mass (MS) spectra. These methods require calibration with lignin fractions and/or models which are limited in number and have to be recalculated for analysis of other types of lignin. Invariably, it is necessary to correlate the information so gained with that from complementary methods. However, the general computerisation of apparatus, the ability to store data for later manipulation, the dramatic 10- to 100-fold increase in sensitivity of IR and MR spectrometers by Fourier transform (Becker and Farrar, 1972), and the extension of the mass range of mass spectrometers by almost an order of magnitude in the past decade (Cooks *et al.*, 1983) have meant that very significant advances have been made.

1. Optical methods: ultraviolet and infrared

Due to its aromatic nature, lignin exhibits characteristic absorption maxima in the near ultraviolet between 200 and about 400 nm, with significant differences in absorbancy according to the substitution pattern (Musha and Goring, 1975). Several methods for the spectrophotometric determination of lignin have been developed based on the difference in absorbance between lignin and polysaccharides. Possible interference with other UV-absorbing compounds has been thoroughly discussed. Correcting procedures using concentration calculations at several wavelengths have been reported (Goldschmid, 1971) but suffer uncertainties in absorption coefficient determination. The absorptions of several lignin preparations and model compounds have been recently compiled by Lin (1982) and by Fengel and Wegener (1984). Such data have only relative value, since repeated analysis of wood samples have shown an apparent increase in lignin content indicating the formation of chromophores during the mechanical procedure of isolation (Hardell *et al.*, 1980a). Due to the large width of adjacent component bands, the UV spectrum of lignin is often poorly resolved. Absorption bands have been resolved into Gaussian transition energy bands, leading to the characterisation of special chromophores such as stilbenes (Lin and Teder, 1976a,b). In spite of these limitations, UV spectroscopy is widely used due to its simplicity, reliability and high sensitivity. Bobier *et al.* (1981) have confirmed that ultraviolet analysis is a reliable indicator of the rate of delignification, since a linear regression with a correlation coefficient of 0.96 was observed between UV absorbance at 205 nm and lignin removed. The reliability of UV determination of lignin on solid samples suspended in potassium bromide pellets (Bolker and Sommerville, 1962) has been confirmed by Saka *et al.* (1982) and by Whiting *et al.* (1981). By comparison with a micro-Klason technique with a reproducibility within $\pm 2\%$ for 1–10 mg of sample, these authors have shown that UV lignin determination, either in solid state or after acetylbromide dissolution, provides a fast and sensitive procedure for measurement of lignin content in very small samples (0.1–1 mg of tissue per KBr pellet) with a reproducibility of within ± 1–2%.

Using 1–2 mg of sample in a KBr pellet, Whiting *et al.* (1981) have also reported a reproducibility within $\pm 1.5\%$ for lignin determination by IR absorbance measurement at 1510 cm^{-1}, confirming the general convenience of spectroscopic methods for lignin determination. Compared to UV spectra, IR spectra of lignin have the advantage of possessing a large number of bands between 3500 and 700 cm^{-1}. Structural assignment of at least 25 bands has been reported in Hergert's (1971) review on the basis of

empirical identification, using simple monomeric and dimeric model compounds. As stressed by Hergert, both correct assignment and integration are difficult, since peaks may actually be due to the superposition of several overlapping bands.

Quantitative procedures have been based on the use of selected lignin peaks as internal standards either by direct measurement of peaks close to 1500 cm^{-1} (Koelbe and Ellefsen, 1962; Whiting *et al.*, 1981) or after correction for contamination and calculation according to Beer's law (Sarkanen *et al.*, 1967; Zavarin *et al.*, 1982; Lapierre, 1986). A major disadvantage is that IR light is scattered by lignin particles in the KBr pellet, resulting in a sloping baseline which is influenced by sample preparation and by instrumental procedure. Multiple reflectance procedures, in which small amounts of sample are mixed in large amounts of high reflectance material such as KBr (1:19; sample-to-KCl ratio: Berben *et al.*, 1987), have been suggested for levelling the baseline. Another advantage of these techniques is that samples are easier to prepare. Combining Fourier transform measurement with the so-called 'attenuated total reflectance' (ATR) or 'diffuse reflectance' (DR) techniques, lignin structure has been qualitatively and quantitatively analysed by Faix (1986, 1988), Faix *et al.* (1987), Schultz and Glasser (1986), Berben *et al.* (1987), Byler (1987) and Michell (1988). Multiple regression analyses have been performed between peak intensities and lignin structural features such as monomeric composition, methoxyl, phenolic or aromatic hydrogen content or with 'hydrolysis' and 'condensation' ratios. High regression coefficient and corresponding low standard deviation have been reported (Faix, 1986; Schultz and Glasser, 1986), indicating that structural data can be calculated from IR spectra. However, such empirical techniques are limited by the properties of the lignin sample chosen as the reference. Relative comparisons are still possible for unique samples submitted to specific treatments (Chum *et al.*, 1984). Diffuse reflexion procedures are applicable to the solid state analysis of lignocellulosic polymers (Abbott *et al.*, 1988), to dilute alkaline aqueous solutions of lignosulphonate (Faix *et al.*, 1987) and to on-line FT-IR spectroscopic detection of HPLC column eluates (Vidrine, 1979). Furthermore, as in the case of UV spectra (Lin, 1982), possibilities of resolution enhancement of IR spectra by second-derivative spectroscopy has been strikingly demonstrated in the case of near infrared reflectance spectroscopy (Coleman *et al.*, 1982). For example, the typical lignin IR band near 1610 cm^{-1} has been resolved into two peaks characteristic of syringyl and guaiacyl units, respectively (Byler, 1987).

Photoacoustic detection has been recently coupled with FT-IR to study lignin changes during the brightening of mechanical pulp (St.-Germain and Gray, 1987). Reproducibility of better than 5% has been reported by these authors after internal calibration against three standard peaks (3400, 1510 and 1056 cm^{-1}) but structural changes in lignin structure have been only tentatively interpreted. As in the case of UV photoacoustic studies (Gould, 1982), interaction between closely spaced chromophores may complicate the interpretation of spectra mainly assigned on the basis of isolated model compounds.

Raman spectroscopy has been used by Atalla in extensive studies of lignin orientation in native wood. Raman spectra have been interpreted by comparison with model compounds where bands at 1600 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} have been assigned (Atalla and Agarwal, 1985; Agarwal and Atalla, 1986; Atalla, 1987). Examination of cell wall regions as small as one micrometre in diameter has been achieved through combination of a Raman spectrometer, a modified microscope and a data handling system (Agarwal

and Atalla, 1986). Measuring the effect of the polarisation of an argon ion laser on the intensity of the 1600 cm^{-1} band, in the secondary wall of *Picea* wood, these authors reported that the aromatic rings of the phenylpropane units in lignin were preferentially oriented with respect to the plane of the cell wall and that lignin is more highly organised at the molecular level than previously recognised. Application of this sophisticated methodology to other tissue is required to confirm these conclusions.

Few data have been published on fluorescence and phosphorescence properties of lignin preparation and lignin-related products. Fluorescence properties of about 30 model compounds and lignin fractions have been reported by Lundquist *et al.* (1978) indicating that, in a dioxane–water (1:1) mixture, lignins behave as molecules containing one single 'energy sink' chromophore from which fluorescence light was then emitted. Phosphorescence spectra of several lignin preparations have been briefly reported by Weichelt and Ziechmann (1977). Differences between emission spectra have been found in relation to isolation procedures (Ziechmann and Weichelt, 1977). No direct relationships between the structure of the lignin chromophore and variations in luminescence properties of corresponding lignin preparations have been suggested (Weichelt, 1977).

2. *Magnetic resonance methods*

During the last two decades, very rapid progress has been made in magnetic resonance methods in both the instrumentation, with the introduction of high magnetic fields and computerised FT spectrometers, and the theory, with the development of one-dimension (1D) and two-dimension (2D) pulse sequences (Schilling, 1985). Early NMR data on lignin were obtained with proton NMR mainly due to the high sensitivity of the proton nucleus. However, recent advances in FT-NMR have led to very rapid development of carbon-13 NMR spectroscopy. In spite of the low natural abundance of ^{13}C, carbon-13 has the main advantage of characterising the carbon skeleton without the complication of spin–spin coupling on a chemical shift range of about 250 ppm in comparison to only about 15 ppm for proton NMR. The main disadvantages of carbon-13 NMR are its low resolution for highly polymerised lignin fractions and the difficulties in qualitative assignment of signals due to extensive overlap of signals for nuclei in a similar environment. There has been a failure to obtain a linear correlation between signal intensity and the number of corresponding carbon atoms and this has led to the use of specific pulse sequences.

Following the extensive review of Ludwig (1971) which covers the rapid development of proton NMR between 1958 and 1971, more detailed interpretations of lignin spectra have been obtained using higher frequency instruments. Based on acetylated lignin model compounds, dissolved in deuteriated chloroform, Ludwig (1971) has defined the chemical shifts for protons of carboxyl and aldehydic groups, in aromatic rings, at acetylated α-carbon atoms, at α-carbon atoms in α-O-4 and β,5 linkages, at side chain carbon atoms, in aromatic methoxyls, in β-β and β-1 dimers, in aliphatic acetoxyl and other highly shielded positions. Using a 270 MHz instrument and a large number of acetylated model lignin compounds, assignments of peaks corresponding to several structural units such as formyl groups, β-β′, β-1′, and β-O-4′ linkages have been reported using either acetylated or unacetylated spruce and birch lignin fractions (Lundquist and Olsson, 1977; Lundquist, 1979a,b, 1980, 1981, 1983.) Proton NMR

spectra of cinnamaldehyde type model structures have also been reported and characterised by semiempirical molecular orbital calculation procedures (Liptaj *et al.*, 1980). The distribution of *erythro* and *threo* forms of β-O-4′ structure in spruce and birch lignin have also been studied by proton NMR analysis, with reference to 11 lignin model compounds and after complete methylation and acetylation (Hauteville *et al.*, 1986). Similar amounts of *erythro* and *threo* forms were found in spruce while *erythro* forms dominated in birch lignin. Higher *erythro*-to-*threo* ratios have also been reported in syringyl-rich lignin fractions from six angiosperm woods by Tollier *et al.* (1986), suggesting a higher proportion of *erythro* isomers in syringyl lignins. The overwhelming importance of the *erythro* β-O-4′ syringyl ether type in beech lignin has also been deduced from carbon-13 NMR spectroscopy (Nimz *et al.*, 1984).

Since the first carbon-13 NMR spectra were published in 1973 by Ludemann and Nimz using a 25.2 MHz spectrometer, the number of peaks assigned in lignin carbon-13 NMR spectra have more than doubled. No less than 70 peaks have been assigned in the case of MWL lignin isolated from hardwoods (maple, beech, oak and cherry), grasses (bamboo, corn and wheat) and softwood (larch) (Nimz *et al.*, 1981) but also in the case of industrial lignin fractions such as kraft lignin (Morck and Kringstadt, 1985). Due to high resolution, carbon-13 NMR spectroscopy has also been used to infer the presence of lignin in moss (*Sphagnum* sp.) (Nimz and Tutschek, 1977) and in cork extracts (Zimmerman *et al.*, 1985). Differences in monomeric composition of lignin fractions have also been studied in hardwood cell wall components (Obst and Ralph, 1983) and in lignin fractions isolated from the same type of wood (Lapierre, 1986; Tollier *et al.*, 1986). More interestingly, such differences have been found in different *Salix* hybrids (Deka *et al.*, 1989).

In spite of the progress that has been made, unambiguous interpretation of some regions in lignin spectra is still not possible. This is partly due to the empirical assignment of peaks by comparison with monomers and dimers and to earlier assignments of compounds of similar structure. Recently, however, some substituent effects have been elucidated on generalised chemical shift additivity rules which can be applied to both substructures of guaiacyl and syringyl types (Hassi *et al.*, 1987). As discussed previously, carbon-13 labelling has also been used to verify signal assignments. Carbon-13 NMR spectroscopy, however, has so far failed to resolve the question as to whether non-cyclic alkyl ether bonds occur in lignin (Nimz, 1981; Leary *et al.*, 1983; Nimz *et al.*, 1984). However, the increased use of resolution enhancement procedure such as heteronuclear spin decoupling attached proton test (Landucci, 1984), spin echo techniques (Lapierre *et al.*, 1984b; Bardet *et al.*, 1985; Petsom and Steelink, 1988) and 2D correlation analysis (Nimz *et al.*, 1984; Lapierre *et al.*, 1987; Ede *et al.*, 1987; Ralph, 1988; Robert and Chen, 1988) may help to solve these problems. The tremendous potential for extracting specific information about lignins has been clearly demonstrated by Landucci in 2D carbon–proton correlation analysis of willow clone MWL (Deka *et al.*, 1989). While no signal was detected in the conventional proton spectrum because of the relatively low concentration, strong 2D correlation was observed for *p*-hydroxybenzoate and pinoresinol at 131 and 55.4 ppm, respectively, on the carbon axis. The major drawback of such a method, which requires no carbon-13 enrichment, is the long acquisition time (2–3 days for a 200 mg acetylated sample in a 8–9% solution in d_6–acetone). In this respect magnetic resonance spectra of other atoms such as silicon-29 (Brezny and Schraml, 1987; Brezny et al., 1985) or fluorine-19 (Ralph

and Wilkins, 1985), introduced by organic substitution on the lignin carbon skeleton, may also be useful.

After accurate peak assignment, quantitative characterisation is the second priority in carbon-13 NMR characterisation of lignin (Robert and Gagnaire, 1981; Nimz *et al.*, 1982; Robert and Brunow, 1984). Many of the requirements to be met have been thoroughly discussed by Landucci (1985) who described a method with the precision of within $\pm 3\%$ for large samples (700 mg) in 6 h runs and for small samples (70 mg), a precision of 10% which requires 22 h. Under routine conditions, quantitative comparison of selected peak clusters has been reported, with area measurement over a limited number of peaks, in the case of syringyl-to-guaiacyl ratio measurement (Lapierre *et al.*, 1985a; Morck *et al.*, 1986).

The difficulties in completely solubilising lignin fractions and lignin-containing products have made the application of solid state carbon-13 NMR spectroscopy very promising. The combined use of dipolar decoupling, cross-polarisation (CP) and magic angle spinning (MAS) yields carbon-13 spectra of solid polymers with resolution approaching that obtained in solution (Yannoni, 1982). In the case of lignins, solid state carbon-13 NMR spectra have broader lines, with much overlap and peak assignments are more complex than in typical high resolution carbon-13 NMR spectroscopy. Peaks have been identified with reference to chemical shifts in solution assuming that solid packing does not account for more than 2 or 3 ppm shift in most instances (Bartuska *et al.*, 1980; Maciel *et al.*, 1981; Hatfield *et al.*, 1987a). CP/MAS carbon-13 NMR analyses of lignin preparations have largely confirmed results obtained initially from degradative studies (Manders, 1987; Akin *et al.*, 1986; Haw *et al.*, 1984; Haw and Schultz, 1985; Schaefer *et al.*, 1981; Barron *et al.*, 1985). In studying variations in relative lignin contents between whole spruce wood and five morphologically cell wall fractions, Leary *et al.* (1986a) adapted the quantitative procedure of CP/MAS NMR developed initially be Hemingson and Newman (1985) by use of carbon-13 spin-locking pulse sequences which, preferentially, suppress signals from protonated carbon atoms leading to resolution enhancement. Using 0.3 g samples, a very good correlation has been found between CP/MAS NMR and Klason lignin determinations.

Recent developments in CP/MAS carbon-13 NMR have furthermore allowed new, 'second generation', solid state techniques which provide information on molecular motion and relaxation of *in situ* lignin (Hatcher, 1987). Dipolar dephasing experiments have been used by this author to confirm the correct assignment of specific signals to structural types. Carbon-13 specific enrichment of dehydropolymers has been also used for such verification by Lewis *et al.* (1987). Furthermore CP/MAS carbon-13 NMR has been used to examine the relaxation profile of lignin in solid state by measurement of proton spin lattice relaxation times (T_{1H}). Combining this technique with the use of a paramagnetic relaxation agent, such as Fe^{3+}, Gerasimowicz *et al.* (1984) have reported that carbohydrates appear to communicate paramagnetic relaxation to the lignin component of wood pulp. For the first time, such data corroborate, in the solid state, the possible occurrence of lignin–polysaccharide associations. Likewise recondensation of lignin during steam explosion of wood has been reported, based on variations in lignin molecular mobility monitored by changes in T_{1H} (Tekely and Vignon, 1987). Experiments in 2D FT solid state carbon-13 NMR have been designed by Hatfield *et al.* (1987b) to study anisotropy in lignin distribution over macroscopic samples of wood of about 0.9 cm^3 using a home built spectrometer. No net molecular orientational order

of lignin has been found under these conditions; however, this does not preclude such occurrence on a microscopic level, as suggested by Raman spectroscopic analysis. Marked effects of sample preparation have also been reported during CP/MAS carbon-13 NMR investigations (Taylor *et al.*, 1983; Sterk *et al.*, 1987), but the method is a very promising one for *in situ* lignin characterisation.

Electron spin resonance spectroscopy (ESR) has shown the presence of very stable free radicals in lignin preparations (Steelink, 1964, 1966, 1972). ESR measurements have been recently applied by Kersten *et al.* (1985) and by Odier *et al.* (1988) for the characterisation of phenoxy radicals from monomeric lignin model compounds.

3. *Mass spectrometry*

In principle, mass spectrometry is a destructive analytical procedure in which substances under investigation are identified by analysis of their molecular and fragment ions after initial vaporisation and ionisation processes under high vacuum. Molecular characterisation of lignin by MS was attempted initially by indirect analysis of fragments recovered after preliminary chemical or physical degradative procedures and, more recently, by direct analysis of fragments generated directly from lignin samples by pyrolytic degradation. Such pyrolysis mass spectrometry (Py-MS) has the main advantage of delivering monomeric and dimeric lignin fragments without large secondary oxidative changes (Haider and Schulten, 1985). Both the standard electron impact ionisation (EI) procedure at 70 eV which is reproducible enough to allow the compilation of data on a routine basis, and other mild ionisation procedures such as chemical ionisation, fast atom bombardment and other desorption ionisation procedures have been used (Cooks *et al.*, 1983; Schulten, 1984). Py-MS can be used directly on lignocellulosic microsamples, in combination with high resolution glass capillary gas chromatography (Py-GCCC-MS). This allows sophisticated fingerprinting strategies of 2D data resolution as a function of time and of mass range as shown in the case of straw and pine Brauns lignin (Schulten, 1984; Haider and Schulten, 1985), and, in the case of subcellular microsamples of grass cell walls (Boon, 1989).

Due to the very high structural similarity among lignin fragments recovered after chemical degradation such as acidolysis (Higuchi *et al.*, 1972; Lapierre *et al.*, 1983) or after industrial processes such as hydrothermal degradation (Pecina *et al.*, 1986) and pulping (Lowendahl *et al.*, 1978; Seefeldt and Dimmel, 1983; Niemela, 1988a,b), only GC on thick silicone-coated fused silica capillary columns, 25–50 m long, have allowed enough resolution for unambiguous acquisition of MS data. The procedure requires careful derivatisation, mainly silylation, of purified phenolic fractions (Lapierre *et al.*, 1983; Pecina *et al.*, 1986). Standard 70 eV EI-MS data obtained under similar conditions have been also reported for simpler compounds such as phenolic acids (Matsumoto and Hanya, 1980). Due to their higher molecular mass and their lower thermal stability, MS studies of dimeric lignin fragments and model compounds have required special experimental procedures. The direct inlet technique has been extensively used for analysis of fragmentation mechanisms and thermolytic behaviour of homologous series of di-, tri- and tetrameric lignin model compounds (Kovačik *et al.*, 1980; Brežný and Mihálov, 1984). The same procedure has been also used for characterisation of phenylcoumaran type products isolated, for example, during microbial degradation of lignin (Ohta *et al.*, 1979) and hydrogenolytic degradation of lignin (Sakakibara, 1977).

As early as 1976, GC-MS was introduced for MS identification of trimethylsilylated ethers of 12 separated lignans. Short glass columns are preferred to open tubular glass capillary columns because of high temperature requirements of the latter (Ekman, 1976). Later, MS characterisation of lignans (Fotsis *et al.*, 1982) and of dimeric lignin model compounds were described (Enoki *et al.*, 1980; Odier and Rolando, 1985) using short column fractionation procedures on silylated derivatives.

In the case of Py-MS, field ionisation (FI) procedures have been used for microanalysis of samples of about 100–200 μg thermally degraded directly in the field ion source of a double mass spectrometer (Schulten, 1984; Haider and Schulten, 1985). This 'direct inlet' type procedure has been applied comparatively to coniferyl alcohol dehydro polymers as lignin model compounds and to wheat and pine lignin fractions. Time-resolved Py-MS spectra have indicated the successive formation of a very large number of lignin fragments, and particularly of several dimers, whose occurrence requires confirmation. Furthermore, Py-GC-MS has been recently adapted to photoionisation (PI) by means of a vacuum–UV light source as an alternative to the low energy (10–16 eV) EI, with the aim of enhancing the quality of the MS fingerprint by reducing the fragmentation compared to the EI procedures. A Py-GC-Pi-MS instrument has been developed with an internally heated Curie point pyrolysis unit and a windowless photoionisation chamber with argon and krypton as discharge gases. The procedure has been applied to beech milled-wood lignin (Genuit *et al.*, 1987) with the identification of about 40 monomeric lignin fragments. Comparison of the chromatograms has shown large differences between the response according to the photoionisation and electron impact procedures. Futhermore, in the case of fingerprint analysis, more than one compound contributed to almost every nominal mass peak. Even if identification of the individual pyrolysate components has to be done with reference to pure products, both Py-FI-MS and Py-GC-MS have rapidly provided valuable chemical information. It would appear that Py-MS, in combination with the far less sensitive carbon-13 solid state NMR, will afford in the future very powerful procedures for biochemical studies of *in situ* lignin structure.

VIII. CONCLUSION

During the last two decades very significant advances have been made in the biochemical understanding of lignin with the progressive recognition of the molecular heterogeneity of lignins and of the variety of lignification processes among species, tissue and cellular and subcellular fractions.

Such advances, impeded by the characteristic insolubility of the irregular lignin networks, have been made possible by combined use of independent analytical methods. These ultrastructural studies, such as SEM-EDXA and autohistoradiography, and solid state characterisation, could gain much greater importance in the near future. Paraphrasing a recommendation of Goring (1971) concerning the necessity for chemists to look at lignin at the polymeric level, one can stress the need to combine more solid state studies of tissue and subcellular fractions with standard cytochemical, chemical and physical methods for the biochemical characterisation of lignin.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Dr C. Lapierre for critical suggestions and Dr C. Herve Du Penhoat for linguistic revision of this manuscript.

REFERENCES

Abbott, T. P. and Bagby, M. O. (1986). *J. Wood Chem. Technol.* **6**, 487–494.
Abbott, T. P., James, C. and Bagby, M. O. (1986). *J. Wood Chem. Technol.* **6**, 473–486.
Abbott, T. P., Palmer, D. M., Gordon, S. H. and Bagby, M. O. (1988). *J. Wood Chem. Technol.* **8**, 1–28.
Adler, E. (1977). *Wood Sci. Technol.* **11**, 169–218.
Adler, E. Bjorqkvist, K. J., and Haggroth, S. (1948). *Acta Chem. Scand.* **2**, 93–94.
Agarwal, U. P. and Atalla, R. H. (1986). *Planta* **169**, 325–332.
Aist, J. R. and Israel, H. W. (1986). *Can. J. Bot.* **64**, 273–275.
Akin, D. E., Hanna, W. W., Himmelsbach, D. S. and Windham, W. R. (1986). *Agron. J.* **78**, 832–837.
Alibert, G. and Boudet, A. (1979). *Physiol. Veget.* **17**, 75–82.
Argyropoulos, D. S. and Bolker, H. (1987). *J. Wood Chem. Technol.* **7**, 1–23.
Asada, Y., Ohguchi, T. and Matsumoto, I. (1975). *Rev. Plant. Protec. Res.* **8**, 104–113.
Atalla, R. H. (1987). *J. Wood Chem. Technol.* **7**, 115–131.
Atalla, R. H. and Agarwal, U. P. (1985). *Science* **227**, 636–638.
Atlan, H. (1974). *J. Theoret. Biol.* **45**, 295–304.
Atsushi, K., Asuma, J. I. and Koshijima, T. (1984). *Holzforschung* **38**, 141–149.
Aulin-Erdtman, G. and Hegbom, L. (1957). *Svensk Papperstidn.* **60**, 671–681.
Aumen, N. G., Bottomley, P. J., Ward, G. M. and Gregory, S. W. (1983). *Appl. Env. Microbiol.* **46**, 1409–1416.
Azuma, J. I., Takahachi, N. and Koshijima, T. (1981). *Carbohydrat. Res.* **93**, 91–104.
Azuma, J. I., Nomura, T. and Koshijima, T. (1985a). *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2661–2669.
Azuma, J. I., Takahashi, N., Isaka, M. and Koshijima, T. (1985b). *Mokuzai Gakk.* **31**, 587–594.
Bach Tuyet, L. T., Iiyama, K. and Nakano, J. (1985). *Mokuzai Gakk.* **31**, 475–492.
Bagby, M. O., Nelson, G. H., Helman, E. G. and Clark, T. F. (1971). *Tappi* **54**, 1876–1878.
Bagby, M. O., Cunningham, R. L. and Maloney, R. L. (1973). *Tappi* **56**, 162–163.
Bamber, R. K. (1987). *IAWA Bull.* **8**, 80–84.
Bardet, M., Foray, M. F. and Robert, D. (1985). *Makromol. Chem.* **186**, 1495–1504.
Barnes, C. and Friend, J. (1975). *Phytochem.* **14**, 139–142.
Barnoud, F. (1965). *Bull. Soc. Franc. Phys. Veget.* **11**, 35–54.
Barron, P. F., Frost, R. L., Doimo, L. and Kennedy, M. J. (1985). *J. Macromol. Sci. Chem.* **A22**, 303–322.
Barskaya, E. I. (1962). *Soviet Plant Physiol.* **9**, 167–174.
Bartuska, V. J., Maciel, G. E., Bolker, H. I. and Fleming, B. I. (1980). *Holzforschung* **34**, 214–217.
Bauch, J., Schweers, W. and Berndt, H. (1974). *Holzforschung* **28**, 86–91.
Becker, E. D. and Farrar, T. C. (1972). *Science* **178**, 361–368.
Beer, R. and Peter, S. (1986). *Chem. Ing. Tech.* **1**, 72–73.
Benner, R. A. E., MacCubbin, A. E. and Hodson, R. E. (1984). *Appl. Env. Microbiol.* **47**, 381–389.
Berben, S. A., Rademacher, J. P., Sell, L. O. and Easty, B. (1987). *Tappi* **70**, 129–133.
Bernier, R. (1986). *Acta Biotheoretica* **35**, 163–183.
Berry, R. M. and Bolker, M. (1984). *J. Pulp. Paper Sci.* **12**, J16–J18.
Bezuch, B. and Polcin, J. (1978). *Cell. Chem. Technol.* **12**, 473–482.
Biggs, A. R. (1984). *IAWA Bull.* **5**, 243–248.
Bland, D. E. (1966). *Holzforschung* **20**, 12–16.
Bland, D. E. and Menshun, M. (1970). *Appita* **23**, 427–433.
Bland, D. E. and Menshun, M. (1971). *Appita* **25**, 110–115.

Bland, D. E., Foster, R. C. and Logan, A. F. (1971). *Holzforschung* **25**, 137–143.
Bobier, W. D., Poniatonski, S. E. and Walkinshaw, J. W. (1981). *Tappi* **64**.
Bobleter, O. and Binder, H. (1980). *Holzforschung* **34**, 48–51.
Bolker, H. I. and Sommerville, N. G. (1962). *Tappi* **45**, 826–829.
Bolker, H. I. and Terashima, N. (1966). "Lignin Structure and Reactions" (Am. Chem. Soc. Monograph). *Adv. Chem. Ser.* **59**, 110–124.
Bolker, H. I. and Brenner, H. S. (1970). *Science* **170**, 173–176.
Boon, J. J. (1989). *In* "Physico-chemical Characterization of Plant Residue for Industrial Uses" (Chesson, A. and Orskov, E. R. eds). Elsevier Applied Science, London. In press.
Borg-Olivier, O. and Monties, B. (1989). *C.R. Acad. Sci.* **308**, 141–147.
Boutelje, J. B. and Jonsson, V. (1980). *Cell. Chem. Technol.* **14**, 53–67.
Boutelje, J. B. and Eriksson, I. (1984). *Holzforschung* **38**, 249–252.
Boyd, J. D. (1972). *Wood Sci. Technol.* **6**, 251–262.
Brauns, F. E. (1952). "The Chemistry of Lignin" 808 pp. Academic Press, New York.
Brauns, F. E. and Brauns, D. A. (1960). "The Chemistry of Lignin", supplement volume for the years 1949–1958., 804 pp. Academic Press, New York.
Brežný, R. and Mihálov, V. (1984). *Cell Chem. Technol.* **18**, 575–586.
Brežný, R. and Schraml, J. (1987). *Holzforschung* **41**, 293–298.
Brežný, R., Schraml, J., Kvicalova, M., Zeleny, J. and Chvalovsky, V. (1985). *Holzforschung* **39**, 297–303.
Brown, A. (1966). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **17**, 223–244.
Brown, P. H., Graham, R. D. and Nicholas, D. J. (1984). *Plant Soil* **81**, 437–440.
Browning, B. L. (1952). *In* "Wood Chemistry" (Wise, L. E. and Jahn, E. C., eds), pp. 1214–1237. Reinhold, New York.
Browning, B. L. (1967). *In* "Methods in Wood Chemistry", pp. 717–824. Wiley Interscience, New York.
Bucholtz, D. L., Cantrell, R. P., Axtell, J. D. and Lechtenberg, V. L. (1980). *J. Agric. Fd Chem.* **28**, 1239–1241.
Byler, M. D. (1987). *Polymer Prep.* **28**, 260–261.
Calimli, A. and Ollay, A. (1982). *Separation Sci. Tech.* **17**, 183–197.
Campbell, W. G. and McGowan, J. C. (1939) *Nature* **143**, 1022.
Chang, H. M., Cowling, E. B., Brown, W., Adler, E. and Miksche, G. (1975).
Chen, N., Siegel, S. M. and Siegel, B. Z. (1980). *Life Sci. Space Res.* **18**, 193–198.
Chiang, V. L. and Funuoka, M. (1988a). *Holzforschung* **41**, 369–375.
Chiang, V. L. and Funuoka, M. (1988b). *Holzforschung*. In press.
Chiang, V. L. and Funuoka, M. (1989). *In* "Lignin: Properties and Materials" (Glasser, W. and Sarkanen, S. eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.
Christian, K. R. (1971). *Fld. Stn. Rec. Div. Pl. Ind. CSIRO (Aust.)* **10**, 29–34.
Chum, H. L., Ratcliff, M., Schroeder, H. A. and Sopher, D. (1984). *J. Wood Chem. Technol.* **4**, 505–532.
Chum, H. L., Johnson, D. K., Ratcliff, M., Black, M. and Wallace, K. (1985). *In* "Proceedings of the International Symposium on Wood Pulping Chemistry", pp. 223–226. Paprican, Montreal.
Chum, H. L., Johnson, D. K., Tucker, M. P. and Himmel, M. E. (1987). *Holzforschung* **41**, 97–108.
Coleman, S. W., Barton, I. F. E. and Meyer, R. D. (1982). *Oklahoma Agric. Exp. Stat. Anim. Sci. Res. Rep. MP112*, pp. 102–111.
Connors, W. J. (1978). *Holzforschung* **32**, 145–147.
Connors, W. J., Lorenz, L. F. and Kirk, T. K. (1978). *Holzforschung* **32**, 106–108.
Connors, W. J., Sarkanen, S. and McCarthy, J. L. (1980). *Holzforschung* **34**, 80–85.
Cooks, R. G., Busch, K. L. and Glish, G. L. (1983). *Science* **222**, 273–291.
Cote, W. A. (1981). *Wood Sci. Technol.* **15**, 1–29.
Crawford, D. L. and Crawford, R. L. (1976). *Appl. Env. Microbiol.* **31**, 714–717.
Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (1978). *Dev. Ind. Microbiol.* **19**, 35–49.
Czaninski, Y. (1979). *Biol. Cellulaire* **35**, 97–102.

Czaninski, Y. and Monties, B. (1982). *C.R. Acad. Sci.* **295**, 551–556.
Czaninski, Y., Monties, B., Reis, D. and Catesson, A. (1987). *IAWA Bull.* **8**, 310.
Das, N. N., Das, S. C., Dutt, A. S. and Roy, A. (1981). *Carbohydrate Res.* **94**, 73–82.
De Candolle, A. P. (1819). *In* "Theorie Elementaire de la Botanique" p. 454. Deterville, Paris. See also "Physiologie Vegetale" (1832), Vol. 1, p. 194. Bechet, Paris. Second edn, 544 pp. Deterville, Paris.
Deka, C. C., Roy, D. N. and Landucci, L. L. (1989). *In* "Lignin: Properties and Materials" (Glasser, W. and Sarkanen, S., eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.
Dershem, S. M., Fisher, T. H. and Schutz, T. P. (1988). *Holzforschung* **42**, 163–167.
Dill, I., Salkinov, J. and Kraepelin, G. (1984). *Appl. Env. Microbiol.* **48**, 1259–1261.
Donaldson, L. A. (1985). *N.Z. J. Forest Sci.* **15**, 349–360.
Donaldson, L. A. (1987). *Wood Sci. Technol.* **21**, 227–234.
Doster, M. A. and Bostock, R. M. (1988). *Phytopathology* **78**, 473–477.
Downes, G. and Turvey, N. D. (1986). *Austral. For. Res.* **16**, 371–377.
Dugger, W. M. (1983). *Encyclopedia Plant Physiol. (New Series).* **15B**, 626–643.
Eastmann, P. A. K., Dengler, N. G. and Peterson, C. A. (1988). *Protoplasma* **142**, 92–111.
Ede, R. M., Ralph, J. and Wilkins, A. L. (1987). *Holzforschung* **41**, 239–245.
Edwards, C. S. (1973). *J. Sci. Food Agric.* **24**, 381–388.
Effland, M. J. (1977). *Tappi* **60**, 143–144.
Ekman, R. (1976). *Holzforschung* **30**, 79–85.
Ellwardt, V. P. C., Haider, K. and Ernst, L. (1981). *Holzforschung* **35**, 103–109.
Enoki, A., Goldsby, G. P. and Gold, M. H. (1980). *Arch. Microbiol.* **125**, 227–232.
Eom, T. J., Meshitsuka, G. and Nakano, J. (1987). *Mokuzai Gakk.* **33**, 576–581.
Erdtman, H. (1955). *In* "Modern Methods of Plant Analysis" (Paech, K. and Tracey, M. V., eds), Springer, Berlin.
Erickson, M., Larsson, S. and Miksche, G. E. (1973a). *Acta. Chem. Scand.* **27**, 1673–1678.
Erickson, M., Larsson, S. and Miksche, G. E. (1973b). *Acta. Chem. Scand.* **27**, 127–140.
Eriksson, I., Lidbrant, O. and Westermark, U. (1988). *Wood Sci. Technol.* **22**, 251–257.
Eriksson, O., Goring, D. A. I. and Lindgren, B. (1980). *Wood Sci. Technol.* **14**, 267–279.
Faix, O. (1986). *Holzforschung* **40**, 273–280.
Faix, O. (1988). *Mikrochim. Acta (Wien)* **I**, 21–25.
Faix, O. and Besold, G. (1978). *Holzforschung* **32**, 1–7.
Faix, O. and Schweers, W. (1975). *Holzforschung* **29**, 224–229 (and the six previous papers of this series).
Faix, O., Lange, W. and Beinhoff, O. (1980). *Holzforschung* **34**, 174–176.
Faix, O., Patt, R. and Beinhoff, O. (1987). *Papier* **41**, 657–666.
Favis, B. D. and Goring, D. A. I. (1984). *J. Pulp. Pap. Sci.* **10**, J139–J143.
Feder, N. and O'Brien, (1968). *Am. J. Bot.* **55**, 123–142.
Fengel, D. and Stoll, M. (1975). *Instrument und Forschung* **H4**, 2–15.
Fengel, D. and Wegener, G. (1984) *In* "Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions", pp. 159–160. De Gruyter, Berlin.
Fiserova, M. and Suty, L. (1980). *Cell. Chem. Technol.* **14**, 243–252.
Fiserova, M., Polcin, J. Opalena, E. and Pasarykova, M. (1985). *Cell. Chem. Technol.* **19**, 185–196.
Fisher, T. H., Dershem, S. M. and Schultz, T. P. (1988). *J. Org. Chem.* **53**, 1504–1507.
Flory, P. J. (1975). *In* "Principles of Polymer Chemistry", pp. 376–378. Cornell University Press, Ithaca, NY.
Forss, K., Kokonen, R. and Sagfors, P. E. (1987). *In* "Fourth International Symposium on Wood Pulping Chemistry", pp. 33–39. Centre Technique du Papier, Grenoble, France.
Fotsis, T., Heikkinen, R., Aldercreutz, H., Axelson, M. and Setchell, D. R. (1982). *Clin. Chim. Acta.* **121**, 361–371.
Fremy, M. E. (1859). *C.R. Acad. Sci.* **48**, 862–868.
Freudenberg, K. (1955). *In* "Modern Methods of Plant Analysis" Vol III (Peach, K. and Tracey, M. V., eds), pp. 498–516. Springer, Berlin.

Freudenberg, K. (1964). *Holzforschung* **18**, 3–9.
Freudenberg, K. (1968). *In* "Constitution and Biosynthesis of Lignin", (Freudenberg, K. and Neish, A. C., eds), pp. 46–122, Springer, Berlin.
Freudenberg, K. and Knopf, L. (1957). *Chem. Ber.* **90**, 2857–2859.
Freudenberg, K. and Weinges, K. (1961). *Tetrahedron* **15**, 115–128.
Friend, J. (1981). *Prog. Phytochem* **7**, 197–261.
Froment, P. and Pla, F. (1989). *In* "Lignin: Properties and Materials" (Glasser, W. and Sarkanen, S., eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.
Fry, S. C. (1986). *Am. Rev. Plant. Physiol.* **37**, 165–186.
Fujita, M. and Harada, H. (1978). *Mokuzai Gakk.* **24**, 435–440.
Fujita, M. and Harada, H. (1979). *Mokuzai Gakk.* **25**, 89–94.
Fukuda, T. (1983). *Mokuzai Gakk.* **29**, 74–81.
Fukuzawa, K. and Imagawa, H. (1981). *Wood Sci. Technol.* **15**, 45–55.
Funuoka, M. and Abe, I. (1987). *Wood Sci. Technol.* **21**, 261–279.
Gagnaire, D. and Robert, D. (1977). *Makromol. Chem.* **178**, 1477–1495.
Gagnaire, D., Nardin, R. and Robert, D. (1979). *Org. Mag. Res.* **12**, 405–413.
Garcia, S. and Latge, J. P. (1987). *Biotechnol. Tech.* **1**, 63–68.
Garland, C. P., Nelson, P. J., Wallis, A. F. A. and James, F. C. (1984). *J. Wood Chem. Technol.* **6**, 329–343.
Garland, C. P., James, F. C., Nelson, P. J. and Wallis, F. A. (1986). *Appita* **39**, 361–368.
Garver, T. M. and Sarkanen, S. (1986). *Holzforschung* **40**, (Suppl.), 93–100.
Gaudillere, M. and Monties, B. (1988). *In* "Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers", (Lewis, G. N. and Paice, M., eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, Toronto, July 1988. In press.
Geiger, H. and Fuggerer, H. (1979). *Z. Naturforsch,* **34B**, 1471–1472.
Geiger, H. (1985). *In* "The Biochemistry of Plant Phenolics", Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., Vol. 25, pp. 45–56. Clarendon Press, Oxford.
Gellerstedt, G. and Lindfors, E. L. (1984a). *Holzforschung* **38**, 151–158.
Gellerstedt, G. and Lindfors, E. L. (1984b). *Svensk Papperstidn* **87**, R115–R118.
Gellerstedt, G. and Robert, D. (1987). *Acta. Chem. Scand.* **B41**, 541–546.
Gellerstedt, G. and Northey, R. A. (1989). *Wood Sci. Technol.* **23**, 75–83.
Genuit, W., Boon, J. J. and Faix, O. (1987). *Anal. Chem.* **59**, 508–512.
Gerasimovicz, W. V., Hicks, K. B. and Pfeffer, P. E. (1984). *Macromolecules* **17**, 2597–2603.
Gierer, J. (1954). *Acta Chem. Scand.* **8**, 1319–1331.
Gierer, J. and Wannstrom, S. (1984). *Holzforschung* **38**, 181–184.
Girardin, M. and Metche, M. (1983). *J. Chromatogr.* **264**, 155–158.
Glasser, W. G. (1980). *In* "Pulp and Paper", 3rd edn., Vol. 1 (Casey J. P., ed.), pp. 44–51. John Wiley and Sons, New York.
Glasser, W. G. and Glasser, H. R. (1981). *Pap. Puu.* **63**, 71–83.
Glasser, W. G. and Kelley, S. S. (1987). *In* "Encyclopedia of Polymer Science Engineering, 2nd edn., pp. 795–852. John Wiley and Sons, New York.
Glasser, W. G., Barnett, C. A. and Sano, Y. (1983a). *J. Appl. Polymer Sci. Appl. Polymer Symp.* **17**, 441–460.
Glasser, W. G., Barnett, C. A., Muller, P. C. and Sarkanen, K. (1983b). *J. Agric. Fd Chem.* **31**, 921–930.
Goldschmidt, O. (1954). *Anal. Chem.* **26**, 1421–1423.
Goldschmid, O. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 241–266. Wiley Interscience, New York.
Goring, D. A. I. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 615–768. Wiley Interscience, New York.
Goring, D. A. I. (1989). *In* "Lignin: Properties and Materials" (Glasser, W. and Sarkanen, S., eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.
Gottlieb, O. R. (1972). *Phytochemistry* **11**, 1537–1570.
Gould, J. M. (1982). *Plant Physiol.* **70**, 1521–1525.
Graham, R. D. (1976). *Austral. J. Plant Physiol.* **3**, 229–236.
Graham, R. D. (1983). *Adv. Bot. Res.* **10**, 221–276.

Grand, C., Ranjeva, R., Boudet, A. M. and Alibert, G. (1979). *Planta* **146**, 281–286.
Grondal, B. L. and Zenczak, P. (1952). *N. W. Science* **24**, 145–151.
Haider, K. and Schulten, H. R. (1985). *J. Appl. Anal. Pyrolysis* **8**, 317–331.
Hammerschmidt, R. (1984). *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 33–42.
Hardell, H. L., Leary, G. J., Stoll, M. and Westermark, U. (1980a). *Svensk Papperstidn* **83**, 71–74.
Hardell, H. L., Leary, G. J., Stoll, M. and Westermark, U. (1980b). *Svensk Papperstidn* **83**, 44–49.
Harlow, W. M. (1941). *Paper Trade J.* **112**, 31–34.
Harris, P. J., Hartley, R. D. and Barton, G. E. (1982). *J. Sci. Fd Agric.* **33**, 516–520.
Hartley, R. D. and Keene, A. S. (1984). *Phytochemistry* **23**, 1305–1307.
Haslam, E. and Lilley, T. H. (1985). *In* "The Biochemistry of Plant Phenolics," Vol. 25, (Van Sumere, C. F. and Lea, P. J., eds), pp. 237–256. Clarendon Press, Oxford.
Hassi, H. Y., Aoyama, M., Tai, D. C. C. L. and Gratzl, J. S. (1987). *J. Wood Chem. Technol.* **7**, 555–581.
Hattaka, A. I. and Uusi-Rauva, A. K. (1983). *Eur. J. Appl. Microbiol.* **17**, 235–242.
Hatcher, P. G. (1987). *Org. Geochem.* **11**, 31–39.
Hatfield, G. R., Maciel, G. E., Erbatur, O. and Erbatur, G. (1987a). *Anal. Chem.* **59**, 172–179.
Hatfield, G. R., Sardashti, M. and Maciel, G. E. (1987b). *Anal. Chem.* **59**, 1659–1664.
Hauteville, M., Lundquist, K. and Von Unge, S. (1986). *Acta. Chem. Scand.* **B40**, 31–35.
Haw, J. F., Maciel, G. E. and Biermann, C. J. (1984). *Holzforschung* **38**, 327–331.
Haw, J. F. and Schultz, T. P. (1985). *Holzforschung* **39**, 289–296.
Hedges, J. I. and Ertel, J. R. (1982). *Anal. Chem.* **54**, 174–178.
Hemingson, J. A. and Newman, R. H. (1985). *J. Wood Chem. Technol.* **5**, 159–188.
Hergert, H. L. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 267–297. Wiley Interscience, New York.
Hergert, H. L. (1977). *In* "Cellulose Chemistry and Technology", Vol. 48, pp. 227–243. Am. Chem. Soc., New York.
Hibbert, H. (1942). *Ann. Rev. Biochem.* **21**, 183–202.
Higuchi, T. (1980). *Wood Res.* **66**, 1–16.
Higuchi, T. (1985). *In* "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (Higuchi, T. ed.), pp. 141–160. Academic Press, New York.
Higuchi, T. (1986). *Wood Res.* **73**, 58–81 (and reference cited therein).
Higuchi, T., Ito, Y. and Kawamura, I. (1967). *Phytochem* **6**, 875–881.
Higuchi, T., Tanahashi, M. and Sato, A. (1972). *Mokkuzai Gakk.* **18**, 183–189.
Himmel, M. E., Oh, K. K., Sopher, D. W. and Chum, H. L. (1983). *J. Chromatogr.* **267**, 249–265.
Hoffmann, P. and Parameswaran, N. (1976). *Holzforschung* **30**, 62–70.
Hoffman, S. A., Miller, R. A. and Pengelly, W. L. (1985). *Phytochemistry* **24**, 2685–2687.
Hon, D. N. S. (1983). *J. Appl. Polymer Sci.: Appl. Polymer Symp.* **37**, 461–481.
Hon, D. N. S. (1987). *Dev. Polymer Degradation* **7**, 165–191.
Horwitz, W. (1980). *In* "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.", 13th edn (Horwitz, W., ed.), pp. 134–136, 877. AOAC, Washington, USA.
Howard, J. and McDonald, E. C. (1981). *In* "Third Bioenergy R.D. Seminar," pp. 245–249. Elsevier Applied Science, London.
Iiyama, K. and Pant, R. (1988). *Wood Sci. Technol.* **22**, 167–175.
Iiyama, K. and Wallis, A. F. A. (1988). *Wood Sci. Technol.* **22**, 271–280.
Imagawa, H. and Fukazawa, K. (1978). *Mokkuzai Gakk.* **24**, 583–586.
Ivanov, A. N. (1988). *Izv. Vyssh. Ucht. Zaved: Technol. Text. Promt.* **1**, 16–18.
Jaegher, D. E. J., Boyer, N. and Gaspar, T. (1985). *Plant Growth Reg.* **3**, 133–148.
Jeffs, R. A. and Northcote, D. H. (1966). *Biochem. J.* **101**, 146–152.
Johansson, A., Aaltonen, O. and Ylinen, P. (1987) *Biomass* **13**, 45–65.
Johnson, D. B., Moore, W. E. and Zank, L. C. (1961). *Tappi.* **44**, 793–798.
Jouin, D., Tollier, M. T. and Monties, B. (1988). *Cell. Chem. Technol.*
Kaneko, H., Takatsuka, C and Nakano, T. (1981). *Mokkuzai Gakk.* **27**, 523–525.
Kaneko, H., Hosoya, S., Iiyama, K. and Nakano, J. (1983). *J. Wood Chem. Technol.* **3**, 399–411.
Karrer, P. and Bodding-Wiger, B. (1923). *Helv. Chim. Acta.* **6**, 817–822.
Kato, A., Azuma, J. I. and Koshijima, T. (1987). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1691–1693.
Kawamura, I. and Shinoda, Y. (1975). *Res. Bull. Fac. Agric. Gifu.* **38**, 127–133.

Kersten, P. J., Tien, M., Kalyaraman, B. and Kirk, T. K. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 2609–2612.
Kevers, C., Prat, R. and Gaspar, T. (1987). *Plant Growth Reg.* **5**, 59–66.
Kimmins, W. C. and Wuddah, D. (1977). *Phytopathology* **67**, 1012–1016.
Klauditz, W. (1952). *Holzforschung* **6**, 70–82.
Kleinert, T. N. and Morton, J. R. (1962). *Nature* **196**, 334–336.
Koelbe, S. and Ellefsen, O. (1962). *Tappi.* **45**, 163–166.
Koll, P. and Metzer, J. (1978). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 754–755.
Koshijima, T. and Tanaka, R. (1971). *Cellulose Chem. Technol.* **6**, 609–620.
Koshijima, T., Yaku, F., Muraki, R. and Tanaka, R. (1983). *J. Appl. Polymer Sci.* **37**, 671–683.
Kovačik, V., Mihálov, V. and Brežný R. (1980). *Cell. Chem. Technol.* **14**, 233–241.
Kratzl, K. (1958). *In* "Proceedings of the Fourth International Congress on Biochemistry: Transcription of the Plenary Sessions," Vol. 14 (Hoffman-Ostenhof, O. ed.), pp. 102–107. Pergamon Press, London.
Kuc, J. and Nelson, O. E. (1964). *Arch. Biochim. Biophys.* **105**, 103–113.
Kutsuki, H. and Higuchi, T. (1978). *Mokkuzai Gakk.* **24**, 625–631.
Lai, Y. Z. and Sarkanen, K. V. (1971). "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reaction" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 175–179 (see also Brauns, F. E., 1951, ref. cited pp. 51–54). Academic Press, New York.
Lai, Y. Z. and Sarkanen, K. V. (1975). *Cell. Chem. Technol.* **9**, 239.
Lamport, D. T. A. and Epstein, L. (1983). *Current Topics Plant Biochem. Physiol* **2**, 47–50.
Landucci, L. L. (1984). *J. Wood Chem. Technol.* **4**, 171–186.
Landucci, L. L. (1985). *Holzforschung* **39**, 355–359.
Lange, P. W. (1950). *Svensk. Papperstidn* **53**, 749.
Lapierre, C. (1986). "Heterogeneite des lignines de Peuplier: mise en evidence systematique", Thèse de doctorat d'état, pp. 304. Université Paris-Sud, Orsay, (see also reference in *Holzforschung* **38**, 333–342).
Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E., Rolando, C. and Lallemand, J. L. (1981). *Holzforschung* **37**, 217–224.
Lapierre, C., Rolando, C. and Monties, B. (1983). *Holzforschung* **37**, 189–198.
Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E. and Lallemand, J. Y. (1984a). *Holzforschung* **38**, 333–342.
Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, C. (1984b). *C.R. Acad. Sci.* **299**, 441–444.
Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, C. (1985a). *J. Wood Sci. Technol.* **5**, 277–292.
Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E. and Lallemand, J. Y. (1985b). *Holzforschung* **39**, 367–368.
Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, C. (1986). *Holzforschung* **40**, 47–50.
Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, C. (1987a). *Fourth Int. Symp. Wood Pulping Chem.* **2**, 431–435.
Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E. and Lallemand, J. Y. (1987b). *Holzforschung* **41**, 51–58.
Lapierre, C., Tollier, M. T. and Monties, B. (1988). *C.R. Acad. Sci. Paris.* **307**, (III), 723–728.
Lasmela, K. (1988a). *Holzforschung* **42**, 109–173.
Leary, G. J., Sawtell, D. A. and Wong, H. (1983). *Holzforschung* **37**, 213–215.
Leary, G. J., Morgan, K. R., Newman, R. H., Samvelson, B. and Westermark, (1986a). *Holzforschung* **40**, 221–224.
Leary, G. J., Newman, R. H. and Morgan, K. R. (1986b). *Holzforschung* **40**, 267–272.
Lee, Z. Z., Meshitsuka, G., Cho, N. S. and Nakano, J. (1981). *Mokkuzai Gakk.* **27**, 671–677.
Lewis, N., Newman, J., Just, G. and Ripmeister, J. (1987). *Macromolecules* **20**, 1752–1756.
Lin, S. L. and Teder, A. (1976a). *Svensk Papperstidn* **79**, 95–100.
Lin, S. L. and Teder, A. (1976b). *Svensk Papperstidn* **79**, 153–156.
Lin, S. L. (1982). *Svensk Papperstidn* **84**, R162–R171.
Lindgreen, B. O. (1958). *Acta Chem. Scand.* **12**, 447–452.
Liptaj, T., Remko, M. and Polcin, J. (1980). *Col. Czechoslov. Chem. Comm.* **45**, 330–334.
Locquin, M. and Langeron, M. (1978). *In* "Manuel de Microscopie", pp. 240–248. Masson, Paris.
Lowendahl, L., Peterson, G. and Samuelson, O. (1978). *Svensk Papperstidn* **81**, 392–396.
Lowry, B., Lee, D. and Hebant, C. (1980). *Taxon* **29**, 183–197.
Ludemann, H. D. and Nimz, H. H. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 1162–1169.
Ludwig, C. H. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 299–344., Wiley Interscience, New York.

Lundquist, K. (1976). *Appl. Polymer Symp.* **28**, 1393–1407.
Lundquist, K. (1979a). *Acta. Chem. Scand.* **B33**, 27–30.
Lundquist, K. (1979b). *Acta. Chem. Scand.* **B33**, 418–420.
Lundquist, K. (1980). *Acta. Chem. Scand.* **B34**, 21–26.
Lundquist, K. (1981). *Acta. Chem. Scand.* **B35**, 497–501.
Lundquist, K. (1983). *Acta. Chem. Scand.* **B37**, 734–736.
Lundquist, K. and Kirk, T. K. (1971). *Acta Chem. Scand.* **25**, 881–894.
Lundquist, K. and Olsson, T. (1977). *Acta. Chem. Scand.* **B31**, 788–792.
Lundquist, K., Ohlsson, B. and Simonson, R. (1977). *Svensk. Papperstidn* **80**, 143–144.
Lundquist, K., Josefsson, B. and Nyquist, G. (1978). *Holzforschung* **32**, 27–32.
Lundquist, K., Simonson, R. and Tingsvik, K. (1983). *Svensk. Papperstidn* **86**, R44–R47.
MacCreadie, R. S., Ritchie, E. and Taylor, W. C. (1969). *Austral. J. Chem.* **22**, 1011–1032.
MacQueen, R. E. (1986). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 423–424.
MacRae, D. W. and Towers, G. H. N. (1984). *Phytochemistry* **23**, 1207–1220.
Maciel, G. E., O'Donnel, D. J., Ackermann, J. J. H., Hawkins, B. H. and Baturska, V. J. (1981). *Makromol. Chem.* **182**, 2297–2304.
Manders, W. F. (1987). *Holzforschung* **41**, 13–18.
Manson, P. (1983). *Holzforschung* **37**, 143–146.
Marraccini, L. M. and Kleinert, T. N. (1959). *Holzforschung* **13**, 43–48.
Marton, J. (1967). *Tappi* **50**, 335–337.
Matsumoto, G. and Hanya, T. (1980). *J. Chromatogr.* **193**, 89–94.
Matsumoto, Y., Ishizu, A. and Nakano, J. (1984a). *Mokkuzai Gakk.* **30**, 74–78.
Matsumoto, Y., Ishizu, A., Nakano, J. and Terazawa, K. (1984b). *J. Wood Chem. Technol.* **4**, 321–330.
Matsumoto, Y., Ishizu, A. and Nakano, J. (1986). *Holzforschung* **40** (Suppl.), 81–85.
Maule, A. J. and Ride, J. P. (1983). *Phytochemistry* **22**, 1113–1116.
McClure, J. W. (1970). *In* "Phytochemical Phylogeny" (Harborne, J. B., ed.), pp. 260–268 Academic Press, New York.
McKenzie, A. W. M., McPherson, J. A. M. and Stewart, C. M. (1955). *Holzforschung* **9**, 109–112.
McLeod, M. N. and Minson, D. J. (1974). *J. Sci. Fd. Agric.* **25**, 907–911.
Meshitsuka, G. and Nakano, J. (1979). *Mokkuzai Gakk.* **25**, 588–594.
Meshitsuka, G. and Nakano, J. (1981). *Mokkuzai Gakk.* **27**, 111–115.
Meshitsuka, G., Lee, Z. Z. and Nakano, J. (1982). *J. Wood Chem. Technol.* **2**, 251–267.
Michell, A. J. (1988). *Wood Fiber Sci.* **20**, 272–276.
Miki, K., Takahera, T., Sasaya, T. and Sakakibara, A. (1980). *Phytochemistry* **19**, 449–453.
Miksche, G. E. and Yasuda, S. (1976). *Leibigs Ann. Chem.* 1323–1332.
Miksche, G. E. and Yasuda, S. (1978). *Phytochemistry* **17**, 503–504.
Minor, J. L. (1982). *J. Wood Chem. Technol.* **2**, 1–16.
Mollard, A. and Robert, D. (1984). *Physiol. Veget.* **22**, 3–17.
Monties, B. (1984). *Agronomie* **4**, 387–392.
Monties, B. (1985). *In* "The Biochemistry of Plant Phenolics" (Van Sumere, C. F. and Lea, P. J., eds), pp. 161–181. Clarendon Press, Oxford.
Monties, B. (1988). *In* "Methods in Enzymology" (Wood, W. A. and Kellogg, S. T., eds), pp. 31–35. Academic Press, New York.
Monties, B. (1989). *In* "Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Physiology" (Dreyer, E. ed.). *Ann. Sci. Forestiere*, (Special issue). In press.
Monties, B. (1990a). *In* "Biomasses Lignocellulosiques: Perspectives Technico-economiques" (Monties, B. ed.). Apria-Lavoisier, Paris. In press.
Monties, B. (1990b). *in* "Proceedings of the OCDE Workshop on Cellulose: Cell Walls Structure and Utilisation" *Anim. Feed Sci. and Technol.* **26**. In press.
Monties, B. and Lapierre, C. (1981). *Physiol. Veget.* **19**, 327–348.
Monties, B., Tollier, M. T. and Gaudillere, M. (1987). Proceedings of the Fourth International Symposium on Wood Pulping Chemistry **2**, pp. 41–43. Centre Technique du Papier, Grenoble.
Moon, F. E. and Abou-Raya, A. K. (1952). *J. Sci. Fd Agric.* **3**, 595–608.
Morck, R. and Kringstadt, K. P. (1985). *Holzforschung* **39**, 109–119.
Morck, R., Yoshida, H., Kringstadt, K. and Hatakayama, H. (1986). *Holzforschung* **40** (Suppl.), 51–60.

Mork, R., Reimann, A. and Kringstadt, K. P. (1988). *Holzforschung* **42**, 111–116.
Morohoshi, N. and Glasser, W. G. (1979a). *Wood Sci. Technol.* **13**, 165–178.
Morohoshi, N. and Glasser, W. G. (1979b). *Wood Sci. Technol.* **13**, 249–264.
Morohoshi, N. and Sakakibara, A. (1971). *Mokkuzai Gakk.* **17**, 400–406.
Morrisson, I. M. (1972). *J. Sci. Fd Agric.* **23**, 455–463.
Morrisson, I. M. (1973). *Phytochemistry* **12**, 2979–2984.
Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1974). *Wood Sci.* **7**, 133–134.
Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1975). *Wood Sci. Technol.* **9**, 45–58.
Neish, A. C. (1964). *In* "The Formation of Wood in Forest Trees" (Zimmerman, M. H. ed.), pp. 219–239. Academic Press, New York.
Neish, A. C. (1968). *In* "Constitution and Biosynthesis of Lignin" (Freudenberg, K. and Neish, A. C., eds), pp. 1–43. Springer, Berlin.
Nicholson, J. C., Meister, J. J., Patil, D. R. and Field, L. R. (1984). *Anal. Chem.* **56**, 2447–2451.
Niemela, K. (1988a). *Holzforschung* **42**, 169–173.
Niemela, K. (1988b). *Holzforschung* **42**, 175–176.
Nimz, H. H. (1969). *Chem. Ber.* **109**, 799–810.
Nimz, H. H. (1974). *Angew. Chem. Int. Ed.* **13**, 313–321.
Nimz, H. H. (1981). *Wood Sci. Technol.* **15**, 311–316.
Nimz, H. H., Ebel, J. and Grisebach, H. (1975). *Z. Naturforsch.* **30**, 442–444.
Nimz, H. H., Robert, D., Faix, O. and Nemr, M. (1981). *Holzforschung* **35**, 16–26.
Nimz, H. H., Nemr, M., Schmidt, P., Margot, C. and Schaub, B. (1982). *J. Wood Chem. Technol.* **2**, 371–382.
Nimz, H. H., Tschirner, U., Stahle, M., Lehmann, R. and Schlosser, M. (1984). *J. Wood Chem. Technol.* **4**, 265–284.
Nord, F. F. and De Stevens, G. (1958). "Encyclopedia of Plant Physiology", Vol. 10, (Ruhland, W. ed), pp. 389–441. Springer, Berlin.
Northcote, D. H. (1972). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**, 113–132.
Obst, J. R. (1982). *Tappi*, **65**, 109–112.
Obst, J. R. and Ralph, J. (1983). *Holzforschung* **37**, 297–302.
Odier, E. and Rolando, C. (1985). *Biochimie* **67**, 191–197.
Odier, E., Janin, G. and Monties, B. (1981). *Appl. Env. Microbiol.* **41**, 337–341.
Odier, E., Mozuch, M. D., Kalyanaraman, B. and Kirk, T. K. (1988). *Biochimie* **70**, 847–852.
Ohta, M., Higuchi, T. and Iwahara, S. (1979). *Arch. Microbiol.* **121**, 23–28.
Ozawa, S. and Sasaya, T. (1977). *Mokkuzai Gakk.* **33**, 53–60.
Payen, M. (1838). *C.R. Acad. Sci.* **7**, 1052–1056; 1125.
Pecina, R., Burtscher, P., Bonn, J. and Bobleter, O. (1986). *Frezenius Z. Anal. Chem.* **325**, 461–465.
Pellinen, J. and Salkinoja-Sallonen, M. (1985). *J. Chromatogr.* **328**, 299–308.
Peper, J. M., Bayliss, P. E. and Adler, E. (1959). *Can. J. Chem.* **37**, 1241.
Petsom, A. and Steelink, C. (1988). *Envir. Technol. Lett.* **9**, 609–620.
Pew, J. C. (1963). *J. Org. Chem.* **28**, 1048–1054.
Pfeiffer, C. D., Larson, J. R. and Ryder, J. F. (1983). *Anal. Chem.* **54**, 1622–1624.
Phelan, M. B., Crawford, D. L. and Pometto, A. L. I. (1979). *Can. J. Microbiol.* **25**, 1270–1276.
Pla, F. (1989). *In* "Methods in Lignin Chemistry" (Dence, C. and Lin, S. Y., eds). Springer, Berlin. In press.
Pla, F. and Robert, A. (1974). *Cell. Chem. Technol.* **8**, 3–10.
Pla, F. and Robert, A. (1984). *Holzforschung* **38**, 37–42.
Pla, F. and Yan, J. F. (1984). *J. Wood Chem. Technol.* **4**, 285–299.
Pla, F., Froment, P., Capitini, R., Tistchenko, A. M. and Robert A. (1977). *Cell. Chem. Technol.* **11**, 711–718.
Plastre, D., Froment, P. and Robert, A. (1982). *Bull. Groupe Polyphenols* **11**, 320–327.
Plastre, D. (1983). "Determination des proprietes macromoleculaires de la lignine: mise au point de techniques d'analyse". Thèse de Docteur Ingenieur, Université de Grenoble., 165 pp. INPL Grenoble, France.
Pobiner, H. (1983). *Anal. Chim. Acta.* **155**, 57–65.
Pometto, A. L. and Crawford, D. L. (1985). *Appl. Env. Microbiol* **49**, 879–881.

Ragan, M. A. (1984). *Phytochemistry* **23**, 2029–2032.
Ralph, J. (1988). *Holzforschung* **42**, 273–275.
Ralph, J. and Wilkins, A. L. (1985). *Holzforschung* **39**, 341–344.
Ranby, B., Kringstadt, K., Cowling, E. B. and Lin, S. Y. (1969). *Acta Chem. Scand.* **23**, 3257–3259.
Raven, J. A. (1977). *Adv. Bot. Res.* **5**, 153–219.
Reis, D. (1981). *Ann. Sci. Nat. Bot.* **2–3**, 121–136.
Rhodes, M. J. C. (1985). *In* "The Biochemistry of Plant Phenolics" (Van Sumere, C. F. and Lea, P. J., eds), pp. 99–118. Clarendon Press, Oxford.
Ride, J. P. (1975). *Physiol. Plant Pathol.* **5**, 125–134.
Ritter, D. C. and Campbell, A. C. (1986). *Biotech. Bioeng. Symp.* **17**, 179–182.
Robert, D. and Brunow, G. (1984). *Holzforschung* **38**, 85–90.
Robert, D. and Chen, C. L. (1988). *In* "Biomass: Methods in Enzymology" (Wood, A. W. and Kellog, S. T., eds), pp. 137–175. Academic Press, New York.
Robert, D. and Gagnaire, D. (1981). *In* "The Eckmann Days", Proceedings of the International Symposium on Wood Pulping Chemistry, pp. 86–88. S.T.F.I. Stockholm.
Roberts, K., Grief, C., Hills, G. J. and Shaw, P. J. (1985). *J. Cell. Sci.* **2** (Suppl.), 105–127.
Robertson, J. A., Eastwood, M. A. and Yeoman, M. N. (1979). *J. Sci. Fd Agric.* **30**, 1039–1042.
Rolando, C., Lapierre, C. and Monties, B. (1989). *In* "Methods in Lignin Chemistry" (Dence, C. and Lin, S. Y., eds). Springer, Berlin. In press.
Saka, S. and Goring, D. A. I. (1985). *In* "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (Higuchi, T. ed.), pp. 51–62. Academic Press, New York.
Saka, S. and Goring, D. A. I. (1988). *Holzforschung* **41**, 149–153.
Saka, S. and Thomas, R. J. (1982). *Wood Sci. Technol.* **16**, 1–18.
Saka, S. Thomas, R. J. and Gratzl, J. S. (1978). *Tappi* **61**, 73–76.
Saka, S., Whiting, P., Fukazawa, K. and Goring, D. A. I. (1982). *Wood Sci. Technol.* **16**, 269–277.
Saka, S., Hosoya, S., St-Germain, F. G. T. and Goring, D. A. I. (1988). *Holzforschung* **42**, 79–83.
Sakakibara, A. (1977). *Recent Adv. Phytochem.* **11**, 117–139.
Sakakibara, A. (1980). *Wood Sci. Technol.* **14**, 89–100.
Sakakibara, A., Sudo, K., Kishi, M., Aoyama, M. and Hwang, B. H. (1980). *Mokkuzai Gakk.* **26**, 628–632.
Sakakibara, A., Sasaya, T., Miki, K. and Takahashi, H. (1987). *Holzforschung* **41**, 1–11.
Saleh, T. M., Leney, L. and Sarkanen, K. V. (1967). *Holzforschung* **21**, 116–120.
Salud, E. C. and Faix, O. (1980). *Holzforschung* **34**, 113–131.
Sarkanen, K. V. (1971). p. 116–150 in Sarkanen and Ludwig, 1971a.
Sarkanen, K. W. and Hergert, H. L. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, H., eds), pp. 68–71. Wiley Interscience, New York.
Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971a). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions", 916 pp. Wiley Interscience, New York.
Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971b). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure, and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 1–18. Wiley Interscience, New York.
Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971c). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H., eds), pp. 150–155. Wiley Interscience, New York.
Sarkanen, K. V., Chang, H. M. and Allan, G. G. (1967). *Tappi* **50**, 587–590.
Sarkanen, S., Teller, C. D., Hall, J. and McCarthy, J. L. (1981). *Macromolecules* **14**, 426–434.
Sawai, A., Kondo, T. and Ara, S. (1984). *J. Jap. Grassl. Sci.* **30**, 165–169.
Scalbert, A. and Monties, B. (1986a). *Holzforschung* **40**, 119–127.
Scalbert, A. and Monties, B. (1986b). *Holzforschung* **40**, 249–254.
Scalbert, A., Monties, B. and Lallemand, J. Y. (1985). *Phytochemistry* **24**, 1359–1362.
Schaefer, J., Sefcik, M. D., Stejskal, E. O., McKay, R. A. and Hall, P. L. (1981). *Macromolecules.* **14**, 557–559.
Schilling, G. (1985). *In* "The Biochemistry of Plant Phenolics", Vol. 25 (Van Sumere, C. F. and Lea, P. J., eds), pp. 57–74. Clarendon Press, Oxford.
Schuerch, C. (1952). *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5061–5067.

Schulten, H. R. (1984). *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **6**, 251–272.
Schultz, T. P. and Glasser, W. G. (1986). *Holzforschung* **40** (Suppl.), 37–44.
Schultz, T. P. and Templeton, M. C. (1986). *Holzforschung* **40**, 93–97.
Scott, J. A. N., Proctor, A. R., Fergus, B. J. and Goring, D. A. I. (1969). *Wood Sci. Technol.* **3**, 73–92.
Sealy, L. H. (1982). "Etude ultrastructurale et biochimique du phenomene de durcissement post recolte de l'igname (*Dioscorea dumetorum*)". Thèse de III cycle, Université de Nantes, Nantes. 138 pp.
Seefeldt, R. G. and Dimmel, D. R (1983). *Tappi.* **66**, 89–92.
Shann, J. R. and Blum, U. (1987a). *Phytochemistry* **26**, 2977–2982.
Shann, J. R. and Blum, U. (1987b). *Phytochemistry* **26**, 2959–2964.
Sharma, U., Brillouet, J. M., Scalbert, A. and Monties, B. (1986). *Agronomie* **6**, 265–271.
Shimada, M., Fushiki, H. and Higuchi, T. (1973). *Mokkuzai Gakk.* **19**, 13–21.
Shio, T. and Higuchi, T. (1978). *Wood Res.* **63**, 1–10.
Shio, T. and Higuchi, T. (1981). *Wood Res.* **67**, 43–46.
Smeltorius, J. A. and Steward, C. M. (1974). *Holzforschung* **28**, 160–168.
Smith, J. L., Stanley, D. W. and Baker, K. W. (1987). *J. Texture Stud.* **18**, 339–358.
Sorvari, J., Sjostrom, E., Klemola, A. and Laine, J. E. (1986). *Wood Sci. Technol.* **20**, 35–51.
Southgate, D. A. T., Hudson, G. J. and Englyst, H. (1978). *J. Sci. Fd Agric.* **29**, 979–988.
Srivastava, L. M. (1966). *Tappi* **49**, 173–182.
St.-Germain, F. G. T. and Gray, D. G. (1987). *J. Wood Chem. Technol.* **7**, 33–50
Stafford, H. A. (1960). *Plant Physiol.* **35**, 108–114.
Stafford, H. A. (1964). *Plant Physiol.* **39**, 350–360.
Stafford, H. (1988). *Phytochemistry* **27**, 1–6.
Stanley, D. W. and Aguilera, J. M. (1985). *J. Food Biochem.* **9**, 277–323.
Steefeldt, R. G. and Dirmel, D. R. (1983). *Tappi* **66**, 89–92.
Steelink, C. (1964). *Geochem. Cosmochem. Acta* **28**, 1615–1622.
Steelink, C. (1966). *Adv. Chem.* **59**, 51–64.
Steelink, C. (1972). *Rec. Adv. Phytochem.* **4**, 239–271.
Sterk, H., Stattler, W. and Esterbauer, M. (1987). *Carbohydrate Res.* **164**, 85–95.
Stewart, T. C. (1973). *Cell. Chem. Technol.* **7**, 691–701.
Sudo, K., Mullord, D. J. and Pepper, J. M. (1981). *Can. J. Chem.* **59**, 1028–1031.
Sullivan, J. T. (1959). *J. Anim. Sci.* **18**, 1292–1298.
Tai, D., Cho, W. and Ji, W. (1987). *In* "Fourth International Symposium on Wood Pulping Chemistry", pp. 13–17 (ISWPC Paris). Centre Technique du Papier. Grenoble, France.
Takabe, K., Fujita, M., Harada, H. and Saiki, H. (1985). *Mokkuzai Gakk.* **31**, 613–619.
Takabe, K., Fukuzawa, K. and Harada, H. (1988). In "Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers" (Lewis, G. N. and Paice, M., eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, Toronto, July 1988. In press.
Takahashi, N. and Koshijima, T. (1987). *Wood Sci. Technol.* **22**, 177–189.
Takahashi, N. and Koshijima, T. (1988). *Wood Res.* **74**, 1–11.
Takahashi, N., Azuma, J. and Koshijima, T. (1982). *Carbohydrate Res.* **107**, 161–168
Tanabe, H. and Kobayashi, Y. (1988). *Holzforschung* **42**, 47–52.
Tanahashi, M. and Higuchi, T. (1981). *Wood Res.* **67**, 29–42.
Tanahashi, M., Nakatsubo, F. and Higuchi, T. (1975). *Wood Research* **58**, 1–11.
Tanahashi, M., Takeuchi, H. and Higuchi, T. (1976). *Wood Sci.* **61**, 44–53
Taylor, M. G., Deslandes, Y., Bluhm, T. and Marchesault, R. H. (1983). *Tappi* **66**, 92–94.
Tekely, P. and Vignon, M. R. (1987). *J. Wood Chem. Technol.* **7**, 215–228.
Terashima, N. (1989). *In* "Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers", (Lewis, G. N. and Paice, M. eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.
Terashima, N., Fukushima, K., Tsuchiyama, S. and Takabe, K. (1986a). *J. Wood Chem. Technol.* **6**, 495–504.
Terashima, N., Fukushima, K. and Takabe, K. (1986b). *Holzforschung* **40** (Suppl.), 101–105.
Terashima, N. and Fukushima, K. (1989). *In* "Biogenesis and Biodegradation of Plant Cell Wall Polymers", (Lewis, G. N. and Paice, M. eds). Am. Chem. Soc. Symposium Series, No. 397, Toronto, July 1988. In press.

Terashima, N. and Fukushima, K. (1988). *Wood Sci. Technol.* **22**, 259–270.
Tollier, M. T., Monties, B., Lapierre, C., Du Penhoat, C. and Rolando, C. (1986). *Holzforschung* **40** (Suppl.), 75–79.
Uchiyama, T., Sato, J. and Ogasawara, N. (1983). *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1–10.
Umezawa, T. and Higuchi, T. (1985). *FEBS Lett.* **192**, 147–150.
Umezawa, T. and Higuchi, T. (1986). *FEBS Lett.* **205**, 293–298.
Van Soest, P. J. (1963). *J. Ass. Off. Agric. Chem.* **46**, 829–836.
Van Zyl, J. D. (1978). *Wood Sci. Technol.* **12**, 251–259.
Vance, C. P., Kirk, T. K. and Sherwood, R. T. (1980). *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**, 259–288.
Venverloo, C. (1969). *Acta Bot. Neerl.* **18**, 241–314.
Vidrine, D. W. (1979). *J. Chromatogr. Sci.* **17**, 477–482.
Wagner, B. A., To, T., Teller, D. E. and McCarthy, J. L. (1986). *Holzforschung* **49** (Suppl.), 67–73.
Wardrop, A. B. (1971). *In* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Formation" (Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. eds), pp. 19–41. Wiley Interscience, New York.
Wardrop, A. B. (1976). *Appl. Polymer Symp.* **28**, 1041–1063.
Wardrop, A. B. (1981). *In* "The Ekman-Days: International Symposium on Wood and Pulping Chemistry," pp. 44–50. S.T.F.I., Stockholm.
Watanabe, T., Kaizu, S. and Koshijima, T. (1986). *Chem. Lett.* 1871–1874.
Wayman, M. and Obiaga, T. I. (1974). *J. Appl. Polymer Sci.* **18**, 1943–1952.
Wegener, G. and Fengel, D. (1979). *Tappi* **62**, 97–99.
Wegener, G., Przylenk, M. and Fengel, D. (1983). *Holzforschung* **37**, 303–307.
Weichelt, T. (1977). Transactions of the International Peat Congress, Poznan, September 1976. 9 pp.
Weichelt, T. and Ziechman, W. (1977). *Naturwissenschaften* **64**, 638–639.
Westermark, U. (1985a). *Wood Sci. Technol.* **19**, 223–232.
Westermark, U. (1985b). *Wood Sci. Technol.* **19**, 323–329.
Westermark, U., Lidbrandt, O. and Eriksson, I. (1988). *Wood Sci. Technol.* **22**, 243–250.
Whiting, P., Favis, B. D., St-Germain, F. G. T. and Goring, D. A. I. (1981). *J. Wood Chem. Technol.* **1**, 29–42.
Whiting, P. and Goring, D. A. I. (1982a). *Paperi Puu.* **10**, 592–594, 599.
Whiting, P. and Goring, D. A. I. (1982b). *Holzforschung* **36**, 303–306.
Whiting, P. and Goring, D. A. I. (1982c). *Wood Sci. Technol.* **16**, 261–267.
Whitmore, F. W. (1976). *Phytochemistry* **15**, 375–378.
Whitmore, F. W. (1978). *Phytochemistry* **17**, 421–425.
Whitmore, F. W. (1982). *Phytochemistry* **21**, 315–318.
Wilson, J. O. (1985). *Appl. Env. Microbiol.* **49**, 478–484.
Wolter, K. E., Harkin, J. M. and Kirk, T. K. (1974). *Physiol. Plant.* **31**, 140–143.
Yaku, F., Tsuji, S. and Koshijima, T. (1979). *Holzforschung* **33**, 54–59.
Yamazaki, T., Hata, K. and Higuchi, T. (1978a). *Holzforschung* **32**, 44–47.
Yamazaki, T., Hata, K. and Higuchi, T. (1978b). *Holzforschung* **32**, 20–22.
Yan, J. F. (1981). *Macromolecules* **14**, 1438–1445.
Yan, J. F. and Johnson, D. C. (1980). *Agric. Fd Chem.* **28**, 850–855.
Yannoni, C. S. (1982). *Acc. Chem. Res.* **15**, 201–208.
Yasuda, S. and Ota, N. (1987). *Holzforschung* **41**, 59–65.
Yasuda, S. and Sakakibara, A. (1976). *Mokkuzai Gakk.* **22**, 606–612
Yasuda, S. and Terashima, N. (1982). *Mokkuzai Gakk.* **28**, 383–387.
Yasuda, S., Terashima, N. and Ito, T. (1980). *Mokkuzai Gakk.* **26**, 552–557.
Zavarin, E., Nguyen, C., Worster, J. R. and Romero, E. (1982). *J. Wood Sci. Technol.* **2**, 343–370.
Ziechmann, W. and Weichelt, T. (1977). *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* **140**, 645–655.
Zimmermann, W., Nimz, H. and Seemuller, E. (1985). *Holzforschung* **39**, 45–49.

ELSEVIER

PII: S0141-3910(97)00166-3

Polymer Degradation and Stability **59** (1998) 53–64
© 1998 Elsevier Science Limited. All rights reserved
Printed in Northern Ireland
0141-3910/98/$19.00

Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants

clic here for the next

Bernard Monties

Equipe de Biochimie des Macromolecules Végétales (INRA), Centre de Recherche Agronomique, 51686 Reims Cedex, France

(Accepted 4 August 1997)

Lignins definition, potential applications, (macro)molecular structures and properties, analytical characterisations and natural *versus* induced variability are reviewed with reference to both the *biological diversity* of lignification patterns in ecotypes, mutants and transgenic plants and the *levels of organisation* of the lignins polymeric networks. A discrimination between a common primary, guaiacyl type metabolism and a more specific secondary, syringyl type is suggested as a base of this variability and properties. © 1998 Elsevier Science Limited. All rights reserved

1 INTRODUCTION

Lignin was very likely identified for the first time as the insoluble residue of acid hydrolysis of woods by applied chemists more than 150 years ago. It is only in the last 50 years that the polymeric structure of lignin based on phenyl propenyl alcohol monomers (lignols) has been demonstrated. Paradoxically, this demonstration was mainly established by organic chemists on the synthesis of lignin model compounds—dehydropolymers (DHP), oligomers and dimers (oligolignols)[1]—and, still less, on direct depolymerzation of isolated lignin.[2] Nevertheless, during the last 20 years it is mainly the biological heterogeneity of the molecular structure of lignin which has been recognised by biological chemists mainly.[3–7]

The plural 'lignins', now currently used, illustrates the increasing awareness of the natural variability of lignins according to their botanical origins, their genetic and ecophysiological determinations and their industrial transformations. It also illustrates the complexity of lignin as polymers, which is related to their numerous patterns of molecular composition and macromolecular organisation.[7]

Currently, with reference to the possibility of applying biotechnologies in the transformation of lignins and lignocellulosic products, such woods and agricultural resources, some aspects of this biological variability and molecular complexity of the transformed lignins from genetically manipulated plants, is reviewed and briefly discussed here.

Indeed, one cannot exclude that the combination of these two factors, which have contributed to the slowness of the technical advances of the transformation of cellulosic products, could not continue to impede expected future development and will remain as the two main current bottle-necks from both a basic and an applied point of view.

Due to lack of space, and taking into account the great number of books and papers recently published, this review is focused on illustrative but non-exhaustive examples of such questioning problems.

In combination with some comprehensive books,[1–9] references are mainly to specific, and even old or forgotten papers, matters considering, successively: lignin definitions; potential or realised applications; molecular structure and analytical approaches; induced versus natural variability and biodegradation which claim that new technologies face unsolved old problems.

2 LIGNINS: SOME PROBLEMS OF DEFINITION

Assuming the procedure pioneered by Freudenberg[1] of characterisation of lignin molecular structure

analytical definition
(§ 104 remarque)

by organic synthesis of oligolignols and DHP, lignins are currently described as natural polymeric products arising from enzyme initiated and chemically driven dehydrogenative polymerization of monomeric units (lignols monomers) based on *p*-hydroxycinnamyl alcohol skeleton.[1–8] From a biological point of view, however, lignins appear also to be synthetized during their polymerization by a non-enzymatic process occurring in the outside of the living cell, the cell wall, during first the cell elongation, and then its enlargement in specialised cell being committed in specific tissues of the different plant organs such as stems, roots, leaves, etc. In addition, care has to be taken on the fact that these non-enzymatically driven reactions of lignification of plant cell walls, have been reported to occur by uneven deposition of oligolignols in a polysaccharide gel, swollen with water.[9] Furthermore, lignification appears to occur with removal of water and shrinkage of the gel. Further lignification has been shown to proceed, in the wood xylem, from the outer to the inner part of the cell wall,[10] but from the inner to the outer part of the cell wall, in other tissue such as sclerenchyma in annual plants.[11] Considering again the aim to provide a more comprehensive definition of lignins, including this biological dimension and including the previously recalled 'organic chemist' statement, it would be necessary to combine three major items which represent major dramatic challenges for future biotechnological transformation of lignins in plant cell walls and related transformed products:

(a) the non enzymatic polymerisation of mixture of lignols;
(b) the polymerisation in a water swollen and shrinking gel; and
(c) the uneven controlled deposition in the cell wall layers.

Even when such an enlarged definition is drawn here, it is beyond any doubt that such a definition, even 'necessary', would be likely, at short-term inadequate, requiring now further adaptations according to the achievements of the current studies on lignin. Such enlargement was not attempted. Only trivial in appearance, this problem of definition has been to our knowledge very clearly stressed more than 25 years ago[12] in the case of molecular models of lignin structure, even when previously stated by others, and even by Freudenberg[1] for example: even now it is too frequently forgotten, assuming that lignin molecular structure is definitively established.

As this type of difficulty is common to any analytical definition based, logically, on an empirical concept (as also stated a long time ago[13]), it is clearly not specific to lignins analysis. Neither a new molecular model or general scheme[1–3,14] has been thus presented or adapted in this review. Highlighting also the need, and this difficulty, to provide a comprehensive definition of lignin at the level of the macromolecular structure and properties, the two modified lignin paradigms suggested more recently by Goring,[14] deserve special attention in relation to the novel lignins.

The original lignin paradigm was formulated several decades ago in relation to the industrial delignification process in the pulp and paper industry (pulping processes), assuming that the properties of the lignin macromolecules made solubles by pulping and were representative of the in-situ lignin from which they were obtained.[15]

Lignin in wood was considered to be an infinite random three-dimensional network polymer, implying a uniform chemistry of the pulping products.[14,15] Based on recent advances in lignin chemistry reviewed in Ref. 14, several properties were found to be incompatible with the uniformity of the lignin network. The most compelling reasons were the heterogeneity of the isolated lignin factors at the molecular scale,[16–20] but also the topochemical differences between lignins in the cell walls and cell layers, as previously emphasized, and also some multimodal molecular distribution patterns indicating likely, selective noncovalent associations,[21–23] which will be discussed in Section 4.

At the present time, a new modified paradigm is currently accepted. It assumes the occurrence of several types of lignin networks which differ from each other, both by their chemical composition, their macromolecular organisation, the types of associations with the other cell-wall components, and according to the genetic and ecophysiological conditions of cell-wall development. Obviously, the modified paradigm requires clearer definitions based on better analytical procedures, which will be discussed later. It is sufficient here to review briefly some potential and realised applications of standard or novel lignins.

3 POTENTIAL AND REALISED APPLICATIONS OF LIGNIN CHEMISTRY

For many decades mainly after the successive oil crises, and taking into account the millions of tons

of industrial lignins, such as lignosulfonates and kraft lignin, produced all over the world, lignins have been considered as potential sources for aromatic synthon, for preparation of pre-polymers which could be used as components, adhesives or binders and polymeric materials.[2,8] Roughly speaking, one is obliged to state that no large mass market has been created to our knowledge even when, in some instances, promising blends incorporating lignins derivatives or by-products have been reported.[8] Despite repeated attempts to purify enough reactive lignin fractions[24] or to introduce new functionalities allowing blending with other derivatives of biopolymers, such as cellulose,[25] the relative proportions of lignin introduced in such lignin-based plastics still remains relatively weak. Recently, however, the possibility to produce by casting, on the laboratory scale, lignin based plastics containing as high as 85% of industrial kraft lignin with interesting tensile properties has been reported.[23] More basic studies thus seem required to improve such products.

Considering the increasing interest for biodegradable packaging material arising from agricultural productions, the possibility to improve starchy biomaterials by blending with lignin preparations has been also studied by casting on the laboratory scale.[26] In relation to the long term target to improve proprieties hydrophobicity and biodegradability performances of such starchy biomaterials, some studies have been also attempted on the behaviour of two types of synthetic model lignin polymer (DHP) also prepared in the laboratory,[27] at the air–water interface. Significant pressure differences were found indicating a correlation between surface area per monomer and the structure of the DHP.

Furthermore, as the molecular structure of DHP can significantly change according the several possible preparation methods, as recently shown by combination of physical, ^{13}C NMR,[28] and chemical[29] analysis and as, furthermore, the radical polymerization pathway which lead to DHP formation is very sensitive to the conditions of preparations, the reproducibility of the synthesis of these DHP has been studied.[29] In this study, the associative colloidal properties were characterised according gel permeation patterns, which will be discussed in Sections 4 and 6.

Even when such basic analysis will contribute to long term advances in the uses of novel lignins and new biomaterials, one has to recognise that the only current applications which seems realisable, in medium terms of about 10 years, concern industrial delignification and pulping processes.

In the case of animal nutrition[30] or of the production of cellulosic fibres,[31] one have also to emphasise a great economical and environmental opportunity. To our knowledge, only preliminary results have been obtained at the laboratory scale mainly to adapt the novel lignins to animal digestibility; they will thus not be discussed here. In fact, even when the first demonstration that lignification affects only the digestibility of forage cell wall was stated 30 years ago,[32] the same author recently classified the identification of the components and of the physiochemical feature of the cell wall again at first priority. Mechanistic models describing the digestibility of forage cell walls have been recently reviewed again.[32,33] Trying to include lignification among the limiting factors most of them suffer the main limitation not to include, for lack of more basic knowledge, the main bottle-neck previously emphasised: the differences between plant species organs (biological diversity) and the chemical variability of lignins organisation from molecular to ultrastructural level (chemical complexity).

These limitations have been identified for normal lignins in non-transformed plants; they are also relevant but likely more difficult to manage, in the case of transgenic plants. In both cases, they are related to the questions of lignin structure and of analytical approaches which will be now discussed.

4 LIGNIN STRUCTURE CLASSIFICATION: SOME QUESTIONS

Concerning first the molecular structure of lignins and emphasizing the need to approach the biological diversity at the levels of macromolecular, associative and colloïdal properties, it seems useful to separate four successive patterns of organisation.

The first one could be a *primary structure* corresponding to the topological sequence of monomeric units. It includes the most frequently monomers encountered in natural lignins: (1) the phenolic: (*p*-hydroxyphenyl)-; (2) the monomethoxylated (guaiacyl)-; (3) the dimethoxylated (syringyl)- cinnamylalcohols.[1–4] One can emphasise the occurrence of other substitution patterns of the aromatic cycle such 5-hydroxy-3-methoxy phenylcinnamyl alcohol (5-OH guaiacyl) described in a relative significant amount of a few percent, in some mutants and/or transgenic plants poplar, maize and tobacco[34–36] but also in small amount

(traces) in natural ecotypes of maize and birch.[37,38] Interestingly, the occurrence of catechol was also reported as methoxyl deficient unit in lignin of the two woods of sweetgun and birch, before and after fungal biodegradation by brown-rot fungi,[38] strengthening the likelyhood of natural non enzymatic incorporation of methoxyldeficient monomers in normal lignins.

The occurrence of other types of monomeric units with different substitution patterns than normal allylalcohols can not be forgotten for the same reasons. This comment concerns particularly the cinnamaldelyde types of monomers reported to occur in CAD transformed tobacco.[39,40] In the case of CAD transformed poplars, however,[34,36] significant contents of only benzaldehydes, and mainly syringaldehyde, were observed in the transformed lignins. To our knowledge, these differences in molecular structure between CAD transformed plant remain unexplained and require further studies. It can, however, be assumed that the reactivity of these aldehydic monomeric units is dramatically changed due to the conjugation of the terminal carbonyl with the aromatic cycle in cinnamaldelydes. As a result, a higher oxydability can be assumed even in mild conditions, allowing both the cleavage of the monomeric unit with formation of corresponding benzaldehydes but also with easier depolymerisation of the lignin and with easier delignification and pulping capacity, which were also reported.[36]

The same comment also holds for the possible occurrence of cinnamic acids directly linked or not as monomeric units in grass lignins. An illustration of such possibility has been recently provided in the case of maize lignin[41] with the exclusive acylation of the terminal alcohol functionality of the sinapylalcohol monomers. A controlled preacylation of these specific monomeric unit was thus suggested to occur before incorporation into the lignin network via oxidative polymerization. This suggestion is in complete agreement with the strong correlation reported during the development of maize internodes between the contents in *p*-coumaric acid and in syringyl monomeric units in lignins.[42] Furthermore, concerning the postulated occurrence of hydroxycinnamic acids, mainly ferulic and *p*-coumaric acid, as bridges between lignin and other cell wall components,[43,44] the direct incorporation of acylated cinnamylalcohol in grass lignin strengthens the possibility of formation of two different types of internal and external bridges previously suggested.[44] Concerning the primary structure and the various types of monomeric units, it is thus finally surprising to observe that the novelties in lignin chemistry arise currently from results obtained as much using normal plants as using transformed plants.

Concerning the other patterns of molecular organisation of lignins, the questions related to the molecular structure of the novel lignins are not uneasy to formulate as published data are scarce and often require confirmation.

Trying thus to avoid any hazardous extrapolation, the three other relevant patterns could be proposed:

- *the secondary structure*, corresponding to the frequency and the sequences of the intermonomeric linkages;
- *the tertiary structure*, corresponding to the three dimensional patterns resulting from cross linking of preformed relatively short or slightly branched elementary chains, joined by labile linkages; and
- *the quaternatary structure*, corresponding to the aggregation of the oligomeric preformed subunits in the cell wall matrix during biosynthesis or separated, as products during pulping procedures.

Taking into account these precautionary comments, lignin structure will be discussed again in the case of transgenic plants with antisense CAD gene, using the only, to our knowledge, detailed reports now published.[34,39,45]

Before discussing these three topics, one has to underline, in relation to the biological dimension of the questions, that the available data correspond to different plant species: woody poplar,[34] and non-woody tobacco,[39,45] transformed with different CAD antisens constructs,[46] affording thus a large range of depression of total CAD activity: from 20%,[45] to more than 70%.[34] Very likely the confusing data concerning the coniferaldehyde contents of these transformed plants: ((a) significant and variable contents as shown by thioaciolysis in tobaccoes,[39,45] (b) small unquantified peaks, shown by PYMS, but only traces as shown by thioacidolysis in other tobaccoes,[39] and (c) not detected by thioacidolysis in poplars with however, substantial recovery in control analysis using mixtures with DHP[34]) could depend on biological differences in the transformant metabolic capacities, even when other biological differences such as cytochemical distribution in the cell wall layers,[47] which will be discussed later, cannot be excluded.

Concerning the secondary structure of such cinnamaldelyde enriched lignin, a molecular model was suggested[45] based mainly on chemical depolymerization by thioacidolysis, which will be discussed later again (Section 5), and by comparison with cinnamaldelyde enriched polymeric lignin model (CA-DHP). With reference to the structure of soluble dimeric products of dehydrogenation of coniferaldehyde,[49] an extended conjugated aldehydic polymer of coniferaldehyde monomer only was drawn.[45] Even when such a stimulating model provides a potential explanation of the wine red colour reported both for CA-DHP[45] and for the reddish colour unevenly distributed in the tissues of the CAD-transformed plants,[34,39,45] it suffers from two main limitations: first, it too directly combine data corresponding to DHP fractions respectively soluble[48] and insoluble[45] prepared according to different procedures, even when it is currently accepted that the structure of DHP change according to these procedures (Section 3 and Ref. 28); second, it does not include alternating coniferyl alcohol units among the coniferaldehyde monomers; such alternance would provide a more accurate view of the possible secondary structure of these CA-DHP prepared, in fact, from mixtures of the two types of monomers.[45] This second points seems particularly relevant with respect to the reported reddish hue. Alternating non-conjugated units would likely change the colour due to weaker interactions between monomers and easier folding of the chromophoric sequences with possible formation of charge transfer-complexes which have been reported to contribute to the colour of lignins.[49] The fact that the colour of other CA-DHP was reported to be pink,[34] in contrast to non-uniform bright red colour of the xylem cell walls of transgenic poplar,[34,36] also agrees with these comments, confirming thus the need of further studies concerning the secondary structure of these novel lignins.

Concerning the tertiary structure, one has to state that only indirect evidence has been reported for possible changes in relation to the extractibility after alkaline treatment. An easier extractibility has been claimed in the case of tobacco[39,45] and also in the case of transgenic poplar wood having a higher relative contents in alkali soluble lignin fractions and a lower contents in residual lignin (kappa number) in corresponding cellulosic pulp.[34] Even when publications concerning, this so-called tertiary structure of lignin is scarce and frequently forgotten in biological reviews, it seems relevant to take them into account as they could provide very stimulating means to improve the changes of alkali solubility in transformed plants. Due to the very rough data now available, only the conceptual basis was summarised here.

The conceptual tertiary structure lignins assumed here are directly based on the molecular theories of delignification pioneered more than 20 years ago;[50,51] they consider the solubilisation of lignin and the pulping processes as the progressive degelation of the lignin networks occurring in the cell-wall layer (Section 2). Three successive steps are assumed to occur:[51] the first one is the *cleavage* of some specifically labile linkages, mainly aryl-alkyl-ethers, and the release of so called elementary chains followed then by *deactivations and repolymerizations* of these reactive smaller fragments and a *termination*, with dissolved polymers (ω-lignin) containing only uncleavable or condensed bonds.

In agreement with the general formalism of the depolymerization of gels, lignin was in a first step,[50] described as a three dimensional gel composed of relatively short, linear or slightly branched chains of 18 phenylpropane units. This first model structure was approximated according to the molecular model of Freudenberg,[1] assuming that the benzylaryl ether linkage as the easily cleaved bond. According to more precise kinetic studies of delignification, it is now currently accepted that the short linear chains are not uniform in length and have a most probable distribution.[52] The tertiary structure of lignins networks considered from the point of view of alkaline solubility could thus be a result of crosslinking of size dispersed elementary chains forming an insoluble gel, at high conversion.

Concerning now again the increased alcaline solubility of CAD transformed lignins, it can be suggested that in addition to a direct activation effect of the carbonyl functionality on the cleavage of aryl–ether linkages, discussed earlier, the higher extractability of fragments of lignin in transformed plants and finally the proportions between soluble and residual lignins in cellulosic pulp could depend also on the size and shape and on cell wall localisation of the *different* lignin networks. Experimental results[53,54] have long ago indicated that the lignin removal, during pulping, can be explained as a simple diffusion of flat disc-like fragments of lignin through the water-swollen cell-walls, remembering the need to take also such factors to explain the surprisingly large variability observed between the residual lignin content in pulps and the antisens

repression of CAD activities in poplars.[36] Not enough data have been published to discuss these points more in detail. For the same reason, OMT transformed lignin properties from tobacco[35] and poplar[55] are not discussed. It even has been suggested that the reduced proportion of dimethoxylated syrinyl monomers in these transgenic lignins is likely to lead to a more condensed polymer richer in quinones and carbon–carbon resistant linkages.[55]

Concerning the last pattern of organisation—quaternary structure as related to the associative or so called colloïdal properties of lignins—no experimental data concerning transformed lignins have been published to our knowledge. As previously emphasised (Section 3), these last properties are, however, interesting to discuss as they may concern both the biodegradability and the performances of lignin based materials.

The associatives and colloïdal properties of lignin preparations have been implicated for their biodegradation *in vitro*,[56] in terms of electrostatic and Van der Waals interactions involving polar and a polar groups of lignin macromolecules, which will be briefly discussed later (Section 5). Also related to this so called quaternary structure, effects of temperature and of carbonyl groups have been reported on the structure and properties of lignin monolayers,[57] indicating that such molecular characteristics may be more relevant to cell wall organization than those derived from polymer solution properties. Both of them are considered with in this symposium,[29,58] in the case of models with the aim of future studies on natural lignins.

Stressing now that the categorisation of lignins network structure in the four patterns, suggested here, could appear somewhat artificial when compared, for example, with the corresponding one now accepted for proteins, the main advantage of such a classification would be to provide a systematic framework for more extended lignins characterisations. Care has to be taken, however, of the choice of analytical procedure on which such grading can be based. This question will be briefly discussed now.

5 ANALYTICAL APPROACHES OF LIGNINS VARIABILITY

As methods in lignin chemistry were comprehensively reviewed[6,7] and difficulties again discussed,[20] the aim here is to emphasise some of the characteristic difficulties (risks) of misinterpretation to be feared in the case of studies of unusual transformed lignins.

In addition to the general and too frequently forgotten need to combine independent methods at each of the levels to be studied,[7] a more specific requisite, in the case of unusual lignins, is to control carefully the accuracy of each standard procedure in terms of the type of transformation realized. As discussed elsewhere,[20,55] a clear illustration of such needed control is the fact that, in the case of OMT transformed plants able to contain some methoxyl deficiency like 5-OM-guaicyl monomeric units, oxydative degradation procedures such as nitrobenzene oxidation have not to be used as they oxidatively destroy this unusual monomer.[7] Imperatively one has to select some procedures protecting these labile structure such as acidolysis after functionalisation[38] or thioacidolysis.[6,37]

A second illustration which has to be stressed here concerns again the nitrobenzene oxidation, as one of the reference procedures[2,6] to characterise the monomeric composition of lignins.

It has been shown about 30 years ago[59] and confirmed[60] that the yield of depolymerization (and thus the corresponding calculated composition) significantly changed according to the type of tissue and the temperature in the range between 160 and 190°C. Such results are particularly relevant when the chemical composition of differents tissues or organs is compared according to their stage of development, but this is not so in the case of mature wood (xylem) and this is not clearly stated in the reference books of lignin chemistry.[2,6] In the case of unusual and/or acylated monomeric units, as discussed in Section 3, these problems are, however, relevant as varying the temperature of degradation in the case of wheat lignin has indicated a higher complexity of likely the secondary structure[61] for example. Similar effects in the case of other species (sorghum and maize) have thus been also comparatively studied.[62] In the frame of the current genetic transformation of lignification of maize and of further analysis of some corresponding b.m. mutants for example,[42] such adaptations were particularly relevant for characterisation of mutants as it is well known that the digestibility of grasses cell walls can be increased by alkaline treatments affecting, among other components, the lignins networks in the cell wall layers;[42] it will very likely also be important to consider for future transformants of grasses.

Due to lack of space, the other comments concerning the analytical approaches of lignin structure will be limited to three points—determination of total content and characterisation of primary and of secondary structures.

Total content of lignins has for a long time, been clearly recognised as a difficult task even in the case of the standard procedures by acid swelling and precipitation.[6] Underestimation by loss of acid soluble fraction and overestimation by copolymerisation with non lignin components has been clearly evidenced.[2,6] In the case of transformed plants frequently studied at a juvenile stage of development, care has thus to be taken for coprecipitation with structural cell wall proteins[63] which has been reported as contamination of Klason lignin and which occurs in relatively large amounts, more especially in young primary cell wall layers, and even in woods.[64,65] A combination of procedures has thus to be recommended again, taking into account, however, the possible change of chemical properties of transformed lignin, alkali solubility or chromophoric properties (Section 3) which could thus affect the accuracy of the determination of lignins content.

Concerning the monomeric composition and primary structure, changes in the nature of the depolymerization products and yields has to be checked in the case of transformed lignins.

The difficulties concerning the oxidative procedure, such as nitrobenzene oxidation, having been illustrated previously, only the acidolytic procedures (acidolysis, thioacetolysis and thioacidolysis[26]) will be considered now.

Acidolytic procedures have the invaluable advantage to cleave selectively the most characteristic and frequent arylalkylether linkages, whatever the type of monomers. They further allow the recovery of non-substituted, so-called non-condensed monomers (NCM) and a series of oligomeric units linked by non-cleaved linkages, so-called condensed monomers (CM). Among them, dimeric degradation products have been identified using both thioacetolysis[66] and thioacidolysis,[67] with reproducible and relatively high yields of about 70% of the total in situ wood lignin contents, in both cases.[66,68] Due mainly to this selectivity, acidolytic procedures are very well adapted to study novel lignins. Due to its high sensitivity and reproducibility, thioacidolysis revealed itself as a convenient method to characterise transformed lignins.[34–39,45] Even when uncomplete cleavage of some acylated monomeric units was confirmed after thioacidolysis of grasses lignins,[69] its combination with other degradation procedures such as microwave assisted alkaline degradation,[70] or other alternate methods[69] is thus recommended. In this respect, two-dimensional NMR has to be also considered,[71] even suffering the major general drawback of requiring solubilization of lignins fractions. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry (MALDI) of lignins,[72] would be further a method of choice to approach the composition and the secondary structure of the transformed lignins as it has allowed to directly describe the molecular weight distribution, up to nanomers and decamers, of respectively native birch and sequoia lignins fractions.[72]

Concerning finally the secondary and tertiary structures, one have to stress that no gel permeation data concerning transformed lignins have been published to our knowledge, even when the interest of such methods is recognised[23,51,73,74] in delignification, leaching and/or alkaline solubilisation-studies previously considered (Section 4). Complementary to the recommended use of acidolytic methods for characterisation of lignin composition, the interest to combine mild acidolysis[66] and thioacidolysis[75] with gel permeation chromatography of the depolymerization products has thus to be stressed here. Being easier to use than MALDI, and due to a good reproducibility, they could allow comparative fingerprinting of the depolymerization products corresponding to the elementary chains as previously discussed (Section 4, Refs 50, 51). The interest of such procedure will be later again discussed when considering lignins biodegradation[76,77] in Section 6.

Having now reviewed successively some aspects of the definitions and the potential interest of lignins in relation to their complex molecular structure whatever they arise from natural or transformed plants, a first tentative conclusion can be drawn emphasising the need not to limit their characterisation to a rough monomeric composition (nature and frequency of both condensed and non condensed monomers).

It is suggested to consider more systematically the other levels of macromolecular complexity such as the so called secondary, tertiary and quaternary patterns of organisation even when such classification could be somewhat artificial. In this respect, the rough use of the procedures described in the reference books has to be revisited and when necessary, adapted by changing the conditions of reaction in order to take analytical advantages of

stronger[61,70] or/and milder[66,78] degradation conditions. The final aim is the characterisation of the macromolecular properties of lignins networks fractions, so priority has to be given to the milder adaptations. In agreement with this suggestion the possibility of extensively cleaving ether linkages by mild hydrolysis, was recently confirmed.[79] These data are very interesting as they indicate the possibility of recurrent homolytic cleavages of the terminal unit such as coniferyl alcohol or coniferaldehydes, by a kind of peeling reaction and thus could provide complementary information on the lignins network organisation.

6 BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LIGNINS VARIABILITY

Considering now the biological variability as the second component of the bottle-neck concerning the novel lignins in transformed plants, one has to first underline that, until now, this variability has been quite exclusively expressed in terms of changes in monomeric composition in non condensed monomeric units (NCM), calculating eventually by difference the corresponding contents in condensed units (CM).[32,34–36,45,80–82] As previously stressed, for methodologically unavoidable reasons, all these characterisations are limited to a significant fraction of the total content and have thus to be considered as relative. Comparing thus now the syringyl (S) to guaiacyl (G) ratio corresponding to the NCM in the case of transgenic plants, natural mutants with their normal control plants, Table 1 shows that the natural variations in both total (S+G) and relative (S/G) yields are larger than those induced, until now, by genetic transformations. Further Table 1 allows one to compare the composition of corresponding tissues (phloem versus xylem) from the stems of some other natural plants, indicating even more large differences. Nevertheless and even when NCM content provides an incomplete description of the total lignins, these evidences of such large and significant variations between controls and transformed are unambiguous even when the origin of these variations remains largely not understood. As a matter of fact, one has to strongly emphasise that most of these comparisons were based on analysis of whole stems samples and thus confuse not only the different types of networks from the cell wall layers but also several anatomical levels from cells in the same tissue to organs for examples.

Table 1. Biological variability in non-condensed monomeric syringyl (S) and guaiacyl (G) units as shown by thioacidolysis (yields in micro-moles per gram of total Klason lignin, mean standard deviation less than 5%)

		S+G	S/G	Ref.
Poplar	(T)	318	1.36	36
	(C)	414	1.67	
Tobacco	(T)	360	0.85	39
	(C)	361	0.75	
Maize	(M)	723	1.47	42
	(C)	787	3.23	
Sorghum	(M)	101	0.82	83
	(C)	761	0.97	
Alfalfa	(P)	645	0.40	11
	(X)	976	0.22	
Kenaf	(P)	1766	8.10	84
	(X)	2270	1.33	
Rose	(P)	146	1.75	85
	(X)	759	1.48	

T = CAD transformed; M = brown midrib mutant; P = phloem (stem); X = xylem (stem); C = control plant.

The differences between the S+G and S/G values (Table 1) for xylem and phloem clearly demonstrate this fact. Further, it has been also reported that such values significantly change according to the stage of development of the stems in the case of alfalfa,[11] but also according to manipulation of the stem development after treatment with mixtures of growth factors, in the case of Colevs[86] and Kenaf.[84]

These variations allow one to consider in more detail the possible cytochemical origin of such differences. A very elegant and relevant demonstration of this fact has been recently provided in the case of antisense CAD transgenic tobacco.[87] In addition to significant differences of absorption spectra of fiber and vessel, a novel lignification pattern was observed in the fiber at the cell corner regions, suggesting that this antisens-CAD-gene construction may cause other unexpected regulatory effects on cell wall formation than only a reduction of the cinnamaldehydes content. Such suggestion requires validation in the case of other transformants. It, further deserves interest as a specific relative enrichment of coniferaldehyde and coniferyl alcohol terminal units has been reported in the cell wall of Spruce fibres, between the primary and the secondary wall layers[88] as this increase coincides with a preferential region of cleavage during chemi-mechanical pulping. Such topochemical effects, if confirmed to also occur in the case of transgenic CAD poplar, could not only contribute to explaining the easier pulping previously discussed[36] but also the differences of stiffness and modulus of elasticity reported in the case of antisens CAD transformed tobaccoes.[89]

Another point concerning the biological variability of plants transformed by antisense manipulations requiring a brief comment is the reddish colours associated with the xylem of both OMT.[35] and CAD[34,39,45] transformants. These reddish colourations were drawn closer to the brown-reddish colour of the midribs of the b.m. mutants of Maize or Sorghum without, however, any unambiguous chemical data to strengthen such ranking. As the red colour in the case of CAD transformed Poplar appeared to be associated to varied chromophoric systems, only partly soluble and unstable in alkaline solution[34] but solubilised in standard pulping conditions, it seems safer to accept thus the hypothesis of a coniferaldehyde related chromophoric structure[48] in the case of antisens CAD transformed plans. In the case of an OMT transformed plant, the contribution of quinone-related chromophoric structure, discussed in Section 4, seems more likely. One has to stress, in this respect, the multiple possible origins of such induced reddish colour reported for example also to be linked to synthetic DHP from *o*-diphenolic monomers such as cafeoyl alcohol[90] and even after feeding ferulic acid, to the veins of Timothy grass leaves after in-vitro ageing.[91]

Finally, even when to our knowledge, no study has been published concerning the chemical aspects of the biodegradation of any transformed lignins, the biodegradability of standard lignins deserves some comments related mainly to the effects of colloïdal properties and monomeric structure.

Focussing the comments on biodegradation by oxydative enzymes, one has first to state that most of the studies have been based only on oligolignols and mainly dimers and that the macromolecular dimension of the problem has been thus, even now, too frequently neglected. This situation compares with digestibility, as previously discussed (Section 3).

The fact that the quaternary structure of lignin network affects its biodegradability has been established using colloïdal solutions of isolated lignin, as compared to the oxidation of the same lignin preparations precipitated in water medium.[92,93] As the kinetic of oxidation was very rapid with colloïdal lignin as compared with the precipited one, and as the molecular size distribution shown by GPC confirmed these effects, it was concluded that the physical state of macromolecular lignin preparations affects their biodegradability. The physico-chemical mechanism of this effect remain unexplained, as very likely it depends of the occurrence of small size cofactors and proceeds by simultaneous polymerization and depolymerization reactions which could be compared to those categorised in the case of delignification (Section 4).

More recently comparing the reaction mechanism of several peroxidases, the effect of free terminal phenolic functionalities was evidenced indicating that only lignin peroxydase was able to cleave G and S aryl–ether linkages in non-phenolic lignins prepared by exhaustive methylation.[77] These results suggested that the oxidative degradation of dispersed lignins preparation could proceed through recurrent bond cleavage and formation of phenoxy radical in a way which compares to the peeling type reaction previously discussed in the case of mild homolytic delignification.[79]

This similarity is probably not fortuitous and require further studies but cannot be discussed more in detail here due to lack of data on transformed plants.

Having illustrated the importance of the biological variability of lignins, a second tentative conclusion can be drawn stating that whatever the type of changes predictable in the chemical structure and properties of transformed lignins, care has to be taken absolutely on the biological dimension of the variability resulting both from the space and time control of the expressions of the genes and from the ecophysiological regulation of the corresponding metabolic processes. In this respect the tissue changes in the types of lignification illustrated in Table 1 and discussed elsewhere[11,85,87,88] appear to be of paramount importance for the future uses of lignins and of transformed plants, and thus require further studies.

7 GENERAL CONCLUSIONS

As a first general conclusion, it can be stressed that very significant progress seems possible in the two bottle-necks—chemical complexity of lignins networks and biological variability of lignification—which mainly impede the advances in utilisations of lignocellulosic products by use of novel lignins and genetically transformed plants. Ironically, however one can emphasise that the naturally existing variability, until now described, is very large and even larger than the corresponding one induced by transgenesis of natural plants. In this respect, the ability of evoluted plant to produce reaction woods with dramatic changes in the lignin structure and mechanical properties,[94–96] which could not be

discussed here, is very relevant. A natural poplar clone producing high quality pulp has even been identified among other clones and characterised by its natural ability to produce less lignin in its reaction wood, providing better properties after pulping.[97]

A second general conclusion could emphasise the much larger variability in lignification patterns involving syringyl units versus guaiacyl ones, as shown in Table 1, for example, in the case of both transformed and normal plants. Referring to the metabolic discrimination between primary and secondary metabolism which are respectively common or specific of the most evoluted plants, it could be stated that guaiacyl metabolism seems of the primary type, mainly associated to vessels and translocation *common* to the so called evoluted plants, and that it can be opposed to the syringyl metabolism, mainly associated to fibre cell wall and mechanical properties much more *variable* and *adaptable*, as in the case of reaction woods. Such differences, which have not been discussed until now in the case of normal and transformed plants, could be of great practical interest when considering possible new productions and uses of transformed plants.

Finally, care has to be taken not to undervalue, however, some unforeseen difficulties as stated in the Introduction. The conclusion of an excellent review, too frequently forgotten, of Erdtman always holds (and can be adapted):

> "In these days when many lignin (bio)chemists appear to believe that the ultimate solution of the lignin problem is near, it may be useful to remember that our belief is greater than our exact knowledge."[98]

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Dr B. Cathala for critical views and suggestions concerning this manuscript.

REFERENCES

1. Freudenberg, K., in *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, ed. K. Freudenberg and A. C. Neish. Springer, Berlin, 1968, p. 45.
2. Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (eds), *Lignins—Occurrence, Formation, Structure and Reactions.* Wiley Interscience , New York, 1971, pp. 1, 43, 95, 165.
3. Higuchi, T. (ed.), *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components.* Academic Press, London, 1985, pp. 141 and 557.
4. Fengel, D. and Wegener, G. (eds), *Wood—Chemistry, Ultrastructure, Reactions.* De Gruyter, Berlin, 1984, p. 132.
5. Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, D. R. and Ralph, J. (eds.) *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993.
6. Lin, S. Y. and Dence, D. W. (eds) *Methods in Lignin Chemistry.* Springer, Berlin, 1992.
7. Monties, B., in *Methods in Plant Biochemistry*, ed. J. B., Harborne. Acad. Press London, Vol 1, 1989, p. 113.
8. Glasser, W. G. and Sarkanen, S. (eds) *Lignins—Properties and Materials.* A.C.S. Symp. Ser. No. 397. Amer. Chem. Soc, Washington, DC, 1989.
9. Terashima, N., Fukushima, K., Le, L. F. and Takabe, K. in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility.* ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 247.
10. Takabe, K., Fujita, M., Harada, H. and Saiki, H. *Mok. Gakk.* 1981, **27**, 813.
11. Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y. and Monties, B. *Ann. Botany.* 1996, **78**, 625.
12. Shakakibara, A., in *Recent Advances in Phytochemistry*, 1977, **11**, 117.
13. Kant, E., in *Logik* (French trans. L. Guillermit). Vrin, Paris, 1989, p. 152.
14. Goring, D. A. I., in *Lignins—Propertiers and Materials*, ed. W. G. Glasser and S. Sarkanen. A.C.S. Symp. Ser. No. 397. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 1989, p. 1.
15. Goring, D. A. I., in *Lignins—Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, ed. K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig. Wiley Interscience, New York, 1971, p. 695.
16. Fengel, D. and Wegener, G., in *Wood—Chemistry, Ultrastructure Reactions*, ed. D. Fengel and G. Wegener. De Gruyter, Berlin, 1984, p. 149.
17. Higuchi, T., in *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, ed. T. Higuchi. Academic Press, London, 1985, p. 141.
18. Monties, B., *Ann. Proceed. Phytochem. Soc.*, 1985, **25**, 161.
19. Monties, B., in *Dietary fibre—chemical and biological aspects*, ed. D. A. T. Southgate, A. K. Waldron and I. I. Johnson. *AFRC—I.F.R. NORWICH–Royal Soc. Chem. spec. pub.*, 1990, **83**, 50.
20. Monties, B., in *Recent progress in the analysis of dietary fibres*, ed. A. Sorensen. *COST 92 Europcan Com.*, 1995, p. 79.
21. Lindstrom, T., *Colloïd Polym. Sci.*, 1979, **256**, 277.
22. Sarkanen, S., Teller, D. C. and Mac Carthy, J. L., *Macromolecules*, 1984, **17**, 2588; 1981, **14**, 426.
23. Li, Y., Mlynar, J., Sarkanen, S., Proceed. 8th Int. Symp. Wood Pulping Chem., (ISWPC), Helsinki, 1995, Vol. 1, 705.
24. Yoshida, H., Mork, R., Kringstadt, K. P. and Hatakayama, H., *J. Appl Polym Sci.*, 1990, **40**, 1819.
25. Rials and Glasser, W., in *Lignins—Propertiers and Materials*, ed. W. G. Glasser and S. Sarkanen. A.C.S. Symp. Ser. No. 397. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 1989, p. 464.
26. Baumberger, S., Lapierre, C. and Monties, B., *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**, 273.
27. Cathala, B., Aguie-Beghin, V., Douillard, R. and Monties, B., *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**, 77.
28. Terashima, N., Attala, R. H., Ralph, S. A., Landucci, L. L., Lapierre, C., Monties, B., *Holzforshung*, 1996, **50**, 9, 521.
29. Cathala, B., Monties, B., Saake, B. and Faix, O., *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**, 65.
30. Monties, B. and Calet, C. Proceed 14th General Meeting European Grassland Federation, Lahti, Finland, 1992, **1**, 111.
31. Monties, B. in *New Crops for Temperate Regions.* ed. K. R. M. Anthony and G. Robelen. Chapman and Hall, London, 1993, p. 130.

32. Van Soest, P. in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. H. G. Jung, D. R. Buxton, D. R. Hatfield and J. Ralph. ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 377.
33. (a) Chesson, A., in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. H. G. Jung, D. R. Buxton, D. R. Hatfield and J. Ralph. ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 347 (b) Hatfield, R., in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. H. G. Jung *et al.* ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 258.
34. Tollier, M. T., Chabbert, B., Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., Jouanin, L., Pilate, G., Cornu, D., Baucher, M. and Inze, D., Polyphenols 94, *Les Colloques INRA*, 1994, **69**, 339.
35. Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Fritig, B., Legrand, M., *Plant J.*, 1995, **8**, 465.
36. Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Pilate, G., Jouanin, L., Baucher, M., Van Doorselaere, J., Boerjan, W. and Petit-Conil, M., in *Proceedings of 6th International Conference on Pulp Paper Industry*, ed. E. Srebotnik and K. Messner. Vien University, Vienna, Austria, 1996, p. 319.
37. Lapierre, C., Tollier, M.-T. and Monties, B., *C. R Acad. Sci. 307—serie III*, 1988, p. 723.
38. Kirk, T. K., Adler, E., *Acta Chem. Scand.*, 1970, **24**, 3379.
39. Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M., Boudet, A., Boon, J., Chabbert, B., Tollier, M.-T. and Schuch, W., *Plant J.*, 1994, **6**, 339.
40. Hibino, T., Takabe, K., Kawazu, K., Shibata, D. and Higuchi, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **59**, 929.
41. Ralph, J., Hatfield, D., Quideau, S., Helm, R. and Jung, H. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 9448.
42. Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B. and Barriere, Y., *J. Sci. Food Agric.*, 1994, **64**, 349, 455.
43. Jung, H. G. and Dentz, D. A., in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. H. G. Jung, D. R. Buxton, D. R. Hatfield and J. Ralph. ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 315.
44. Monties, B., in Proceed 6th Internat Symp Wood Pulping Chem (ISWPC), Vol. 1, APPITApub, Melbourne, 1991, p. 113.
45. Higuchi, T., Ito, T., Umezawa, T., Hibino, T. and Shibata, D., *J. Biotechnol.*, 1994, **37**, 151.
46. Boerjan, W., *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**, 47.
47. Peng, F. and Westermark, U., *Holzforschung*, in press.
48. Connors, W. J., Chen, C.-L. and Pew, J. C.; *J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 1920.
49. Furman, G. S. and Lonsky, W. F., *J. Wood Chem. Tech.*, 1988, **8**, 191.
50. Bolker, H. I. and Brenner, H., *Science*, 1970, **170**, 173.
51. Yan, J. F., *Macromolecules*, 1981, **14**, 1438; 1984, **17**, 2137.
52. Yan, J. F., *Science*, 1982, **215**, 1390.
53. Goring, D. A. I., Vuong, R. and Chanzy, H., *J Appl. Polym. Sci.*, 1979, **24**, 931.
54. Johansson, A., *J. Pulp Paper Sci.*, 1985, **11**, J 78.
55. Doorsselaere, J. V., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Petit-Conil, M., Leple, J. C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., *Plant J.*, 1995, **8**, 855.
56. Gilardi, G. and Cass, E. G., *Langmuir*, 1993, **9**, 1721.
57. Luner, P. and Roseman, G., *Holzforschung*, 1986, **40**, 61.
58. Cathala, B., Aguie-Beghin, V., Douillard, R. and Monties, B., *Polymer Degradation and Stability*, 1998, **59**, 77.
59. Venverloo, C. J., *Acta Boot. Neerl.*, 1969, **18**, 241.
60. Iiyama, K. and Lam, T. B. T., *J. Sci. Food. Agric.*, 1990, **51**, 481.
61. Billa, E., Tollier, M.-T. and Monties, B., *J. Sci. Food. Agric*, 1996, **72**, 250.
62. Billa, E., Koukios, E. and Monties, B. Poster proceedings, this symp.
63. Keller, B., *Plant Physiol.*, 1993, **101**, 1127.
64. Westermark, U., Hardel, H. L. and Iversen, T., *Holzforschung*, 1986, **40**, 65.
65. Salmen, L. and Petterson, B., *Cell. Chem. Technol.*, 1995, **29**, 331.
66. Nimz, N., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1974, **13**, 313.
67. Rolando, C., Monties, B. and Lapierre, C., *Methods in Lingin Chemistry*, ed. S. Y. Lin and C. W. Dence, Springer, Berlin, 1992, p. 334.
68. Lapierre, C., in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, ed. H. G. Jung, D. R. Buxton, D. R. Hatfield and J. Ralph. ASA–CSSA–SSSA, Madison, WI, 1993, p. 133.
69. Grabber, J., Ouideau, S. and Ralph, J., *Phytochem.*, 1996, **43**, 1189.
70. Chesson, A., Provan, G., Russel, W., Chabbert, B. and Monties, B., *J. Sci. Food Agric.*, 1997, **73**, 10.
71. Edde, R. M. and Kilpelainen, I., *Res. Chem. Intermed.*, 1995, **21**, 313.
72. Metzger, J. O., Bicke, C. and Faix, O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1992, **31**, 762.
73. Johnson, D. K., Chum, H. L. and Hyatt, J. A., in *Lignins—Properties and Materials*, ed. W. G. Glasser and S. Sarkanen. A.C.S. Symp. Ser. No. 397. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, 1989, p. 109.
74. Wagner, B. A., Teller, D. E. and Mc Carthy, J., *Holzforschung*, 1986, **40**, 67.
75. Suckling, I. M., Pasco, B., Hortling, B. and Sundqvist, J., *Holzforschung*, 1994, **48**, 501, 504.
76. Kurek, B., Monties, B. and Odier, E., *Enzyme. Microb. Technol.*, 1990, **12**, 771.
77. Martinez-Inigo, M. J. and Kurek, B., *Holzforschung*, in press.
78. Freudenberg, K., Chen, C.-L., Harkin, J. M. and Nimz, H., *Chem. Comm.*, 1965, **11**, 224.
79. Westermark, U., Samuelson, B. and Lundquist, K., *Res. Chem. Intermed.*, 1995, **21**, 343.
80. Chapple, C. C., Vogt, T., Ellis, B. and Sommerville, B. R., *Plant Cell.*, 1992, **4**, 1413.
81. Dwivedi, U. N., Campbell, W. C. H., Dalta, J., Bugos, R. C., Chiang, V. L. and Podilam, V. L., *Plant Mol. Biol.*, 1994, **26**, 61.
82. Ni, W., Paiva, N. L. and Dixon, R., *Trangenic Res*, 1994, **3**, 120.
83. Chabbert, B., Tollier, M.-T. and Monties, B., Proceed. 38th Lignin Symp. Japan Wood Res. Soc. Pub. Kagawa, Japan, 1993, Vol. 109, 33.
84. Tollier, M.-T., Chabbert, B., Monties, B. and Aloni, R., Proceed. 1st Industrial Crops and Product, Vol. P4, Maastricht, The Netherlands, 1991, p.25.
85. Chabbert, B., Monties, B., Zieslin, N. and Ben-Zaken, R., *Acta Bot. Neerl.*, 1993, **42**, 205.
86. Aloni, R., Tollier, M.-T. and Monties, B., *Plant Physiol.*, 1990, **94**, 1743.
87. Takabe, K., Saiki, H., Shibata, D. and Hibino, T., in *Recent Adv. Wood Anat.*, ed. A. Donaldson, A. P. Singh, B. G. Butterfield and L. J. Whitehouse. N.Z.F.R. Institute Ltd, 1996, p. 231.
88. Peng, F. and Westermark, U., *Holzforschung*, in press.
89. Hepworth, D. G., Proceed Plant Biomechanics: Biomécanique des Végétaux. Colloques CNRS, Montpellier, France, 1994, p. 81.
90. Freudenberg, K. and Heel, W., *Chem Ber 86*, 1953, 190.
91. Stafford, H., *Plant Physiol*, 1960, **35**, 108.

92. Kurek, B., Monties, B. and Odier, E., *Holzforschung*, 1990, **44**, 407.
93. Kurek, B., Monties, B. and Odier, E., *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, **12**, 771.
94. Scurfield, G., *Science*, 1973, **179**, 647.
95. Bailleres, H., Chanson, B., Fournier, M., Tollier, M.-T. and Monties, B., *Ann. Sci. For.*, 1995, **52**, 157.
96. Chabbert, B., Monties, B., Zieslin, N. and Benzaken, R., *Plant Physiol Biochem.*, 1993, **31**, 241.
97. Petit-Conil, M. and De Choudens, M., Paper presented at Europ. Conf. Pulp Paper Res., Stockholm. Europ Com pub. Doc. C.T.P. no. 1766, 1996.
98. Erdtman, H., *Indust. Engin. Chem.*, 1957, **49**, 1385.

FEMS Microbiology Reviews 13 (1994) 277–284
© 1994 Federation of European Microbiological Societies 0168-6445/94/$26.00
Published by Elsevier

FEMSRE 00353

Chemical assesment of lignin biodegradation some qualitative and quantitative aspects

Bernard Monties *

Laboratoire de Chimie Biologique (INRA), Institut National Agronomique Paris-Grignon (CBAI) Centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon, France

Abstract: The molecular structure of lignins (occurrence of condensed and non-condensed monomeric units and associations with phenolic acids by ether and ester linkages) have been reviewed in this paper. Critical aspects of chemical determination of lignin content and monomeric composition have been discussed in the case of nitrobenzene oxidation and thioacidolysis. As an example of assessment of lignin biodegradation by peroxidases, lignin peroxidase and horseradish peroxidase have been compared, indicating that horseradish peroxidase is a ligninolytic enzyme, confirming the influence of the physical state of lignins on their biodegradability and the general difficulty to characterize biomacromolecules.

Key words: Molecular structure of lignin; Condensed and non-condensed units; Ester and ether linked phenolic acids; Peroxidasic degradation of lignin; Peroxidase; Horseradish peroxidase; *Phanerochaete chrysosporium*

Introduction

Chemical characterization of lignin is not an easy task at both qualitative and quantitative levels, corresponding to the unambiguous identification of lignins and to the determination of the total content, of the types of intermonomeric linkages and of the monomeric composition. As both molecular structure and physico-chemical properties of the macromolecular network are changed during the biodegradation processes, assessment of lignin biodegradation is even a more difficult task.

It is the goal of this paper to (i) briefly recall on lignin molecular structure with emphasis on the occurrence and possible origin of the variability of the frequency of intermonomeric linkages; (ii) review some aspects concerning the determination of lignin content, mainly molecular composition (monomeric composition and intermonomeric linkage frequencies); and (iii) illustrate some of these challenges in the case of peroxidase degradation of isolated lignin.

This discussion has been supported with results recently obtained at Grignon in cooperation of Brigitte Chabbert, Bernard Kurek, Catherine Lapierre and Marie-Thérèse Tollier (manuscript in preparation). To illustrate the difficulties with assessing lignin biodegradation, this review confirms the general need for characterization, like other bio-macromolecules with partly unknown molecular structure, by combining complementary analytical procedures as previously emphasized [1].

* Corresponding author. Tel.: (1) 30 81 54 64; Fax: (1) 30 81 53 73.

SSDI 0168-6445(93)E0079-Y

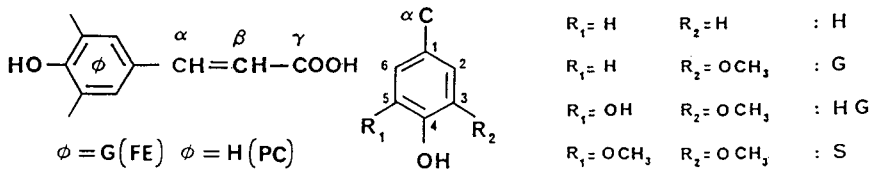


Fig. 1. Molecular structure of the most frequent cell wall-linked phenyl propenoic acids (∅= H or G). Corresponding phenylpropenoid alcohols provide the monomeric units of the lignin macromolecular network.

Variability in molecular structure of lignins

Lignins are currently defined as biological macromolecules resulting from polymerization of hydroxycinnamyl alcohol monomers, mainly by alkyl-aryl ether monomeric linkages. Variability in molecular structure arises mainly from differences in the relative proportions in monomeric units such as phenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) types shown in Fig. 1 and in types of intermonomeric linkages found in the different cell wall layers, cells and tissues according to plant species (Fig. 2).

According to data reviewed previously [1,2], Fig. 2 shows a general scheme of lignin including the prominent types of intermonomeric linkages found in wood lignins: β-O-4 and α-O-4 aryl-alkyl ether, so-called 'non-condensed linkages', and the corresponding β-5′, β-1′, 5-5′, 4-O-5′ and β-β′, so-called 'condensed' linkages as discussed below.

Illustrating the large variability of monomeric composition of wood and grass lignins, Table 1 shows the relative proportions in non-condensed monomeric units recovered from thioacidolysis of in situ lignin. As previously discussed [3], due to its high specificity for aryl-alkyl ether cleavage, thioacidolysis allows for determination of the so-called 'non-condensed monomeric units' which are characterized by a phenyl propane skeleton with a C_6–C_3 structure (Fig. 1) without any carbon–carbon or carbon–oxygen–carbon linkages

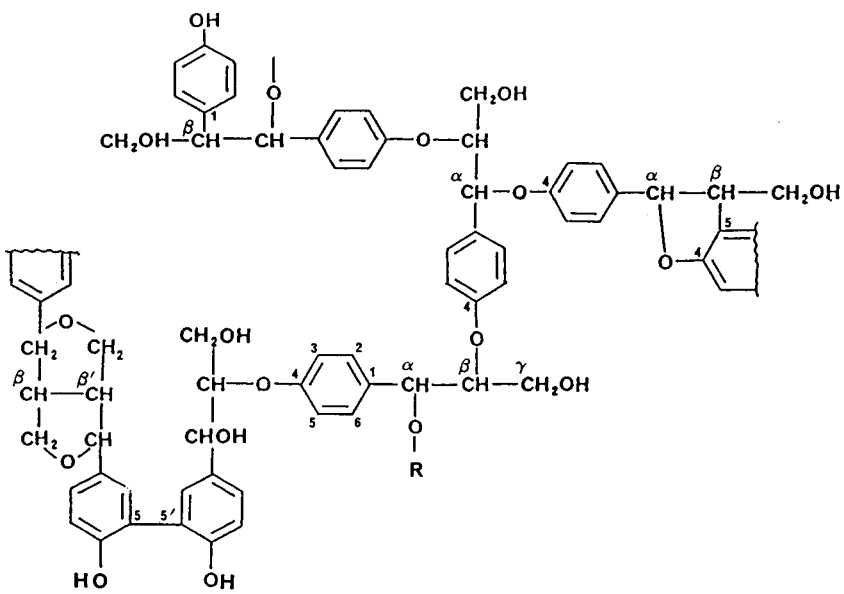


Fig. 2. Prominent types of intermonomeric linkages occurring in wood lignins. R, α-ether linked non-lignin components, such as polysaccharides, in lignin polysaccharide complexes (LCC) as previously discussed [1,2].

found in the 'condensed linkages', as previously specified (Fig. 2). Confirming the large variability in monomeric composition of lignins, previously discussed by Sarkanen [4] for example, Table 1 also shows the occurrence of large variations in the total yields of depolymerization (H + G + S) which are indicative of structural differences between lignins such as for example the relative frequency of condensed and non-condensed monomeric units.

In addition to the molecular heterogeneity extensively studied at Grignon and in other laboratories, particularly at Nagoya by Terashima and co-workers [1,5], the importance of the biological variability in lignin structure has been more and more clearly recognized with for example:

A. the identification of the unconventional 5-hydroxyguaiacyl monomeric units (5 OHG: Fig. 1) in brown-midrib mutants of Maize [6] and of Sorghum [7];
B. the induction of changes in lignification pattern, such as molecular composition in monomeric units and in relative proportions in condensed vs. non-condensed intermonomeric linkages, as shown by total S + G yield, in both xylem and phloem fractions isolated from Coleus [8] and Kenaf [9];
C. biomimetic studies of the dehydropolymerization of coniferyl alcohol (G: Fig. 1) by horseradish peroxidase, showing very significant changes in the molecular structure of these dehydropolymers (DHP) according to the conditions of polymerisation. Confirming the changes in the relative proportions of the non-condensed monomeric units and of the dimeric condensed structure, linked by respectively β-β', β-5', β-1', 5-5' and 4-O-5' previously reported between such DHP [10], Table 2 shows that similar changes can be induced according to the availability of substrates: H_2O_2 formation from glucose–glucose oxidase and coniferyl alcohol formation from the coniferin–glucosidase system [11].

Contributing to changes in both physical properties of the lignin network and in chemical reactivity of monomeric units and intermonomeric linkages, such molecular variability thus increases the complexity of the analysis of lignins.

Table 1

Variability of molecular structure of total in situ lignin from some woods, straws and crop stems lignin

Species	Total (H+G+S)	Percentage (H/G/S)
Notofagus philipiana	2355	n/12/88
Cerasus avium	2528	n/23/77
Populus euramericana	1949	n/39/61
Pinus sylvestris	1141	2/98/n
Robinia pseudoacacia	1926	n/37/63
Medicago sativa	1206	n/64/36
Linum usitatissimum	1260	n/80/20
Triticum sativum	1477	4/43/53
Zea mais	606	4/35/61
Oryza sativa	633	15/45/40

Yields in H, G, S non-condensed monomeric units (see text) in μmol g^{-1} Klason; n, not determined or low relative amount.

Table 2

Changes in molecular structure of synthetic lignins according to the conditions of dehydropolymerization

	Type of units			
	A	B	C	D
Non-condensed				
β,α-aryl ethers	620	700	770	1260
Condensed				
β-β'	25	14	11	Trace
β-5'	66	57	52	33
β-1'	Trace	11	5	26
4-O-5'	Trace	2	4	6
5-5'	9	16	28	35

Four dehydropolymers DHP of coniferyl alcohol were polymerized using horseradish peroxidase at pH 6–7 in phosphate buffer using (A) slow addition of commercial H_2O_2; (B) H_2O_2 generation from glucose/O_2/glucose oxidase; (C) Coniferyl alcohol generation from coniferin/glucosidase; with reference to (D) lignin fraction from spruce (MWL). Yields in μmol g^{-1} of DHP or MWL lignin.

Analysis of sound lignin

Even in the case of 'sound lignins', that is any lignin before any biological or technological transformation, determination of both lignin content and composition requires careful assessment of the effects of the differences in the molecular structure of lignin network on the accuracy of the analysis.

As most of these questions have been emphasized in a comprehensive review on methods in lignin chemistry [12], only some specific aspects concerning determination of lignin content, monomeric composition and associated cell wall-linked phenolics will be briefly reviewed.

Determination of lignin contents

Concerning determination of lignin content, comparing the direct gravimetric (H_2SO_4 precipitation) and the indirect spectrophotometric (acetylbromide solubilization) methods, it has to be emphasized that systematic errors occur during precipitation according to the experimental conditions (reagent composition, time and temperature of reaction) when accuracy of spectrophotometric determination mainly depends on molecular structure differences and changes respectively before and after solubilization. Thus large and systematic errors occur whatever the type of material, for example wood or straws [13]. Some factors affecting the reliability of acid determination of lignin have been also discussed comprehensively by Dence [14], who underlined corrections when accurate value for total lignin content is required in the case of direct methods, and who, pertinently, emphasized that under some circumstances, not one spectrophotometric method represents a viable analytical approach of the absolute lignin content, which is in agreement with previous reviews [1,4].

Monomeric composition characterization

Concerning the determination of the monomeric composition of lignin, and taking into account only the reference method by nitrobenzene oxidation, one has to recall that systematic errors may arise from the choice of both different experimental conditions (time and reaction temperature) according to the type of material. A very relevant demonstration of such errors has been provided by Venverloo [15], who reported dramatic differences in the yield of oxidative degradation products: *p*-hydroxybenzaldehyde (H), vanillin (V), and syringaldehyde (S) according to various times and temperatures of reaction in the case of xylem from Poplar but also according to the types of Poplar tissues (xylem, phloem and tissue culture). As previously discussed, such systematic differences can be tentatively related to differences in lignin structure and reactivity, and require deeper studies. Further, care has to be taken that the S/V or H/S/V molar ratio are not absolute measures of the amount of uncondensed phenylpropane units in lignin due not only to the previous intrinsic lignins factors, as recently emphasized again by Chen [16], but to the extrinsic occurrence of cell wall-linked phenolics such as hydroxycinnamic acids in grasses [5,17], but also tyrosine and tyramine in wounded plant tissues [18] whose nitrobenzene oxidation also provides aromatic aldehydes such as H and/or G.

In this respect, acidolytic procedures [1,19] and particularly thioacidolysis, recently developed in our laboratory [20] provide, as main advantages when compared to nitrobenzene oxidation, a higher selectivity for cleavage of aryl-alkyl ether linkages, allowing a more exact evaluation of the ratio between non-condensed and condensed structure, and a higher accuracy, related to the possibility to characterize ortho-diphenolic structures such as 5-hydroxy-guaiacyl monomeric units, as discussed above, or catechol as biodegradation products, as discussed below. As this has been discussed recently in more detail [1,18,20], these aspects will not be discussed any further in this paper.

Characterization and determination of cel wall-linked phenolic acids

Concerning the phenolic acids related to lignification, one has to recall first that only *p*-coumaric and ferulic acids (Fig. 1) have been unambiguously found as cell wall-linked phenolics restricted to the super order of Comeliniflo-reae which includes grasses (Gramineae) [21]. In addition to the occurrence of cell wall-linked phenolics, grasses can be characterized by a relatively low total lignin content, by systematic occurrence of silica bodies and by a low galacturonan content, suggesting a specific reticulation pattern of cell walls related to lignification [21]. In agreement with this suggestion, as far as the polysaccharides are concerned, ferulic acid – and less frequently *p*-coumaric acid – has been re-

Table 3

Comparison of the total content in *p*-coumaric and in ferulic acids linked to wheat cell wall (CW) by ester and ether bounds

Content	Ferulic	*p*-Coumaric
Alkaline cooking	34.4 ± 0.6	24.8 ± 0.5
Acidolysis	22.2 ± 0.4	24.4 ± 0.8

Total content, determined using alkaline cooking or acidolysis according to ref. [23] or [22], respectively, expressed in $\mu g\ g^{-1}$ CW; mean ± standard deviations (four replications).

ported as ester-linked to xylans when, however, *p*-coumaric acid was preferentially linked to the lignin fraction isolated for example from wheat straw. In agreement with the likely occurrence of independent metabolic pathways of linkage of these phenolic acids to the grass cell wall, the occurrence of ether linkages between mainly ferulic acid and lignin, reported first with Scalbert [22], has been confirmed by Iiyama et al. [23]. Strengthening the hypothesis of a cross-linking function of FE and PC acids in Gramineae cell walls [2,21,22], Iiyama's results were obtained by a combination of two successive alkaline hydrolysis at ambient and high temperature which basically differs from the acidolytic procedure used with Scalbert. Concerning to the critical assessment of lignification pattern, Table 3 compares total contents (ester plus ethers) in cell wall-linked *p*-coumaric and ferulic acid to an extractive cell wall residue of wheat straw, as shown by these two analytical procedures (to be published together with M.T. Tollier). A significant discrepancy, unambiguously found in the case of total ferulic acid only, has been related to the ether content (data not shown) and could be related to the occurrence of two types of ferulic ethers, linked by α and β-ether bounds, respectively. The same type of results have also been obtained recently by Kondo et al. [24] with dioxane-soluble lignin fractions from wheat straw and by E. Billa with high yield pulp from wheat straw (to be published).

Contributing to changes in both molecular structure and chemical reactivity of lignins, such extrinsic factors also contribute to increase the complexity of lignin analysis. The more specific plants species are, the more these variations in lignification pattern have to be taken into account in analytical assesment of lignins.

A case study: peroxidase degradation of spruce lignin

Degradation of lignin by plant peroxidase is currently a fundamental and controversial question. For example, a plant peroxidase from horseradish has been reported to vigorously depolymerize milled wood lignin in organic solvent containing few percent of aqueous buffer while being unable, however, to degrade lignins in aqueous solution [25]. Later on, this statement however has been reassessed by Lewis et al. [26] who, in contrast to these previous claims, reported that vigourous depolymerization of synthetic lignin (DHP: dehydrogenatively polymerized) did not occur in aqueous organic media.

Biomimetic oxidative degradation of a milled wood lignin fraction (MWL) isolated from Spruce wood has thus been studied [27], comparing the effects of a fungal lignin peroxidase (LiP) obtained from *Phanerochaete chrysosporium* and of a plant peroxidase from horseradish (HRP). Taking into account the influence of the physical state of lignin on its enzymic degradability [28], oxidasic degradation was performed on MWL dispersed in water into a colloidal solution; this was achieved by adding lignin as dimethyl formamide solution (10 mg ml^{-1}) into de-ionized water under stirring as previously described [29].

Lignin was oxidized in a non-buffered medium (pH = 5) containing 10% DMF and 1 mg ml^{-1} MWL, by LiP (26 $\mu g\ ml^{-1}$) or HRP (3 or 30 $\mu g\ ml^{-1}$). Enzymes were added every 20 or 120 min, respectively, during 4 h with addition of H_2O_2 every 5 min (66 μM) for LiP and 20 min (100 μM) for HRP. Veratryl alcohol (VA) was added (1.6 mM each 10 min) during LiP experiments (data submitted for publication together with B. Kurek; [29]).

Lignin biodegradation was characterized by combination of size exclusion chromatography and thioacidolysis.

Table 4

Relative changes in molecular structure of spruce MWL lignin after peroxidasic oxidation by HRP and by LiP

Type of units	LiP (change %)	HRP (change %)	MWL control μmol g^{-1}
Non-condensed			
Total monomers	47± 2	80± 2	980
Coniferaldehyde	60± 9	75± 3	46
Vanillin	144±11	95±11	33
Catechol	450±30	120± 6	14
Condensed			
β-5	42±10	76± 3	60
β-1	45± 4	77± 6	59
5-5′	65± 2	92± 4	52
4-O-5′	77± 4	90±10	19

Relative changes in percent of non-oxidized MWL control: means ± standard deviations and composition of MWL control in μmol g^{-1}.

No change in lignin elution pattern was shown after HRP oxidation; the same result was obtained with LiP when VA was omitted. Significant changes in elution pattern, however, were observed when MWL was oxidized by LiP with VA added, as shown by a higher relative content in fractions with higher hydrodynamic volume and a corresponding lower relative content in fractions with a smaller volume. Table 4 compares the molecular structure of the MWL fractions before and after peroxidasic oxidations by LiP and by HRP, respectively. Data are shown for non-condensed monomeric guaiacyl units including the terminal one, for coniferaldehyde, vanillin and catechol units which, due to the mild reductive conditions of thioacidolysis, were characterized unambiguously.

Using GC-MS according to Lapierre [31], Table 4 also shows a preferential relative decrease in β-5 and β-1 dimeric units as compared to the relative changes in 5-5′ and 4-O-5′ units, suggesting a higher susceptibility of these dimeric structure to enzymatic oxidation, the mechanism of which remains unknown. Whatever the differences and even when gel permeation experiments did not allow to demonstrate any biomimetic degradation by HRP, in agreement with Lewis et al. [26], Table 4 allows to conclude that HRP also exhibits ligninolytic properties, in agreement with Dordick et al. [27].

Interestingly, from the point of view of assessment of lignin biodegradation, one can thus emphasize that the opposite conclusions reported in the papers of Dorkic and of Lewis and co-workers, respectively, could likely both be accurate. As a matter of fact, one can suggest that these 'opposite' observations could be related, in addition to other factors such as structural differences in lignin substrate or in enzyme activities, to differences in reactivity related to the physical state of the substrate. Such differences have been evidenced previously, at Grignon, by comparison of H_2O_2 consumption by LiP in the presence of precipited washed lignin, of partially precipitated lignin and of colloidal lignin preparations of the same MWL fractions; according to these differences, the consumption of H_2O_2 was respectively found unsignificant, weak and strong (see p. 411 Fig. 6 of ref. [29]).

In conclusion, again considering the question of assessment of lignin structure and biodegradation, it seems also advisable to recall attention to first combine independent analytical methods as much as possible to characterize sound or degraded lignins and, second, to take into account any possible physico-chemical changes in lignins, as biodegradation substrate, before drawing general conclusions on its biodegradability. Furthermore, one can even emphasize that these two conclusions may apply to any complex polymeric structure whose molecular properties are only partially known.

References

1 Monties, B. (1989) Lignins. In: Methods in Plant Biochemistry (Harborne, J.B., Ed.), Vol. 1, Plant Phenolics, pp. 113–158, Academic Press, New York, NY.

2 Monties, B. (1989) Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organization of lignin networks. Ann. Sci. For. 46 (Suppl.), 848s, 855s.

3 Rolando, C., Monties, B. and Lapierre, C. (1992) Thioacidolysis. In: Methods in Lignin Chemistry (Lin, S.Y. and Dence, C.W., Eds.) pp. 333–349. Springer, Berlin.

4 Sarkanen, K.V. (1971) In: Lignins: occurrence, formation

structure and reactions (Sarkanen, K.V. and Ludwing, C.H., Eds.) pp. 1–17 and 74–79 Wiley-Interscience pub.

5 Monties, B. (1990) Heterogeneity of monomeric composition in gramineae lignins in dietary fibre: chemical and biological aspects (Southgate, D.A.T. and Fenwick, G.R., Eds.), pp. 50–55, Royal Soc. Chem. Spec. Publ. No. 83.

6 Lapierre, C., Tollier, M.T. and Monties, B. (1988) Mise en évidence d'un nouveau type d'unité constitutive dans les lignines d'un mutant de Maïs bm3. C.R. Acad. Sci. 307, Ser. III. 723–728.

7 Chabbert, B., Tollier, M.T. and Monties, B. (1993) Lignin variability among different brown midrib sorghum lines. Proceed 7th Int. Symp. Wood Pulping Chem. (Beijing, China) (in press).

8 Aloni, R., Tollier, M.T. and Monties, B. (1990) The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. Plant Physiol. 94, 1743–1747.

9 Tollier, M.T., Chabbert, B., Aloni, R. and Monties, B. (1993) Effect of growth regulators on lignification in phloem and xylem of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) stems. Ind. Crops Prod. (in press).

10 Tollier, M.T., Lapierre, C. and Monties, B. (1991) Structural variations in synthetic lignins (DHPs) according to the conditions of their preparations. Proc. 6th Int. Symp. Wood Pulping Chem. (Melbourne, Australia) (Wallis A., Ed.), Vol. 2, pp. 35–40. APPITA Publ.

11 Tollier, M.T., Lapierre, C., Monties, B., Francesh, C., Rolando, R. and Terashima, N. (1993) Structural variability in synthetic lignins (DHPs) according to their biomimetic synthesis. Proceed. Amer. Chem. Soc. meeting: Cell division (Denver, CO) Poster session abstract.

12 Lin, S.Y. and Dence, W.D. (1992) Methods in Lignin Chemistry, 578 pp. Springer, Berlin.

13 Monties, B. (1984) Dosage de la lignine insoluble en milieu acide de bois et de paille. Agronomie 4, 387–392.

14 Dence, W.D. (1992) Lignin determination. In: Methods in Lignin Chemistry (Lin, S.Y. and Dence, W.D., Eds.), pp. 33–62, Springer, Berlin.

15 Venverloo, C.J. (1969) Lignin of *Populus nigra*. Acta Bot. Neerl. 18, 241–275.

16 Chen, C.L. (1972) Nitrobenzene and cupric oxide oxidations. In: Methods in Lignin Chemistry (Lin, S.Y. and Dence, W.D., Eds.), pp. 301–321. Springer, Berlin.

17 Scharma, U., Brillouet, J.M., Scalbert, A. and Monties, B. (1986) Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oryza sativa*: characterization of lignin fractions and related phenolic acids. Agronomie 6, 265–271.

18 Borg-olivier, O. and Monties, B. (1993) Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm. Phytochemistry 32, 601–606.

19 Lundquist, K. (1992) Acidolysis. In: Methods in Lignin Chemistry (Lin, S.Y. and Dence, W.D., Eds.), pp. 289–300, Springer, Berlin.

20 Rolando, C., Monties, B. and Lapierre, C. (1992) Thioacidolysis. In: Methods in Lignin Chemistry (Lin, S.Y. and Dence, W.D., Eds.) pp. 334–349. Springer, Berlin.

21 Monties, B. (1991) Recent advances in structural and biosynthetic variability of lignins. Proc. 6th Int. Symp. Wood Pulping Chem. (Melbourne, Australia) (Wallis A., Ed.), Vol. 1, pp. 113–123. APPITA Publ.

22 Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guittet, E. and Rolando, C. (1985) Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions isolated from wheat straw. Phytochemistry 24, 1359–1362.

23 Iiyama, K., Lam, T.B.T. and Stone, B. (1990) Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. Phytochemistry 29, 733–737.

24 Kondo, T., Ohshita, T. and Kyuma, T. (1992) Comparison of characteristics of soluble lignins from untreated and ammonia-treated wheat straw. Anim. Feed Sci. Technol. 39, 253–263.

25 Dordick, J.S., Marletta, M.A. and Klibanov, A.M. (1986) Peroxidases depolymerize lignin in organic media but not in water. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6255–6257.

26 Lewis, N.G., Razal, R.A. and Yamamoto, E. (1987) Lignin degradation by peroxidase in organic media: a reassessment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7925–7927.

27 Kurek, B. and Monties, B. (1993) Is horse-radish peroxidase a ligninolytic enzyme? C.R. Acad. Sci. Paris (in press).

28 Kurek, B., Monties, B. and Odier, E. (1990) Influence of the physical state of lignin on its degradability by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Enz. Microb. Technol. 12, 771–777.

29 Kurek, B., Monties, B. and Odier, E. (1990) Dispersion of lignin in water: characterization of the phenomenon and influence on lignin enzymic degradability. Holzforschung 44, 407–414.

30 Kurek, B. and Monties, B. (1992) Degradation of colloidal spruce lignin by small amounts of purified lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In: Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (Kuwahara, M. and Shimada, M., Eds.), pp. 303–308. UNI Publ. Co., Tokyo.

31 Lapierre, C., Pollet, B. and Monties, B. (1991) Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after Raney nickel desulfuration. Holzforschung 45, 61–68.

Variabilité bio (enz) chim (macro) lignification

848s Ann. Sci. For. (1989) 46 suppl., 848s-855s
Forest Tree Physiology, E. Dreyer et al., eds.
© Elsevier/INRA

Synthèses) bio synt.

⇒ Système organisé par rétro régulation (enz? chim?)

cf ATLAN modèle descrite cristal (simple) complexité (Bigo?)

Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organization of lignin networks

Voir la fin du tout génétique - 1998 - INRA Sem.

question fon sur autoorg paroi regt p 87-78

par Mondre Action élidée en (lettre + cap) à HA : Coop! Lofrany?

B. Monties

Laboratoire de Chimie Biologique, INRA (CBAI), Institut National Agronomique Paris–Grignon, Centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon, France

clic here for the next

Introduction

This review briefly recalls chemical data related to the variations in the molecular structure of lignin and mainly discusses the biochemical heterogeneity and occurrence of associations between lignins and other cell wall components. In an attempt to relate the formation of such lignin networks to possible functions of lignins, a new hypothesis on the self-organization properties of lignin is presented.

From a biochemical point of view, lignins are particularly complex polymers whose chemical structure changes within plant species, organs, tissues, cells and even cell fractions. Furthermore, from a physiological point of view, lignin biosynthesis is unusual in that the final polymerization step is only enzymatically initiated and is random chemically directed. Occurrence of such random synthesis raises the central question of the origin of the biological fitness of lignification to the life cycle of plants. This question is relevant not only for the formation of 'abnormal lignins' and 'lignin-like compounds' in reaction woods, and wounded and diseased tissues but also in the case of 'normal' lignin in wood xylem. Such random polymerization may also be relevant in relation to the evolution of the quality of the lignocellulosic products, such as during heartwood formation, drying of logs and sawings, and hardboard and paper manufacture, as suggested, respectively, for example by Sarkanen (1971), Northcote (1972), Fry (1986), Back (1987), Jouin *et al.*, (1988), and Horn and Setterholm (1988).

This review focuses thus on self-organization and recalls only briefly the chemical and biochemical properties of lignin in relation to other plant cell wall components. Due to edition constraints, only main relevant references are cited.

Molecular structure of lignin

In vitro model studies and *in vivo* experiments (Freudenberg and Neish, 1968; Higuchi, 1985) have shown that the general molecular structure of lignin can be explained by one-electron oxidation of cinnamyl alcohols followed by non-enzymatic polymerization of the corresponding mesomeric free radicals.

Fig. 1 shows the phenylpropane (C_6–C_3) skeleton of the lignin monomers (M) and the structure of 4 of the most common linkages found in lignins. These structures have been established by *in vitro* peroxidase oxidation of mainly coniferyl alcohol (G = Fig. 1), followed by isolation of dimers (dilignols), oligomers (oli-

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

1989 Ann. Sci For. 46 Sup -

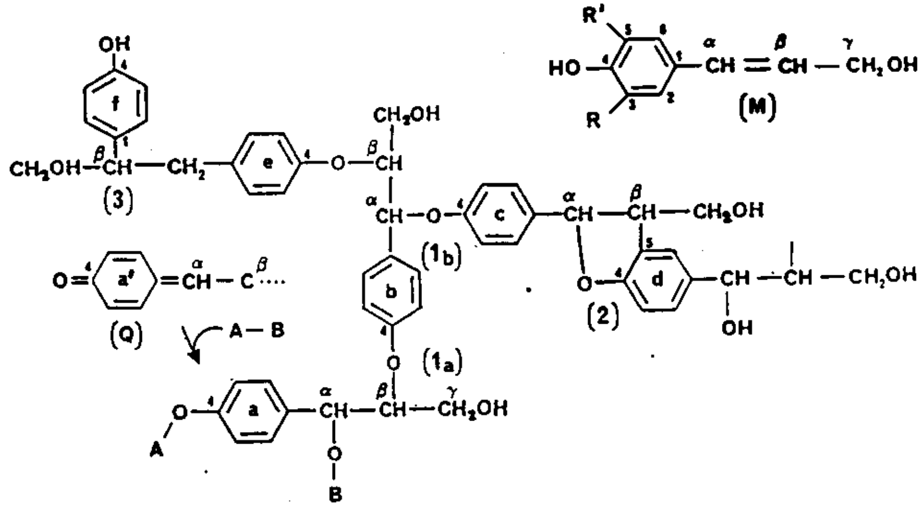


Fig. 1. Molecular structure of lignin monomers and of the more prominent intermonomeric linkages in lignins. Three main types of monomers (M) can be polymerized: *p*-hydroxyphenyl alcohol H (R = R' = H); coniferyl alcohol G (R = H, R' = OCH_3) and sinapyl alcohol S (R = R' = OCH_3). Formation of the terminal A,B-substituted monomeric unit (a) occurs by addition of A–B to the corresponding terminal monomeric unit (a'), with a *p*-methylene quinone structure (Q) as discussed under Biochemical properties.

golignols) and dehydropolymers (DHP model). Model polymerization studies have also shown that the relative frequency of these intermonomeric linkages and, thus, the corresponding macromolecular structure of DHP changes according to polymerization conditions (Sarkanen, 1971), such as, the concentrations and the rate of addition of the reagents, the polarity of the medium or solvents, the electronic and steric effects of the substituents in the aromatic cycle, according to the various substitution patterns of the lignin monomeric units: H, G, S (Table I).

Formation of *para-* and *ortho*-quinone methide has also been suggested during the dimerization of mesomeric oligolignols or monomeric units and during chemical oxidation of simple phenolic model compounds (Harkin, 1966). Intermediate oligolignol-*p*-quinone methides are implicated in the formation of lignin networks. According to *in vitro* experiments, such structures are involved in the growth of the lignin polymer through copolymerization, but also through heteropolymerization with other macromolecules, such as polysaccharides (Sarkanen, 1971; Higuchi, 1985). Fig. 1 shows the addition reaction between a compound A–B and a terminal *p*-methylene quinone unit (a': Fig. 1). Addition of A–B led to the formation of the corresponding A,B-(a) substituted hexalignol (a–f: Fig. 1). Depending upon the structure of A–B and when A is hydrogen, the aromatic character of the a-monomeric unit is recovered with reformation of a phenolic group. This phenolic unit may further polymerize, leading to a trisubstituted monomeric unit or 'branch point' of the lignin network (Pla and Yan, 1984). Such a reticulation process with reformation of a phenolic group could be a significant self-organization property of lignin (see below). Depending upon the A–B structure, the addition reaction shown in Fig. 1 may also be important and thus explain certain macromolecular regulari-

Table I. Effect of the condition of polymerization and of the structure of the monomeric units on the frequency of the intermonomeric linkages in model dehydrogenation.

Solvent conc.[a] *(oxidant)*	*Monomer (structure)*	*Frequency of linkages*[b] *(%)*		
		β-aryl ether	*coumarane*	*resinol*
Water (H_2O_2, peroxidase)	coniferyl	19	54	27
	sinapyl	9	nf	91
Acetone water ($FeCl_3$)	coniferyl	27	27	46
	sinapyl	27	nf	73

[a] Concentration and other conditions of dehydrogenation were different (Tanahashi *et al.*, 1976).
[b] β-Aryl ether and coumarane linkages shown in Fig. 1, respectively 1_a and 2; resinol linkage, in which a β–β carbon–carbon bond occurs between 2 propane chains is mainly obtained during *in vitro* model polymerization but occurs less frequently *in vivo*, as in lignin structure (Fig. 1). nf: coumarane formation is inhibited by substitution on carbon 5 in the case of sinapyl alcohol.

ties in lignin structure. As early as in 1968, Freudenberg and Neish stressed that "the sequence of the individual (monomeric) units in lignin is fortuitous, for they are not moulded like proteins on a template. This does not exclude the occurrence of a certain regularity in the distribution of weak and strong bonds between the units. As a rough estimate, 7 to 9 weak bonds are randomly distributed among 100 units, 'gluing' together more resistant clusters, of an average, 14 units." Such 'clusters' or 'primary chains' of about 18 strongly linked monomeric units have been reported after delignification experiments by Bolker and Brener (1971) and by Yan *et al.* (1984). According to these authors, the weak-bonds suggested by Freudenberg and Neish are mainly α-aryl ether linkages, respectively, intermolecular (C_α–*O*–B bond in a-unit: Fig. 1) and intramolecular (C_α–*O*–4 bond in b-unit: Fig. 1). Confirming the importance of addition reactions with *p*-methylene quinone, such a weak α-aryl ether bond may correspond to a C_α–*O*–B linkage (a = Fig. 1) where B is a phenoxy substituent corresponding to the addition of a BA phenolic terminal monomeric unit. Summarizing the most characteristic chemical properties, lignin does not appear to be a defined chemical compound but a group of high molecular weight polymers whose random structure, which is related to their chemically driven polymerization, does not exclude the appearance of certain regularities in the 3 dimensional network.

Biochemical properties

Biochemical heterogeneity or inhomogeneity (Monties, 1985) is the second main feature of lignin. Characteristic variations in lignin structure and monomeric composition have indeed been found and confirmed between plant species (Logan and Thomas, 1985), between plant organs and tissues grown either *in vitro* or *in vivo* and also between cell wall fractions (Hoffman *et al.*, 1985; Sorvari *et al.*, 1986; Saka *et al.*, 1988; Eriksson *et al.*, 1988). In agreement with these data, which cannot be discussed here in detail, heterogeneity in lignin formation and molecular structure, has been demonstrated in the case of gymnosperms (Terashima and Fukushima, 1988) and in the case of angiosperms (Higuchi, 1985; Monties, 1985; Lapierre, 1986; Tollier *et al.*, 1988; Terashima and Fukushima, 1988). From a biochemical point of view, lignin thus appears to be non-random heterogeneous copolymers enriched by either non-methoxylated (*p*-hydroxyphenyl = H), monomethoxylated (guaiacyl = G) and dimethoxylated (syringyl = S) monomeric units (Fig. 1). These copolymers are unequally distributed amongst cells and subcellular layers, in

tissues according to patterns changing with species. The biosynthesis of the precursors and the regulation of lignification most likely occurs within individual cells and variations are observed according to the type and the age of cells (Wardrop, 1976), as in the case of secondary metabolism (Terashima and Fukushima, 1988).

Molecular associations and cell wall lignification

Formation of molecular associations with other cell wall components is the third main feature of lignins. Indirect evidence of the occurrence of such heteropolymers, mainly based on extractability or liquid chromatographic experiments, has been reported in the case of polysaccharides, phenolic acids and proteins, tannins and some other simple compounds. The types of chemical bonds involved in these associations have been established only for polysaccharides, phenolic acids and proteins, mainly based on model experiments of addition to *p*-methylenequinone discussed previously.

The most frequently suggested types of lignin–carbohydrate complex (LCC) linkages are a benzyl ester bond with the C_6-carboxyl group of uronic acids, a benzyl ether bond with the hydroxyl of the primary alcohol of hexose or pentose, a glycosidic bond with either the C_4-phenolic hydroxyl or the C_γ-primary alcohol of phenylpropane units (M = Fig. 1). The synthesis of LCC model compounds, their reactivity and their chemical or enzymatic stability have been compared to those of wood LCC (Higuchi, 1983; Minor, 1982; Enoki *et al.*, 1983). Recently, using a selective depolymerization procedure, Takahashi and Koshijima (1988) have concluded that xylose participates in lignin–carbohydrate linkages through benzyl ether bonds in LCC from angiosperm (*Fagus* sp.) and gymnosperm (*Pinus* sp.) woods. Macromolecular differences were reported by these authors: in *Fagus*, the lignin moiety of LCC would consist of a small number of extremely large molecular fractions, while pine would have relatively smaller and more numerous fractions, confirming the hypothesis of biochemical heterogeneity of lignins.

Phenolic acids are known to be bound to lignin, especially in the cases of monocotyledons (grasses and bamboos) and Salicaceae (poplars). Ester bonds of phenolic acids to C_α- and C_γ-hydroxyls of monomeric propane chains (Fig. 1), C_5-carbon–carbon bonds and ether bonds at C_4-phenolic oxygen of aromatic cycles (Fig. 1) have been reported in the cases of model DHP (Higuchi, 1980) and gramineae lignins from wheat (Scalbert *et al.*, 1985) and reed, *Arundo* sp. (Tai *et al.*, 1987). Ether linkages of phenolic acids have been tentatively implicated in the characteristic alkali solubility of grass lignins; however, free phenolic hydroxyl groups would also participate in this solubility (Lapierre *et al.*, 1989).

Lignin–protein complexes in the cell wall of pine (*Pinus* sp.) callus culture have been reported: covalent bonds, formed preferentially with hydroxyproline, have been suggested on the basis of selective extraction experiments and of the reactivity of model DHPs containing hydroxyproline, which were more stable to acid hydrolysis than carbohydrate–DHP complexes (Whitmore, 1982). Chemical bonds between lignin and protein have also been recently indicated during the differentiation of xylem in birch wood, *Betula* sp. (Eom *et al.*, 1987). A gradual decrease in phenolic hydroxyl group content and changes in molecular weight distribution during the lignification have also been shown by these authors. These variations were explained in terms of changes in lignin structure in relation to variations in concentrations of available monomers and effects of the conditions of polymerization as discussed above .

Possible associations with other phenolics, such as condensed and hydrolyzable tannins have also been suggested in rela-

tion to the difficulties in completely removing tannins, after solvent and mild chemical extractions of woods and, also in relation to coprecipitation, such as sulfuric acid-insoluble lignin fractions. Mechanisms of random, *i.e.*, chemically-driven polymerization of tannins with cell wall components, have been discussed recently (Haslam and Lilley, 1985; Jouin *et al.*, 1987). However, no evidence of chemical bonds between tannins and lignins was given.

Network formation and self-organization properties

Formation of molecular associations between lignins and cell wall components sheds light on the importance of the phenolic group's reactivity, such as the addition to methylene quinone with phenolic group reformation (Fig. 1), in the reticulation of the plant cell wall. Such reactivity is not unique, since phenol dimerization, by formation of diphenyl and of diarylether bonds, has also been reported for tyrosine during cell wall cross-linking processes (Fry, 1986). Recently, similar reactions have also been suggested for tyramine in the phenolic fraction associated with suberin (Borg-Olivier and Monties, 1989). As very clearly stressed by Northcote as early as 1972, with reference to synthetic fibrous composite, the formation of such cross-linked phenolic polymers may be significant in regard to the structure and functions of plant cell walls. Reticulation may be of importance in durability and mechanical properties, as recently discussed in the case of cell wall proteins by Cassab and Warner (1988). Furthermore, in the case of lignins, this cross-linking phenomenon may be of much more general interest. For example, the formation of chemical bonds in the residual lignin network of thermomechanical pulps has been implicated in the autocross-linking of these cellulosic fibers during the production of paper and hardboard in the so called 'press-drying' process (Back, 1987; Horn and Setterholm, 1988).

In order to try to understand the general formation of phenolic networks by non-enzymatic polymerization processes, self-organizing properties of lignin can be suggested. The self-organization concept comes from the general theory of systems. Self-organization accounts for the manner in which complex systems adapt to and increase their organization under the stimulation of random environmental factors. This theory has been applied extensively to the growth of organisms and transmission of information (Atlan, 1972). Self-organization also seems relevant in the case of lignin, since lignin is a non-enzymatic polymerized macromolecule, its structure changes as a function of random external environmental factors, it rearranges during maturation, ageing or technological transformations and, finally, these changes provide a better fitness of cell wall functions, such as resistance against biotic and abiotic factors.

According to Atlan (1974), a self-organizing system is a complex system in which changes in organization occur with increasing efficiency in spite of the fact that they are induced by random environmental factors; changes are not directed by a template. Self-organization capacity can be expressed as a function of 2 main parameters: redundancy and reliability. When the organization is defined as 'variety and inhomogeneity' of the system, redundancy is viewed as 'regularity or order as repetitive order' and reliability expresses the system's 'inertia opposed to random perturbation'. According to these definitions, the information content, *i.e.*, the organization of a system, can be expressed as a function of redundancy and of time (see Annex). Evolution of the organization as a function of time can thus be calculated showing different types of organization.

Thus, a self-organizing system is characterized by a defined maximum organization resulting from an initial increase in inhomogeneity associated with a contin-

EUROPEAN COMMISSION - DG ENTERPRISE - VERIFICATION

uous decrease in redundancy under the effect of random environmental factors. At the other extreme, a non-self-organizing system shows a continuous decrease of organization, mainly due to a low initial redundancy. Furthermore, intermediate cases have also been described by Atlan (1972, 1974) corresponding to relatively very high or very low reliability and leading, respectively, to a very long or a very short duration of the initial phase of increase in organization. According to Atlan (1974), crystals can be viewed as a non-self-organizing system because of low initial reliability in spite of their large redundancy. At the other extreme, less repetitive and more flexible structures, such as macromolecular systems, can be self-organizing.

In agreement with this model, it is suggested that lignin networks be considered as self-organizing systems, thus explaining the formation of molecular complexes by auto- and heteropolymerization in plant cell walls with an increase of lignin functional properties.

The high frequency of relatively labile intermonomeric linkages, such as β- and mainly α-ether bonds, and also of easily activated groups, such as free phenolic terminal units (Fig. 1), may allow rearrangement reactions and, thus, easy evolution of the system as a function of random environmental factors. Occurrence of chemical and biochemical regularities, previously discussed, may, in addition, provide enough initial redundancy. Finally, a high reliability, *i.e.*, inertia to perturbation, may result from the ability to reform phenolic groups after, for example, an addition reaction as shown in Fig. 1, but also from the release of reactive phenolic and/or benzylic groups after β- and mainly α-ether cleavage.

In conclusion, even when lignin formation appears as an enzyme-initiated and chemically driven process, structural studies have provided evidence of regularities in chemical and biochemical properties in lignin networks. Such regularities may allow self-organizing properties of lignin macromolecules, explaining their functional fitness and the biological significance of the 'random process' of lignification. However, until now, this theory suffers from 2 main drawbacks: a lack of quantitative evaluation and a definite account of the phylogenic and ontogenic significance of the substitution pattern of the lignin monomeric units.

Acknowledgments

Thanks are due to Drs. Catherine Lapierre, C. Costes and E. Odier for critical assessment of the manuscript and to Kate Hervé du Penhoat for linguistic revisions.

References

Atlan H. (1972) *In: L'organisation biologique et la théorie de l'information.* Hermann, Paris, pp. 229

Atlan H. (1974) On a formal definition of organization. *J. Theor. Biol.* 45, 295-304

Back E.I. (1987) The bonding mechanism in hardboard manufacture. *Holzforschung* 41, 247-258

Bolker H.I. & Brener H.S. (1971) Polymeric structure of spruce lignin. *Science* 170, 173-176

Borg-Olivier O. & Monties B. (1989) Characterization of lignins, phenolic acids and tyramine in the suberized tissues of natural and wound-induced potatoe periderm. *C.R. Acad. Sci. Ser. III* 308, 141-147

Cassab G.I. & Varner J.E. (1988) Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39, 321-353

Enoki A., Yaku F. & Koshijima T. (1983) Synthesis of LCC model compounds and their chemical and enzymatic stabilities. *Holzforschung* 37, 135-141

Eom T.J., Meshitsuka G., Ishizu A. & Nakano T. (1987) Chemical characteristics of lignin in differentiating xylem of a hardwood III. *Mokuzai Gakkaishi* 33, 716-723

Eriksson I., Lindbrandt O. & Westermark U. (1988) Lignin distribution in birch *(Betula verucosa)* as determined by mercurization with SEM- and TEM-EDXA. *Wood Sci. Technol.* 22, 251-257

BIBLIOTHEQUE GETTIMAT

Freudenberg K. & Neish A.C. (1968) *In: Constitution and Biosynthesis of Lignin.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 129

Fry S.C. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37, 165-186

Harkin J.M. (1966) *O*-Quinonemethide as tentative structural elements in lignin. *Adv. Chem. Ser.* 59, 65-75

Haslam E. & Lilley T.H. (1985) New polyphenols from old tannins. *In: The Biochemistry of Plant Phenolics. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* (van Sumere C.F. & Lea P.J., eds.), 25, 237-256

Higuchi T. (1983) Biochemistry of lignification. *Wood Res.* 66, 1-16

Higuchi T. (1985) Biosynthesis of lignin. *In: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components.* (Higuchi T., ed), Academic Press, Orlando, pp. 141-160

Hoffman A. Sr., Miller R.A. & Pengelly W.L. (1985) Characterizations of polyphenols in cell walls of cultured *Populus trichocarpa* tissues. *Phytochemistry* 24, 2685-2687

Horn R.A. & Setterholm V. (1988) Press drying: a way to use hardwood CTMP for high-strength paperboard. *TAPPI* 71, 143-146

Jouin D., Tollier M.T. & Monties B. (1988) Lignification of oak wood: lignin determinations in sapwood and heartwood. *Cell. Chem. Technol.* 22, 231-243

Lapierre C. (1986) Hétérogénéité des lignines de peuplier: mise en évidence systématique. Ph.D. Thesis, Université d'Orsay, France

Lapierre C., Jouin D. & Monties B. (1989) On the molecular origin of the alkali solubility of gramineae lignins. *Phytochemistry* 28, 1401-1403

Logan K.J. & Thomas B.A. (1985) Distribution of lignin derivatives in plants. *New Phytol.* 99, 571-585

Minor J.L. (1982) Chemical linkage of pine polysaccharide to lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 2, 1-16

Monties B. (1985) Recent advances in lignin inhomogeneity. *In: The Biochemistry of Plant Phenolics. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* (van Sumere C.F. & Lea P.J., eds.), 25, 161-181

Northcote D.H. (1972) Chemistry of plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 23, 113-132

Pla F. & Yan Y.F. (1984) Branching and functionality of lignin molecules. *J. Wood Chem. Technol.* 4, 285-299

Saka S., Hosoya S. & Goring D.A.I. (1988) A comparison of bromination of syringyl and guaiacyl type lignins. *Holzforschung* 42, 79-83

Sarkanen K.V. (1971) Precursors and their polymerization. *In: Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions.* (Sarkanen K.V. & Ludwig C.H., eds.), Wiley Interscience, New York, pp. 138-156

Scalbert A., Monties B., Lalemand J.Y., Guittet E. & Rolando C. (1985) Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359-1362

Sorvari J., Sjostrom E., Klemola A. & Laine J.E. (1986) Chemical characterization of wood constituents especially lignin in fractions separated from middle lamella and secondary wall of Norway spruce *(Picea abies). Wood Sci. Technol.* 20, 35-51

Tai D., Cho W. & Ji W. (1987) Studies on *Arundo donax* lignins. *Proc. Fourth Int. Symp. Wood Pulping Chem.* 2, C.T.P., Grenoble, pp. 13-17

Takahashi & Koshijima (1988) Molecular properties of lignin–carbohydrate complexes from beech *(Fagus crenata)* and pine *(Pinus densiflora)* woods. *Wood Sci. Technol.* 22, 177-189

Tanahashi M., Takeuchi H. & Higuchi T. (1976) Dehydrogenative polymerization of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols. *Wood Res.* 61, 44-53

Terashima N. & Fukushima K. (1988) Heterogeneity in formation of lignin: autoradiographic study of formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Mangnolia kobus* D.C. *Holzforschung* 40 suppl., 101-105

Tollier M.T., Monties B. & Lapierre C. (1988) Heterogeneity in angiosperm lignins. *Holzforschung,* 40 suppl., 75-79

Wardrop A.B. (1976) Lignification in plant cell wall. *Appl. Polym. Symp.* 28, 1041-1063

Whitmore F.A. (1982) Lignin–protein complex in cell walls of *Pinus elliottii:* amino acid constituents. *Phytochemistry* 21, 315-318

Yan J.F., Pla F., Kondo R., Dolk M. & McCarthy J.L. (1984) Lignin: 21: depolymerization by bond cleavage reactions and degelation. *Macromolecules* 17, 2137-2142

Annex

According to Atlan's proposal, organization should correspond to an optimum compromise between maximum informa-

LES POLYMÈRES VÉGÉTAUX Vol. 2 part 1

tion content (H_{max}) and redundancy *(R)* both considered as a function of time. Starting from Shannon's definition:

$$H = H_{max}(1-R)$$

and differentiating *H versus* time, with the assumption that time means accumulated random perturbation from the environment, one gets:

$$dH/dt = (1-R)(dH_{max}/dt) + H_{max}(-dR/dt) \quad (1)$$

As perturbations decrease both H_{max} and R, the first term on the right side of eqn. 1 is negative and thus shows disorganization effects due to random perturbations. The second term, however, is positive explaining a possible increase in organization and thus self-organization under the effect of random perturbations. A self-organizing system appears, thus, to be redundant enough to sustain a continuous process of disorganization, first term, constantly associated with reorganization and increased efficiency of the system due to its reliability, *i.e.*, its inertia opposed to random perturbations, the second term of eqn. 1.

Maintenant que ce phénomène est établi, on assiste d'ailleurs à un brusque regain d'intérêt pour les études portant sur la structure tridimensionnelle des protéines, qui fleurissaient dans la littérature il y a une quarantaine d'années. Car durant des années et des années, tout se passait comme si, dès lors qu'on connaissait la séquence de la protéine, il n'était plus nécessaire de s'intéresser au reste, comme s'il allait de soi que la séquence déterminait la structure tridimensionnelle et l'état d'activité de la protéine. Alors même que l'on savait pertinemment, et depuis longtemps, que c'était faux, ce qui est tout de même assez extraordinaire ! On retrouve ici la question du recul devant la difficulté : essayer de calculer, de prédire la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir de sa séquence et de son environnement chimique n'est pas chose facile. Aujourd'hui encore, personne n'est vraiment capable de le faire complètement ; des modèles y parviennent approximativement, mais c'est extrêmement compliqué. Et comme je vous l'ai dit, à partir du moment où un problème n'est pas simple, on hésite à s'y attaquer...

Question : *Vous montrez l'importance des phénomènes d'organisation par le bruit au niveau des protéines, de la génétique. Existe-t-il des exemples de création de structures relevant de ce type d'organisation par le bruit dans les domaines non biologiques, au niveau de macromolécules par exemple ? Je pose cette question car vous avez évoqué la réflexion de Szent-Györgi, selon laquelle la vie n'existe pas. A la limite, un biochimiste pourrait prétendre de la même manière que la chimie n'existe pas : elle se réduit à des interactions déterminées par des potentiels énergétiques d'un côté, des particules de l'autre. On retrouve le principe de Maupertuis qui, à partir de deux pôles, crée un dynamisme.*

Henri Atlan : Je suis d'accord avec cette seconde remarque. Mais je considère qu'il s'agit seulement d'une hypothèse qui mériterait de faire l'objet d'un programme de

recherche. Mayr pensait avoir décrit l'intentionnalité mécanique dont il parlait par l'intermédiaire de la notion de programme génétique. Je pense personnellement que cette description est inadéquate, mais j'imagine que par l'intermédiaire de systèmes dynamiques, on devrait effectivement pouvoir parvenir à reproduire une telle intentionnalité mécanique, qui ressemblerait alors en effet à une finalité mécanique, la finalité connue en physique par les principes d'optimum et de minimum d'un potentiel par exemple. Mais on en est encore loin. On ne peut pas faire comme si on y était parvenu !

J'en viens à votre question : il existe en effet des exemples non biologiques d'organisation par le bruit. Ils sont fournis par des systèmes physiques qui sont décrits par des systèmes dynamiques un peu compliqués : par exemple les verres de spin, qui décrivent les configurations atomiques de substances paramagnétiques, ou plus généralement les systèmes dynamiques comportant plusieurs mimima locaux. Un tel système peut, à un moment, se "coincer" dans un de ces minima ; mais s'il existe une quantité optimum de bruit, en l'occurrence de température, cette agitation empêche le système de rester durablement dans cet état, elle lui permet d'en sortir et d'aller vers un autre minimum, peut-être plus intéressant pour telle ou telle fonction. Ce modèle est utilisé effectivement par des physiciens, pour décrire ce qu'ils appellent des systèmes complexes ou "désordonnés", dont les exemples sont fournis essentiellement par des systèmes produisant des hétérogénéités macroscopiques à partir de grands nombres de particules microscopiques en interactions statistiquement homogènes.

Question : *J'enchaîne sur la question précédente, relative à l'organisation par le bruit, pour signaler qu'il existe peut-être une organisation par la musique. L'une des grandes interrogations actuelles à ce sujet est d'identifier le mécanisme par lequel s'effectue le couplage de*

voir le phénomène de résonance couplée des pendules (harmonie ss et sl) plus général que celui de Huygens
voir les articles [illegible] par couplage de protéines en g et syst oscillant correspondant

Henri Atlan

La fin du «tout génétique» ?

Vers de nouveaux paradigmes en biologie

Une conférence-débat organisée par le groupe *Sciences en questions*
Paris, INRA, 28 mai 1998

Institut National de la Recherche Agronomique
147 rue de l'Université, 75338 Paris cedex 07

Connaissance Vigne Vin, 1987, **21,** n° 3, 169-190.

COMPOSITION CHIMIQUE DES BOIS DE CHÊNE : COMPOSÉS PHÉNOLIQUES, RELATIONS AVEC QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LA QUALITÉ DES VINS ET DES EAUX-DE-VIE

B. MONTIES

Laboratoire de Chimie Biologique, (INRA) Institut National Agronomique
Centre de Grignon, 78850 Thivernal-Grignon (France)

INTRODUCTION

Le rôle du bois dans la maturation des vins et des eaux-de-vie est reconnu depuis longtemps (SINGLETON, 1974; MARCHE et *al.,* 1975, RIBÉREAU-GAYON et *al.,* 1976; GLORIES, 1983; CAUMEIL, 1983). La primauté des bois de chêne dans la fabrication des futailles et dans la production de vins et d'alcools de qualité n'est pas contestée. De nombreux facteurs tels que l'anatomie du bois, ses propriétés physiques telles que la porosité aux liquides, ou ses propriétés chimiques telles que la présence de substances extractibles, sont avancées pour expliquer cette primauté (PONTALLIER et *al.,* 1982; FEUILLAT, 1982; PUECH, 1984; NAUDIN, 1986).

L'un des aspects caractéristiques de la maturation des vins et eaux-de-vie est la diffusion à partir du bois de composés extractibles en particulier d'aldéhydes phénoliques de type benzoïque (vanilline et syringaldéhyde) et de type cinnamique (coniféraldéhyde et syringaldéhyde) en quantités moindres, (GUYMON et CROWELL, 1968; BRICOUT, 1971; PUECH et *al.,* 1982). Alors qu'il est généralement admis que ces aldéhydes proviennent de la dégradation des lignines (MARCHE et *al.,* 1975; CAUMEIL, 1983; PUECH, 1986), on ne connait bien ni les mécanismes de formation de ces produits, ni leurs mécanismes de mise en solution. Ces mécanismes pourraient être tout à la fois, d'origine biochimique (biodégradation des lignines), chimique (hydroalcoolyse et acidolyse) et physique (hydrothermolyse pendant le cintrage des douelles ou pyrolyse directe durant le chauffage). Ces derniers mécanismes physico-chimiques ne semblent pas avoir été étudiés en détail dans le cas des bois; quelques études concernant des lignines et des molécules modèles a cependant été publiée par les équipes de KRATZL (KRATZL et *al.,* 1959) et de ADLER (LUNDQUIST, 1970).

Cet ensemble de données conduit à porter une attention particulière à la nature, à la stabilité des constituants phénoliques des bois ainsi qu'à leurs influences possibles sur les propriétés physiques des bois.

Après quelques rappels concernant la composition chimique des bois de chêne, cette revue concerne d'une part les effets possibles des composés polyphénoliques

(lignines et extractibles) sur les propriétés chimico-mécaniques des bois (résistance mécanique et perméabilité aux macromolécules et aux composés moléculaires) et d'autre part la réactivité des lignines (hydrolysabilité, thermostabilité, formation d'aldéhydes phénoliques).

Faute de données précises concernant spécifiquement les bois de chêne, on a choisi de proposer des modèles fondés sur des observations faites sur d'autres bois en ne citant qu'un nombre limité de références bibliographiques.

COMPOSITION CHIMIQUE DES BOIS DE CHÊNE

De façon générale, la composition chimique des bois est envisagée sous le seul rapport des composés macromoléculaires insolubles (celluloses, hémicelluloses et lignines) et sans tenir compte de la nature des composés moléculaires extractibles à l'aide d'eau ou de solvants organiques et dont la seule masse totale est donnée. Sous ce rapport les bois de chêne ne se distinguent pas particulièrement des autres types de bois par leurs teneurs en celluloses, hémicelluloses et lignines qui représentent environ 40, 25 et 20 p. 100. FENGEL et WEGENER (1984) ont compilé ce type d'informations, ces données ne peuvent être comparées sans tenir compte des méthodes de dosage employées. Les teneurs totales en extractibles varient de 5 à 10 p. 100 environ selon que les extractions sont faites en milieu organique ou aqueux. De façon systématiques, les bois de cœur sont plus riches en extractibles que les aubiers. De même les teneurs en lignine sont plus élevées, d'environ 5 p. 100 en moyenne, dans le cœur par rapport à l'aubier. Ce type de résultat n'est cependant pas systématiquement rapporté (FENGEL et WEGENER, 1984) mais il a été récemment confirmé lors d'une étude comparée multiméthode des lignines de cœur et d'aubier de *Quercus robur* et *Quercus petrea* (JOUIN et *al.,* 1987).

La composition en extractible des bois de chêne n'a pas, à notre connaissance, fait l'objet d'étude globale détaillée. Quelques études limitées à des familles de composés ont été publiées sur les stéroïdes et lipides (CHEN, 1970), sur les composés volatils de types terpènes, furfural et nonalactones (NABETA et *al.,* 1986), ainsi que sur quelques composés polyphénoliques dans le cas du bois de *Quercus rubra* (SEIKEL et *al.,* 1971). Bien que ces données ne soient pas extrapolables à d'autres espèces de chêne, l'observation de composés particuliers fournit des modèles de recherches.

I. — LIGNANES ET LIGNINES DE BRAUNS.

Les résultats de SEIKEL et *al.,* (1971) établissent l'existence de lignanes : lyonirésinol et son xyloside ainsi que syringarésinol, dans l'aubier et le cœur de chêne. L'existence de lignanes est importante à considérer parce qu'au moins dans le cas de bois de conifère, SAKAKIBARA et *al.,* (1987) ont montré que les lignanes peuvent exister sous forme d'oligomères et qu'ils ont pu être assimilés, pour cette raison de façon erronée, à de la lignine. D'après ces auteurs, la fraction de lignine, dite lignine de BRAUNS et définie d'après sa seule extractibilité en milieu organique neutre, ne serait qu'un polymère de lignanes : polylignane et, non une fraction de lignine véritable. Cette conclusion mériterait d'être validée dans le cas des bois de chêne parce que,

contrairement aux lignines, les lignanes sont des métabolites de type secondaire dont les teneurs varient en fonction non seulement des espèces végétales mais des conditions de biosynthèse : variation des teneurs en fonction de la position du bois dans le tronc (SAKAKIBARA et *al.,* 1987). Ces variations de teneurs et notamment la plus faible teneur du bois de cœur en lignanes par rapport à l'aubier pourrait traduire l'existence de réactions de condensation entre lignines et polylignanes lors de la formation du bois de cœur. Cette hypothèse est en accord avec le modèle de «lignification secondaire» proposée par HERGERT (1977) qui pourrait avoir lieu tant *in vivo,* pendant la duraminisation, que après la récolte des bois, lors du séchage et surtout du thermoformage par exemple. La présence de catéchine et de proanthocyanes, rapportée par SEIKEL dans le seul aubier, peut être expliquée par une condensation semblable de ces flavonoïdes lors de la «lignification secondaire». Récemment, HASLAM et LILLEY (1985) ont proposé une insolubilisation analogue des proanthocyanes par polymérisation chimique avec les polyosides pariétaux qu'ils ont mis en parallèle avec la lignification de ces même parois. Ce point est discuté par la suite.

II. — ALDÉHYDES BENZOIQUES ET CINNAMIQUES.

Un second groupe de polyphénols, rapporté par SEIKEL et *al.,* (1971), est constitué par les quatre aldéhydes (vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde et sinapaldéhyde) extratibles à la fois dans l'aubier et le cœur. Dès 1957, l'existence des aldéhydes benzoiques, vanilline et syringaldéhyde, avait été rapporté par PEARL et *al.,* qui, comparant six espèces de chêne différents, avaient observé l'existence de différences interspécifiques allant du simple au double pour les teneurs et les rapports syringaldéhyde /vanilline.

En plus des aldéhydes benzoïques, la présence des deux aldéhydes hydroxycinnamyliques, coniféraldéhyde et sinapaldéhyde, a été établie dans le bois de chêne sans ambiguïté (BLACK et *al.,* 1952). De plus il a été possible de montrer, au moins dans le cas de bois de peuplier séchés simplement à l'air, que les quatre aldéhydes phénoliques existent dans le bois avant tout traitement technologique et qu'ils peuvent être réduits sous forme d'alcools benzylique et cinnamylique correspondants par réduction à l'aide de borohydrure de sodium (LAPIERRE et *al.,* 1983). Il est très vraisemblable que la même situation existe dans le cas des bois de chêne.

Analysant du bois de cœur de *Quercus robur* (chêne pédonculé), préalablement extraits de façon exhaustive au moyen d'une séquence de solvants de polarité croissante : pentane-éthanol 5 %, éthanol à 95 p. 100, eau, nous avons de plus observé que l'hydrolyse alcaline des résidus pariétaux, ainsi préparés, libère des quantités de vanilline et de syringaldéhyde très significativement supérieures (2 à 20 fois) de celles qui sont simplement extractibles à l'aide de solvants neutres tels que l'éthanol aqueux à 55 p. 100 (tableau I). Des résultats analogues ayant été obtenus sur d'autres bois séchés (Chêne sessile mais aussi Peuplier), l'existence de deux compartiments d'aldéhydes benzoïques (et vraisemblablement aussi d'aldéhydes cinnamiques : coniféraldéhyde et sinapaldéhyde, (travaux en cours) semble donc systématique dans ces bois. L'existence d'aldéhydes extractibles, car libres de liaisons covalentes avec les

parois, et d'aldéhydes liés aux composés pariétaux par des associations détruites en milieu alcalin pourrait expliquer les résultats du tableau I. L'existence de deux compartiments d'aldéhydes libres et liés a déjà été suggérée par GUYMON et CROWELL dans le cas de bois de chêne en 1968. Compte tenu du fait que, tant dans les données de ces auteurs que dans celui des résultats rapportés dans le tableau I, les protocoles d'extraction utilisés (acidolyse ou hydrolyse alcaline) peuvent entraîner des gonflements des parois et, donc, une meilleure accessibilité des solvants à des composés qui pourraient avoir été «piégés» dans les parois lors du séchage, il n'est pas possible d'accepter sans réserve l'existence d'aldéhydes liés par covalence. Ce point est discuté par la suite.

TABLEAU I

Comparaison des teneurs en aldéhydes benzoïques (vanilline et syringaldéhyde), extractibles de bois de chêne à l'aide de solvants.

Extraction par l'éthanol aqueux à 55 p. 100 puis par hydrolyse alcaline (NaOH, 2N; reflux, 4 h, sous azote); identification et dosage par spectroscopie UV couplée CLHP, entre 220 et 500nm, selon MONTIES et *al.*, (1981) et SHARMA et *al.*, (1986).

Les teneurs sont exprimées en mg pour 100 g de matière sèche.

	Extraction Ethanol 55 p. 100			Hydrolyse alcaline		
	Vanilline	Syringaldéhyde	Syringaldéhyde / Vanilline	Vanilline	Syringaldéhyde	Syringaldéhyde / Vanilline
Bois Brut	0.6	1.2[b]	n.c.[b]	14.6	42.0	2.9
Bois Chauffé[a]	7.4	12.0	1.5	15.2	42.0	2.8

a : chauffage en tube scellé (160° C, 1 h) du bois brut à l'air séché.
b : composé contaminé, estimation maximum, n.c. : non calculé.

III. — ACIDES BENZOIQUES ET CINNAMIQUES.

L'existence d'acides benzoïque, vanillique et syringique, ainsi que d'acide férulique solubilisés après hydrolyse alcaline a été aussi rapportée par PEARL et *al.*, (1957) qui ont observé des différences très significatives de teneur entre les six espèces de chêne comparées. L'existence, parmi les extractibles d'esters correspondant à ces acides est mentionnée par SEIKEL et *al.*, (1971) alors que CHEN (1970) rapporte celle de férulate de tétracosyle dans l'extrait éthanolique de cœur de chêne. La présence de ce dernier type d'ester pourrait être l'indice d'une subérification pathologique : l'existence d'esters féruliques et sinapiques d'alcools aliphatiques a été rapportée dans le liège de *Quercus suber* (HERGERT, 1958).

IV. — COMPOSÉS CARBONYLES (COUMARINES, QUINONES)

La présence de scopolétine, structurellement proche de l'acide férulique, a été rapportée par SEIKEL et *al.*, (1971) dans le seul cœur de chêne. Une parenté biosynthétique entre ces deux composés est possible mais non obligée puisque la scopolétine peut être synthétisée par méthylation d'aesculétine (BROWN, 1985). Cependant, la formation chimique de coumarine à partir d'acide hydroxycinnamique correspondant ne peut être exclue lors du thermoformage du bois puisque la formation d'aesculine à partir d'acide caféique a été rapportée pendant des séparations chromatographiques sur cellulose (BUTLER et SIEGEMAN, 1953). La présence de scopolétine a été confirmée en 1972 par JOSEPH et MARCHE, qui ont indiqué, en plus dans le bois de chêne, l'existence de deux autres coumarines, ombelliférone et aesculétine, et de leurs dérivés glycosides ainsi que par TRICARD et *al.*, (1987).

La présence de 2,6-diméthoxybenzoquinone rapportée pour la première fois par SEIKEL et *al.*, en 1971 dans le seul bois de cœur de chêne est aussi remarquable. Elle pourrait être l'indice de réactions de dégradation péroxydasique de lignanes de type syringyle, tel que le lyoniside, ou de monomères terminaux homologues présents dans les lignines (figure 2). Ce type de réaction a été rapporté lors de réactions modèles par STEELINK (1972). On peut alors supposer que l'absence de quinones homologues de type guaiacyl, 2-méthoxybenzoquinone, résulterait de réactions de dimérisation et additions sur leur carbone 5 (figure 1).

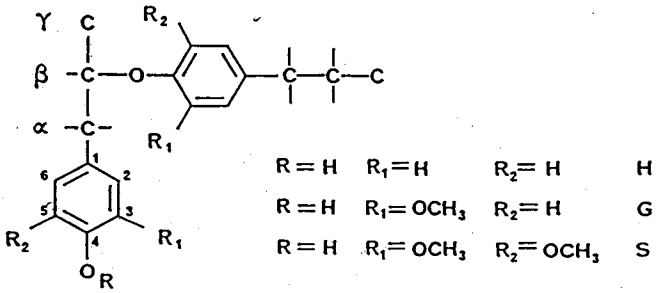


Fig. 1. — Nomenclature et structure phénylpropane des monomères phényl (H), gaiacyl (G) et syringyl (S), constitutifs des lignines et des lignanes.

Deux unités phénylpropane (C_6-C_3) sont représentées en liaison aryl-alkyl-ether de type β-0-4 qui est le mode de liaison intermonomère caractéristique des lignines.

V. — MONOMÈRES ET TANINS GALLIQUES ET ELLAGIQUES.

La présence d'acides gallique et ellagique ainsi que des tanins correspondants a été rapportée dans les extractibles de bois des *Quercus alba* et *rubra* respectivement par CHEN (1970) et par SEIKEL et *al.*, (1971) qui ont souligné le caractère dominant des tanins hydrolysables, de type ellagique, par rapport aux tanins condensés, de type flavane.

Le caractère systématique de cette différence a été confirmé par SCALBERT et *al.,* (1986) dans le cas de *Quercus rubra* et étendu à *Quercus robur* dans le cas des différences de composition entre bois et écorce (tableau II). De plus l'analyse par chromatographie liquide haute performance des extractibles a permis de montrer que l'acide gallique est prépondérant parmi les extractibles de *Quercus rubra* (rapport en masse des acides gallique/ellagique de l'ordre de 5) alors que l'acide ellagique l'est au contraire des *Quercus robur* et *Quercus petrea* (rapport en masse des acides ellagique/gallique de l'ordre de 10) (SCALBERT et *al.,* 1987). Comparant aubier et cœur, ces derniers auteurs ont montré que la formation du bois de cœur s'accompagne, dans ces deux cas, d'augmentation très significatives des teneurs en acides gallique et ellagique (teneurs de l'ordre de quelques mg pour 100 mg de bois sec multipliées par 5 à 20) alors que celles en vanilline et syringaldéhyde augmentaient beaucoup moins significativement (teneurs de l'ordre du mg pour 100 mg de bois sec multipliées par 1 à 2).

TABLEAU II

Teneur globale comparée des bois de chêne en tanins condensés et hydrolysables.

Teneur en $mg.g^{-1}$ de bois sec après extraction des tanins par du méthanol aqueux à 80 p. 100

Type de fractions (dosage)	*Quercus rubra* (cœur)	*Quercus robur* (cœur)	*Quercus robur* (écorce)
Polyphénols totaux (Folin-Cioalteu)	34,6	65.7	25.2
Tanins condensés (flavanoïdes)			
Butanol, HCl	0,2	0,3	2,3
Vanilline, HCl	0,3	0,3	7,3
Tanins hydrolysables (ellagiques)	5,3	75,4	9,5

Alors que les monomères constitutifs des tanins des bois de chêne sont relativement connus, la nature et la composition des oligomères et polymères demeurent encore très incertaines. Aucun bilan détaillé de la composition monomérique de ces derniers n'a été publié à notre connaissance. On dispose cependant de données structurales spécifiques qui ont été revues récemment pas HASLAM et LILLEY (1985) et qui sont importantes à rappeller ici.

Sur le plan phylogénique, les chênes font partie du petit groupe d'Angiospermes capables de synthétiser et de polymériser les esters galliques et hexa-hydroxy--diphénoliques. La biosynthèse fait intervenir le penta-digalloyl-glucose comme intermédiaire central. Selon les végétaux, des réactions de condensation oxydative entre motifs galloyls voisins aboutissent à la synthèse de tanins contenant, au minimum, deux cycles galloyl associés par liaisons covalentes de type diphényl ou aryl-aryl ether.

Il semble que, de façon systématique, le métabolisme de tous ces végétaux soit orienté vers l'élaboration de produits terminaux réticulés et de masse moléculaire élevée et non vers l'accumulation des composés peu condensés. Il résulterait de cette orientation du métabolisme des variations significatives du pouvoir tanin de ces substances. Les recherches du groupe de HASLAM ont montré que la réticulation des motifs galloyl modifie la conformation et donc les capacités d'adsorbtion des tanins galliques. La formation de liaisons diphényle entre fonctions ester galloyl vicinales sur le glucose entrainerait l'organisation d'un macrocyle oxygéné rigide qui empêcherait, par exemple, la libre rotation des cycles galloyl autour des liaisons ester. Cette rotation reste possible dans le vic-galloyl-glucose non réticulé. L'existence, dans les chênes, de vescalagine, penta-galloyl-glucose dans lequel les trois motifs galloyl portés par les carbones 2, 3 et 5 du glucose sont couplés par liaison diphényle, fournit un exemple très caractéristique de mise en tension moléculaire : le glucose existe, en effet, sous forme non cyclique dans ce composé. Ces effets conformationels entraînent des variations du pouvoir tanin qui n'ont pas de relation directe avec les masses moléculaires. C'est ainsi que le pouvoir tanin de la vescalagine a été trouvé égal à 24 p. 100 de celui du pentagalloyglucose qui est son homologue non réticulé alors que ceux du tri- et tétra-penta-galloyglucose valent 29 et 58 p. 100 respectivement. A notre connaissance, il n'existe pas de données plus précises sur les relations structures-propriétés physico-chimiques des divers tanins présents dans les différents bois de chêne. Les résultats regroupés ici suffisent cependant pour montrer la nécessité d'étudier de façon fine ces tanins et, de façon plus générale, les extractibles qui sont susceptibles d'affecter non seulement les propriétés chimiques mais aussi physicochimiques des bois telles que leur perméabilité ou l'accessibilité aux solvants et solutés des composés pariétaux.

PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

L'importance des phénomènes de perméation de gaz, de composés moléculaires et macromoléculaires au travers du bois de chêne pendant la maturation des vins et eaux-de-vie est fréquemment avancée (CAUMEIL, 1983; Anonyme, 1984) sans que les mécanismes mis en jeu soient explicites.

I. — INFLUENCE DES EXTRACTIBLES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES.

Quelques résultats obtenus sur d'autres types de bois permettent de supposer que ces propriétés dépendent non seulement de l'arrangement supramoléculaire des polymères pariétaux, polyosidiques et polyphénoliques, mais aussi, de la présence d'extractibles. C'est ainsi qu'il a été établi que l'extraction progressive de bois de pin augmente souvent de façon significative, sa perméabilité aux gaz (CHARUK et RAZU-

MOVA, 1974). De même, les variations de dimension, «retrait», après séchage des bois ont été mises en corrélation avec l'existence de pores moléculaires dans les parois et avec l'aptitude des composés extractibles à occuper ces pores. Le plus grand retrait au séchage de l'aubier par rapport au bois de cœur est ainsi globalement expliqué par la plus grande teneur en extractible dans le cœur; le phénomène a été bien établi dans le cas du bois de Douglas (SALOMON et KOZAK, 1968). Récemment BARISKA et PIZZI (1986) ont montré que l'imprégnation de bois de pin, à 5 p. 100 de sa masse, par un extrait de tanins condensés d'accacia permet de limiter les retraits et les déformations des parois cellulaires après séchage. Dans le cas de bois de chêne, PECK (1957) a mis en évidence de significatives différences de retrait lors de la comparaison de 16 espèces de chênes américains. Ces différences n'ont pas été commentées mais on peut supposer qu'elles dépendent, en partie au moins, de la présence d'extractibles hydrosolubles capables d'occuper certains pores des parois gonflées d'eau avant séchage.

II. — MÉCANISMES D'INTERVENTION DES EXTRACTIBLES DANS LES PROPRIÉTÉS DES PAROIS.

Les mécanismes moléculaires intervenant dans la diffusion de molécules dans les pores des parois cellulaires ont été étudiés par TARKOV et FEIST (1968) et surtout par STONE et SCALLAN (1968). D'après ces auteurs, les parois cellulaires des bois peuvent être considérées comme des gels poreux formés par réticulation des polyosides et des lignines. Ces gels insolubles seraient capables de gonflement «limité», en présence de solvants. Le caractère limité du gonflement résulterait du mode de réticulation du gel. Tout traitement, chimique ou biologique, capable de provoquer une déréticulation du gel pourrait provoquer un gonflement supplémentaire en présence du solvant phénomène de : «super gonflement». Utilisant des solutions aqueuses de polymères (polyéthylène glycol de taille molaire comprise entre 1000 et 10000), ces auteurs ont montré que l'eau contenue par les pores des parois végétales, eau de gonflement des gels, n'est pas également accessible à toutes les tailles de polymères. Ce résultat a été expliqué par l'existence de pores de diamètres différents, compris entre 10 et 500 Angström environ et donc d'eau non accessible : «eau non solvant».

Bien que ces observations aient été faites sur des bois et fibres cellulosiques de conifères, il est possible de transposer qualitativement ces modèles au cas des bois de chêne qui, à notre connaissance, n'a pas été étudié sous ce rapport.

Premièrement, compte tenu de la faible taille des pores, on peut supposer que ceux-ci peuvent être occupés de façons diverses selon leur taille, selon la taille moléculaire et selon la conformation moléculaire par des tanins hydrolysables. La variabilité des retraits rapportée par PECK (1957) dans les bois de chêne pourrait en partie dépendre de tels facteurs. D'après les résultats de STAMM, les différences de solubilité dans l'eau des extractibles minéraux (STAMM, 1932) et organiques (STAMM et *al.*, 1942) pourraient aussi intervenir dans ces effets.

Deuxièmement, compte tenu des variations possibles de la taille des pores en fonction des conditions de séchage et leurs possibilités de fermeture irréversible

(EHRNROOTH, 1984), on peut supposer que des composés de faible taille moléculaire, tels que les aldéhydes phénoliques, puissent être «piégés» dans les parois cellulaires après séchage. Dans ces conditions, ces composés ne pourraient être remis en solution aqueuse qu'après déréticulation de la paroi, après acidolyse des lignines par exemple, ou après «super gonflement» de celle-ci par traitement alcalin ménagé par exemple. De tels mécanismes de gonflement des parois pourraient intervenir pour expliquer la «formation» des aldéhydes phénoliques discutée précédemment (tableau I). Il convient de souligner, aussi à ce propos, que des populations bactériennes sont aussi susceptibles d'affecter la perméabilité des bois à l'eau (GREAVES, 1970), d'éroder de façons variées la surface interne des cellules des bois (DANIEL et NILSSON, 1986) et de provoquer une déréticulation biologique analogue des parois. Jointes à la possibilité de formation de ces mêmes aldéhydes par biodégradation fongique et éventuellement bactérienne des lignines (CHEN et CHANG, 1985), ces hypothèses confortent l'hypothèse de MARCHE et *al.*, (1973) concernant la participation indirecte de microorganismes des bois à la maturation des eaux-de-vie.

Un troisième groupe d'observations mettant en relation la présence d'extractibles et la diffusion des alcools organiques dans les bois peut être mentionné. Étudiant les interactions entre les alcools organiques et le bois, ROSEN (1978) a montré que le gonflement des bois et leur point de saturation de fibre (quantité de liquide capable de saturer en totalité les parois cellulaires tout en laissant vide le lumen des cellules) diminuent avec la masse moléculaire et avec le degré de ramification de la chaine carbonée des alcools. Comparant le gonflement de bois de noyer avant et après élimination des extractibles, cet auteur a mis en évidence des variations significatives d'affinité du bois pour des alcools linéaires ou ramifiés allant du méthanol aux octanols. ROSEN a montré que le bois présente systématiquement une plus forte affinité pour les alcools après élimination des extractibles par extraction à l'eau chaude. Ces résultats, qui sont vraisemblablement extrapolables aux bois de chêne, permettent de supposer qu'il existe dans les bois des sites relativement spécifiques de fixation des composés organiques dans les parois cellulaires. La pénétration de solutions hydroalcooliques dans le bois, dépendrait donc de l'élimination d'extractibles. Alors qu'il est établi de façon certaine que d'autres facteurs, tels que l'ultrastructure des bois par exemple, déterminent aussi la perméabilité générale des bois (WARDROP et DAVIS, 1961), on peut admettre aussi que les lignines peuvent, par leur caractère hydrophobe, affecter la sélectivité des bois vis-à-vis des composés organiques.

RÔLE ET RÉACTIVITÉ DES LIGNINES

Avant de discuter la participation éventuelle des lignines dans la maturation des vins et eaux-de-vie, il est utile d'évoquer leur rôle mécanochimique dans les parois.

I. — RÔLE MÉCANOCHIMIQUE ET HYDROPHOBICITÉ DES LIGNINES

Les parois végétales sont des matériaux composites formés d'une matrice amorphe ligno-hemicellulosique armée de fibres cellulosiques orientées dans les différentes sous-couches pariétales. Alors même qu'il est très souvent admis que les lignines confèrent des qualités mécaniques aux bois, le mécanisme de leur action n'est pas discuté

en détail. Dans une approche remarquable, KLAUDITZ (1952 et 1957) a mis en évidence l'importance de l'hydrophobicité des lignines sur les qualités mécaniques des bois. Comparant des propriétés mécaniques de bois avant et après délignification chimique au chlorite de sodium, cet auteur a montré que l'élimination des lignine ne réduisait, de façon très significative, les propriétés mécaniques des bois, que lorsque ceux-ci sont saturés d'eau. Comme à l'état sec, les propriétés mécaniques des bois délignifiés sont relativement proches de celles des bois témoins, KLAUDITZ a attribué aux lignines le rôle de rendre hydrophobe les polyosides pariétaux qui par ailleurs possèdent des propriétés mécaniques intrinsèques. Cette hypothèse reste actuellement tout à fait vraisemblable : délimitant un environnement hydrophobe, les lignines empêcheraient la plastification des polyosides par l'eau. Il est vraisemblable que les tanins peuvent excercer des effets d'«hydrophobisation» analogues lors de l'incrustation des parois consécutive à la duraminisation et surtout après séchage à chaud. Dans la mesure où des réactions de solvolyse contribueraient à la maturation des vins et eaux-de-vie en fût, il pourrait donc y avoir augmentation de porosité et gonflement par l'eau de certaines couches pariétales résultant d'une «désincrustation» partielle et, vraisemblablement sélective, en fonction de la réactivité des lignines et des tanins.

II. — STRUCTURE ET RÉACTIVITÉ DES LIGNINES

Très peu de recherches ont été consacrées à la structure des lignines de chêne qui sont formées (figure 1), comme les lignines des autres angiospermes, à partir de monomères de type alcools hydroxycinnamiques monométhoxylés : monomères guaiacyls, et diméthoxyles : monomères syringyles (FREUDENBERG, 1968; SARKANEN et LUDWIG, 1971). Il est maintenant établi, et confirmé, que des fractions de lignine de compositions monomériques différentes peuvent être extraites à partir de bois d'angiospermes (MONTIES, 1985) et, en particulier de bois de chêne (OBST et LANDUCCI, 1986; TOLLIER et *al.,* 1986). Ce phénomène pourrait être significatif lors de la maturation des boissons parce qu'il pourrait entraîner la solubilisation sélective de lignines de composition monomérique différente de celle des bois. C'est ainsi que la solubilisation de lignines de type guaiacyl pourrait résulter de la dégradation des parois primaires (couches LM et P) alors que des lignines de type syringyle pourraient provenir des parois secondaires (couche S2). Dans ce dernier cas, l'oxydabilité remarquable des motifs syringyles (STEELINK, 1972) pourrait aussi entraîner la formation de 2,6- diméthoxybenzoquinone discutée précédemment.

Dans la mesure où des fractions de lignine deviendraient extractibles, il est aussi vraisemblable que la composition du milieu d'extraction puisse affecter la dissolution sélective de fractions. SCHUERCH, dès 1952, a montré que des mélanges de solvants pourraient être meilleurs solvants des lignines que chacune des composantes pures du mélange; ce résultat a été, par exemple, confirmé récemment par MORCK et *al.,* (1986). Les résultats de PUECH (1984) qui, précisant ceux de SINGLETON (1961), établissent que le «complexe lignine» de chêne est isolé avec un meilleur rendement par l'éthanol aqueux à 55 p. 100 que par l'éthanol pur ou par l'eau pure sont cohérents au modèle de SCHUERCH. Il serait intéressant de préciser la composition mono-

mérique, la structure moléculaire et macromoléculaire de ce «complexe lignine» et, notamment, ses relations éventuelles avec les lignanes et polylignanes discutés précédemment.

L'insolubilité remarquable des lignines dans les solvants neutres en absence d'acides ou de bases, a conduit à admettre que cette macromolécule forme des réseaux infinis (SCHUERCH, 1952; SARKANEN et LUDWIG, 1971). La dissolution de fractions de lignine ne pourrait avoir lieu qu'après rupture sélective de liaisons intermonomériques. La figure 2 présente un schéma moléculaire de lignine suffisant pour discuter ce point. La formation de fractions de lignine aisément solubilisables, tant en milieu faiblement acide ou alcalin, est explicable, dans des conditions douces de température ambiante, par la rupture des seules liaisons α-aryléther de type benzylique. Ce type de solubilisation pourrait conserver la structure moléculaire des lignines (liaison 1 à 5 : figure 2); elle ne provoquerait pas de réactions secondaires qui ont pour effet de modifier la composition monomérique des lignines. Comme le montre le tableau III, ce type de réaction peut être observé dans des conditions plus brutales : chauffage sous reflux aqueux soude 2N ou SO_4H_2 5 p. 100 (JOUIN et *al.*, 1987).

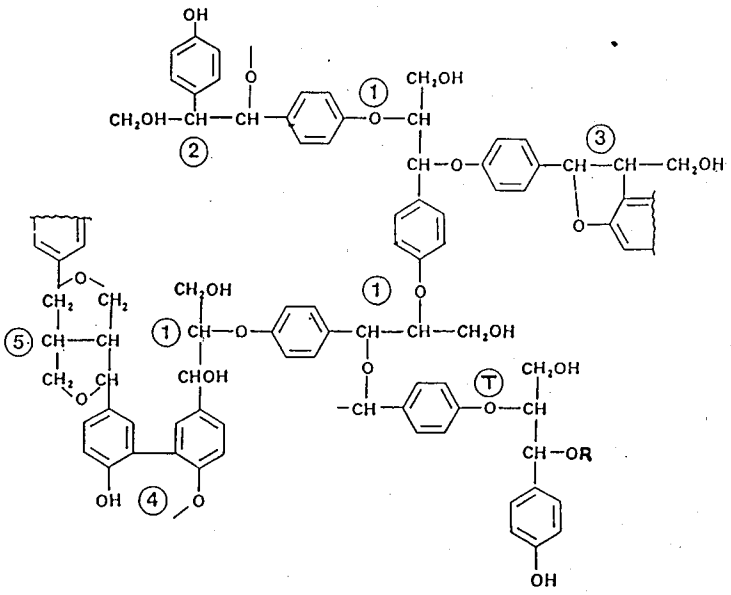


Fig. 2. — Structure moléculaire des principaux types de liaison intermonomères décrites dans les lignines.

Les nombres distinguent cinq types de liaisons intermonomères les plus courantes; leur fréquence décroit dans l'ordre 1 à 5. La liaison T correspond à une unité terminale de type phénylglycérol dont la fonction benzylique (OR), libre R = H ou éthérifiée, est aisément substituable et hydrolysable. Le mode de substitution des monomères est indifférent.

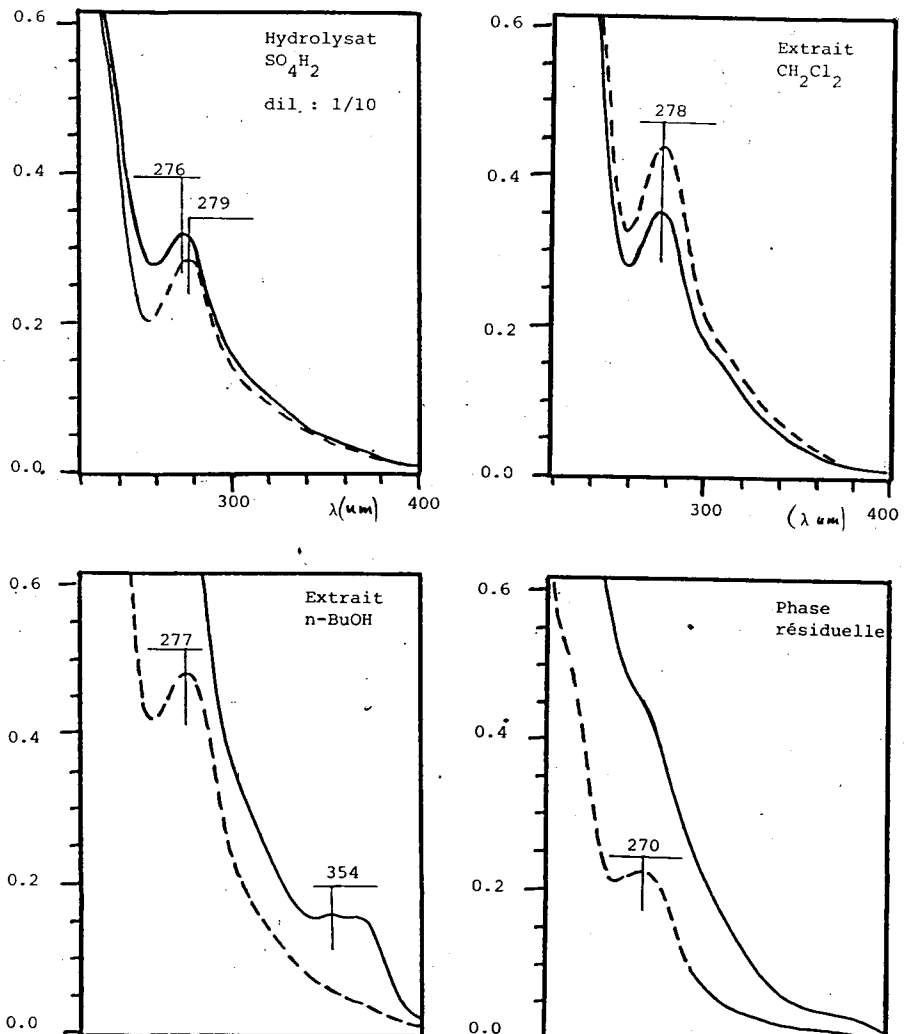


Fig. 3. — Spectres d'absorbtion comparés des fractions de lignine solubilisables par hydrolyse sulfurique modérée (SO_4H_2 5 p. 100, reflux, 4 h, N_2) de bois de chêne, *Quercus robur*, aubier et bois de cœur.

L'hydrolysat sulfurique a été successivement extrait par le dichlorométhane (CH_2Cl_2), le n-butanol (n-BuOH) laissant une phase résiduelle aqueuse; les concentrations des fractions sont identiques (10 mg Bois/ml) sauf dans le cas de l'hydrolysat SO_4H_2 dilué au dixième.

La figure 3 permet de comparer les spectres d'absorption des fractions de lignines solubilisées à partir du bois de cœur et de l'aubier de *Quercus robur* par le traitement sulfurique à reflux dont les résultats sont donnés dans le tableau III. La fraction de lignine solubilisée dans ces conditions a été extraite successivement par le dichlorométhane puis le n-butanol, donnant une phase aqueuse résiduelle qui ne présentait en aucun cas de maximum d'absorbance entre 300 et 400 nm. Par contre, et seulement dans le cas du bois de cœur, on a pu observer, entre 330 et 350 nm, le double maximum typique de composés de la série ellagique. Le même type de résultat a été observé dans le cas de *Quercus petrea* quoique avec une moindre intensité. Les chromophores responsables sont en cours d'étude. Dès à présent, il parait possible de conclure que la formation de bois de cœur se traduit par la présence de composés de type ellagique dans le résidu pariétal de cœur de chêne. Comme ces pigments ellagiques n'ont pas été détectés dans les aubiers, on peut supposer l'existence d'une «incrustation» des composés polyosidiques par les tanins ellagiques et même éventuellement une lignification secondaire au sens de HERGERT (1977). Dans le cas d'une «incrustation» des polyosides, il pourrait y avoir soit piégeage de tanins dans des pores irréversiblement fermés lors du séchage des bois, soit formation de liaison covalentes (figure 4). Dans ces deux cas, le modèle d'association des proanthocyanes avec les parois végétales proposé par HASLAM et LILLEY (1985) serait extrapolable au cas des tanins hydrolysables.

TABLEAU III

Composition monomérique de la lignine de cœur de Chêne et des fractions de lignine solubilisées à reflux par traitement acide (SO_4H_2 5 %, 4 h) ou alcalin (NaOH 2N, 4h) sous azote.

Caractérisation des monomères non condensés guaiacyle (G) et syringyle (S), après oxydation par le nitrobenzène alcalin et analyse CLHP des produits selon les condition du tableau I.

Rendement et composition exprimés en rapport massiques.

Echantillon	Rendement (G/G + S)	Composition (S/G)
Bois brut (résidu pariétal)	28 ± 1	2.6 ± 0.1
Hydrolyse alcaline (culot acido-insoluble)	33 ± 1	2.0 ± 0.1
Hydrolyse acide (fraction acido-insoluble)	27 ± 1	3.7 ± 0.1

La figure 2 permet aussi de proposer des mécanismes expliquant la formation d'aldéhydes hydroxycinnamiques (coniféraldéhyde et sinapaldéhyde) et d'aldéhydes benzoïques (vanilline et syringaldéhyde). Il suffit pour cela de considérer l'unité monomérique terminale liée par la liaison notée T. D'après les études faites sur divers modèles

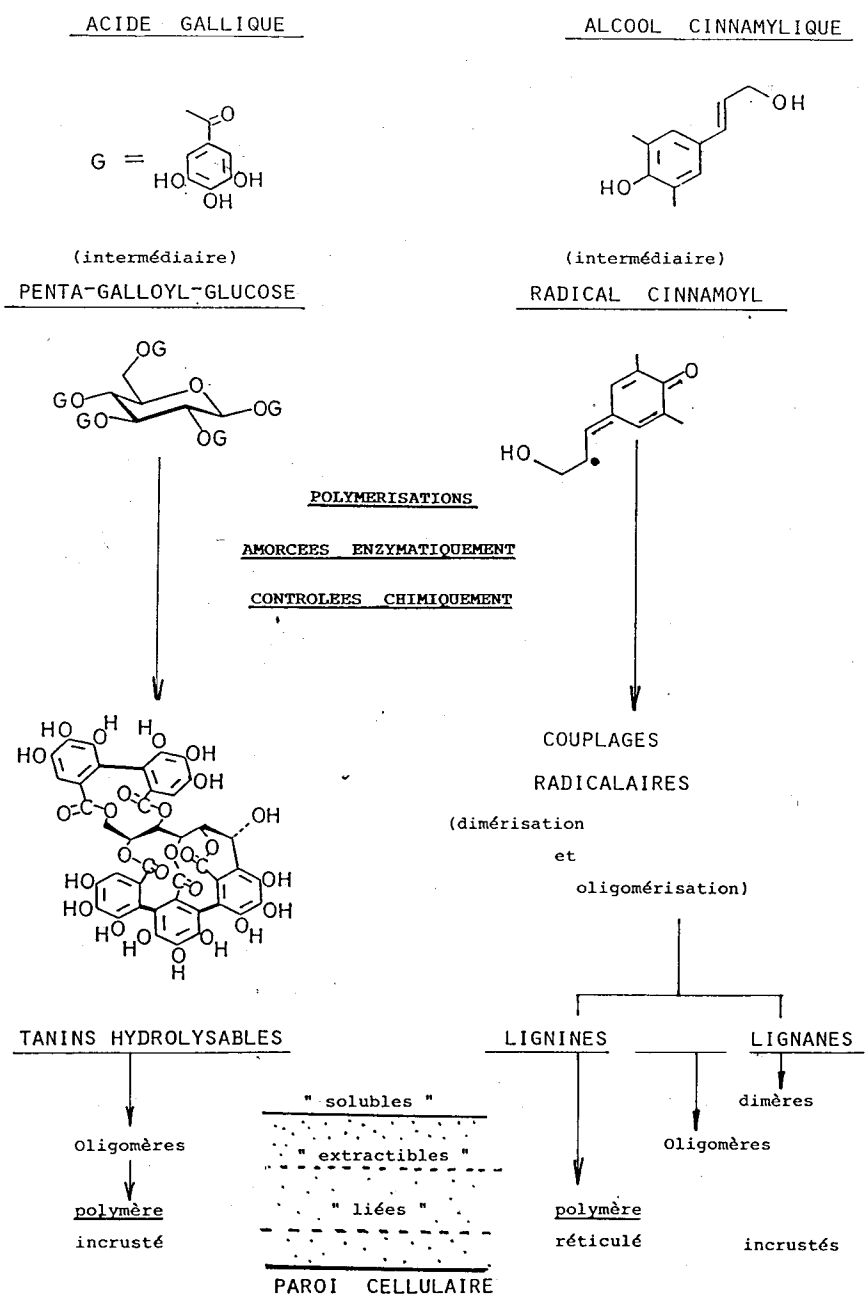


Fig. 4. — Modèle d'association entre composés phénoliques et paroi cellulaire dans le cas des bois de chêne.

Les formes polymérisées de type tanins et lignines seraient rendues insolubles soit par liaison chimique covalente soit par piégeage, ou «incrustation», physique avec les constituants polyosidiques. Les composés de type monomères ou dérivés de ceux-ci tels que les aldéhydes phénoliques, existeraient sous forme soit directement «soluble» à l'aide de solvants, soit «extractible» après ouverture des pores par gonflement des parois, soit «liée» chimiquement.

par KRATZ et *al.*, (1959), on peut expliquer la formation d'aldéhyde coniférylique (ou sinapylique) par une réaction d'élimination concernant le carbone γ et aboutissant à la rupture de la liaison aryléther T (figure 5). La formation de vanilline (ou syringaldéhyde) résulterait ensuite du clivage oxydatif de la double liaison conjugée, $\alpha\beta$, des aldéhydes cinnamiques correspondants, selon le modèle du PUECH (1984). Il est remarquable que ces deux types de produits aient été observés par KRATZL tant sur des préparations de lignine, des lignines de BRAUNS (lignanes ? que des polymères et des dimères modèles chauffés à 175° C (1h), en milieux aqueux acidifié à pH = 3.0 par quelques gouttes d'acide acétique.

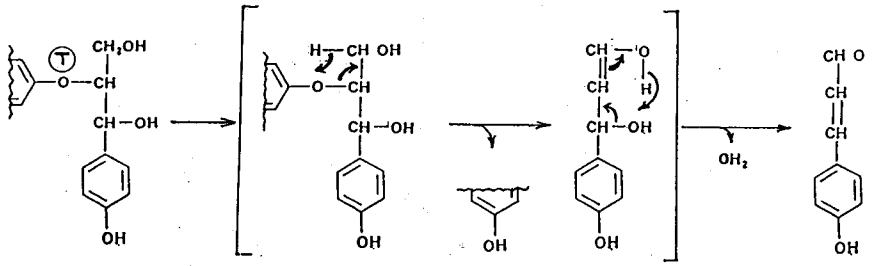


Fig. 5. — Mécanisme hypothétique de formation d'aldhéhydes hydroxycinnamiques par élimination γ-β d'unité monomère terminale.

L'élimination γ-β qui aboutit à la formation de cinnamaldéhydes n'est pas exclusive de la voie de formation des cétones de Hibbert par élimination α-β qui mène aussi, par l'oxydation des α-propanones intermédiaires, aux aldéhydes benzoiques (voir texte). Le mode de substitution des monomères est indifférent.

Le tableau I permet de constater que le chauffage de bois sec, pendant 1 heure à 160° C en tube scellé, provoque la formation d'aldéhydes benzoïques extractibles par l'éthanol ainsi que des aldéhydes hydroxycinnamiques : coniféraldéhyde et sinapaldéhyde (publication en préparation). Il est vraisemblable que dans les deux cas, il y a réarrangement des unités terminales des lignines selon le mécanisme de la figure. Il est tentant de rapprocher ces résultats des données obtenues par pyrolyse des bois à haute température (FENGEL et WEGENER, 1984; FAIX et MEIER, 1987) au cours de laquelle la formation des aldéhydes vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde et sinapaldéhyde a été observée en quantités variables selon les essences de bois avec, en plus, formations de dérivés de type crésols, éthylphénols et eugénols. Des composés de ce type ont été rapportés dans des eaux-de-vie par LEHTONEN et LEHTONEN (1983); la formation de composés de ce type a été aussi décrite par BREZNY et *al.*, (1983) lors de la pyrolyse de dimères modèles de lignine réalisée entre 275° et 315° C. La présence de fonctions alcool benzylique (figure 2) suffirait cependant à abaisser de façon très significative (150° au lieu de 270°) la stabilité thermique des liaisons aryl-alkyl-ether en β (DOMBURG et *al.*, 1974); le domaine de température est plus proche du domaine 60°-90° qui est généralement assigné aux températures de transition thermique des lignines gaiacyl *in situ* de conifères (IRVINE, 1984; SALMEN, 1984). Il est donc très vraisemblable que la structure moléculaire des lignines affecte, dans la zone 60-150° C, leur stabilité thermique et leur réactivité. Lors d'une étude comparative faite sur fractions de lignine de peuplier et de pin par calorimétrie différentielle

entre 50 et 200° C, il nous a été possible de montrer des différences de stabilité thermique qui seraient attribuables à la composition monomérique des lignines (LAPIERRE et *al.,* 1986). Il est vraisemblable que des effets analogues puissent exister lors du cintrage des bois de chêne et que ces effets dépendent de la présence d'extractibles capables de provoquer des hydrolyses avec réactions de recondensation par exemple. Dans ces conditions de pyrolyse aérobie, il pourrait y avoir rupture radicalaire intramoléculaire des lignines au niveau de liaisons $\alpha\beta$ avec formation de structures aldéhydiques, vanilline et syringaldéhyde, liées sous forme éther selon un mécanisme analogue à celui décrit par ROBERT et CHEN (1987) et qui ne seraient solubilisables qu'après hydrolyse alcaline.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la formation d'aldéhydes phénoliques est possible dans le bois même après chauffage modéré et en présence d'humidité dans des conditions voisines de celles mises en œuvre lors du thermoformage des douelles de futailles. Cette conclusion n'est cependant pas exclusive de la possibilité de formation de ces mêmes aldéhydes par acidolyse douce, selon un processus chimique à température ambiante, lors de la maturation des vins et eaux-de-vie. Elle n'est pas non plus exclusive de la formation de ces mêmes aldéhydes par voie microbienne discutée précédemment.

CONCLUSION

Il est surprenant de constater que le bois de chêne qui est à la fois important comme matériaux (meubles, futailles) et comme source de produits chimiques (tanins) soit encore si mal connu tant pour ses propriétés physiques que chimiques particulières.

De ce fait, les modèles explicatifs que nous proposons, par analogie avec les données obtenues sur d'autre bois, doivent être considérés avec réserve. C'est en particulier le cas, pour les modèles cités, pour expliquer la variabilité du retrait au séchage, le piégeage des extractibles dans les pores de taille moléculaire des parois cellulaires ainsi que l'influence des extractibles et des lignines sur la perméabilité et l'affinité des bois pour les alcools organiques.

Les conclusions concernant la formation d'aldéhydes phénoliques, benzoïques et cinnamiques, par thermolyse des bois ainsi que l'association de composés de type ellagique avec les parois cellulaires des bois de cœur de chêne sont beaucoup moins incertaines; elles sont en cours de confirmation.

Compte tenu de l'importance technologique des bois de chêne et de la multiplicité des effets physiques et chimiques que sont susceptibles d'excercer les extractibles phénoliques en particulier, il serait aussi très important de préciser aussi leur variabilité génétique et phénologique.

Note ajoutée en cours de publication

Le lyonirésinol vient d'être récemment identifié par NABETA K., YONEKUBO J. et MIYAKE M. (1987. Moquzai gakkaishi. **33,** 408-415), comme le plus dominant des composés phénoliques du bois de cœur du chêne pédonculé et des eaux-de-vie vieil-

lies en fût de chêne. La teneur rapportée par ces auteurs dans le bois (40,3 mg/kg) est cependant très inférieure à celle des tanins totaux trouvée ici (tableau II) et, en particulier, des composés de type vescalagine qui sont prédominants parmi ces derniers.

RÉSUMÉ

Les polyphénols du bois de chêne, extractibles et composés liés à la paroi végétale = lignines, lignanes, tanins et aldéhydes phénoliques, ont été envisagés au niveau moléculaire de leurs relations avec les propriétés physico-chimiques des bois : retrait, porosité, propriétés mécaniques.

Des résultats originaux ont été aussi présentés concernant le fractionnement des polyphénols pariétaux, l'incrustation des parois par les tanins hydrolysables : acide ellagique associé à des fractions de lignine, ainsi que la formation d'aldéhydes phénoliques (vanilline, syringaldéhyde, aldéhydes coniférylique et sinapylique) par pyrolyse douce de la lignine. Des mécanismes réactionnels hypothétiques ont été suggérés.

SUMMARY

Oak wood phenolics, extractives and cell wall linked compounds : lignins, lignans, tanins and phenolic aldehydes have been discussed, at the molecular level, in their relations with physico-chemical properties of wood = shrinking, permeability and mechanical properties.

Unpublished results have been also reported concerning fractionnation of cell wall phenolics, incrustation of cell wall by tanins : ellagic acid associated with lignins fractions and formation of phenolic aldehydes (vanillin, syringaldéhyde, coniferaldehyde, sinapaldehyde) during mild pyrolysis of lignin in oak wood. Hypotherical reaction mechanism have been suggested.

ZUSAMMENFASSUNG

Die extrahierbaren Polyphenole des Eichenholzes und die Stoffe, die an die planzliche Zellwand gebunden sind (Lignin, Lignan, Tannin, Phenolaldehyde) wurden auf molekularer Ebene auf ihr Verhältnis mit den physisch-chemischen Eigenschaften des Holzes untersucht.

Hinsichtlich der Fraktionierung der parietalen Polyphenole und der Ablagerung der hydrolisierbaren Tannine auf die Zellwand wurden neuartige Ergebnisse vorgestellt : die Verknüpfung ellagischer Säure mit Ligninfraktionen und die Bildung von Phenolaldehyden (Vanillin, Syringaldehyd, koniferische und sinapylische Aldehyde) durch leichte Pyrolyse des Lignin. Hypotetische Mechanismen der verschiedenen Reaktionen wurden vorgeschlagen.

RESUMEN

Los polifenoles de la madera de roble, extraibles así como compuestos ligados a la pared vegetal = ligninas, taninos y aldehidos fenólicos, han sido considerados a nival molecular de sus relaciones con las propiedades fisicoquímicos de las maderas : retraimiento, porosidad, propropiedades mecánicas.

También se presentan resultados originales en relacíon al fraccionamiento de los polifenoles parietales, la incrustatión de la paredes por los taninos hidrolizables :ácido ellágico asociado las fracciones de lignina, así como la formacíon de aldehidos fenólicos (vanillina, siringaldehido, aldehidos coniferílicos y sinapílicos) por pirólisis dulce de la lignina. Se sugieren los mecanismos reaccionales hipotéticos.

RIASSUNTO

I polifenoli del legno di quercia, estraibili e composti, legati alla parete vegetale = lignine, lignane, tannini e aldeidi fenolici, sono stati studiati al livello molecolare delle loro relazioni con le proprietà fisico-chimiche dei legni : Ritiro, porosità, proprietà mecaniche.

Risultati originali sono stati presentati concernente il frazionamento dei polifenoli parietali, l'incrostazione delle pareti dai tannini idrolisabili : acido ellagico unito a frazioni di lignina, cosí come la formazione d'aldeidi fenolici (vanillina, siringaldeide, aldeidi coniferilici e sinapilici) con pirolisi dolce della lignina. Mecanismi reazionali ipotetici sono stati suggeriti .

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anonyme, 1984. Tonnellerie : le bois bonificateur. *Informations Bois,* **53,** 15-19.

BARISKA M. et PIZZI A., 1986. The interaction of polyflavonoïd tanins with wood cell walls. *Holzforschung,* **40,** 299-302.

BLACK R.A., ROSEN A.A. et ADAMS S.L., 1953. The chromatographic separation of hardwood extractives components giving color reaction with phloroglucinol. *J. Am. Chem. Soc.,* **75,** 5344-5346.

BREZNY R., MIHALOV V. et KOVACIK V., 1983. Low temperature thermolysis of lignin. *Holzforschung,* **37,** 199-204.

BRICOUT J., 1971. Analyse de quelques constituants dérivés du Chêne dans les vieilles eau-de-vie d'Armagnac. *Ann. Technol. Agric.,* **20,** 217-223.

BROWN S.A., 1985. Recent advances in the biosynthesis of coumarins. In *«The biochemistry of Plant Phenolics»* (Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europ. VAN SUMERE C.F. et LEA P.J. ed.), **25,** 257-270.

BUTLER W.L. et SIEGELMAN H.W., 1953. Conversion of cafeic acid to aesculetin during paper chromatography. *Nature,* N° 183, 1813-1814.

CAUMEIL M., 1983. Le cognac. *Pour la Science,* 48-56.

CHARUK E.V. et RAZUMOVA A.F., 1974. Der Einfluss von Holzextrakstoffen auf die Permeabilität von Holz. *Holztechnol.,* **15,** 36, 37

CHEN C.-L., 1970. Constituents of *Quercus rubra. Phytochemistry,* **9,** 1149.

CHEN C-L. et CHANG H.M., 1985. Chemistry of lignin biodegradation. In *«Biosynthesis and biodegradation of wood component»,* 535-556. HIGUCHI Ed., Academic Press pub. 679 pages.

DANIEL G. et NILSON T., 1986. Ultrastructural observation of wood degrading erosion bacteria. *I.R.G. Wood Preservation Pub.,* IRG/WP/1283, 28 p, IRG pub STOCKHOLM.

DOMBURG G., ROSSINSKAYA G. et SERGEEVA V., 1974. Study of thermal stability of β-ether bonds in lignin and its models. *Thermal Analysis,* **2,** 211-221.

EHRNROOTH E.M.L., 1984. The swelling of dried and never dried acid chlorite delignified fibers. *Svensk Papperst,* **12,** 74-77.

FAIX O. et MEIER D., 1987. Pyrolitic and hydrogenolitic degradation studies on lignocellulosics, pulps and lignin. *Fourth Int. Symp. Wood Pulping Chem.,* ISWPC Paris, 253-258.

FENGEL D. et WEGENER G., 1984. In *«Wood : chemistry, ultrastructure reactions»*, 319-344. W. de GRUYTER Ed., 613 pages.

FEUILLAT M., 1982. L'élevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne. *Rev. Franç. Oenol.*, **88 bis,** 17-29

FREUDENBERG K., 1968. The constitution of lignin in *«Constitution and biosynthesis of lignin»*, p. 64, 122. FREUDENBERG K., NEISH A.C. Ed., Springer Vlg pub., 129 pages.

GLORIES Y., 1983. Étude de quelques facteurs intervenant sur la qualité des vins de garde. *Rapport DGRST n° 81G1338,* 20 pages, Institut Oenologie, Bordeaux.

GREAVES H., 1970. The effect of some wood inhabiting bacteria on the permeability of *Eucalyptus regnans* and *Pinus radiata* sapwood and heartwood. *Holzforschung,* **24,** 6-14.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A., 1968. Separation of vanillin, syringaldehyde and other aromatic compounds in the extracts of french and american woods by brandy and aqueous solutions. *Qual. Plant. Mat. Veget.,* **16,** 320-333.

HASLAM E. et LILLEY T.H., 1985. New polyphenols from old tannins in «The Biochemistry of Plant Phenolics» (Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europ. VAN SUMERE C.F. et LEA P.J. Ed.), **25,** 237-256.

HERGERT H.L., 1958. Cork from white fir bark. *Forest Prod. J.,* **8,** 335-339.

HERBERT H.L., 1977. Secondary lignification in conifers in *Cell. Chem. Technol.* (ACS Symp), **48,** 227-243.

IRVINE G.M., 1984. The glass transition of lignin and hemicellulose and their measurement by differential thermal analysis. *Tappo,* **67,** 118-121.

JOSEPH E. et MARCHE M., 1972. Contribution à l'étude du vieillissement du cognac, identification de la scopolétine, de l'aesculetine, de la β-méthylombelliferone, de l'aesculine et de la scopolétine, hétérosides provenant du bois. *Connaissance Vigne Vin,* **6,** 273-330.

JOUIN D., TOLLIER M.-T. et MONTIES B., 1987. Linification of oakwood - 1 - lignine déterminations in sapwood and heartwood. *Cell. Chem. Technol.* (sous presse).

KLAUDITZ W., 1952. Zur biologisch-mechanischen wirkung des Lignins in Stammholz der Nadel- und Laubhölzer. *Holzforschung,* **6,** 70-82.

KLAUDITZ W., 1957. Zur Biologisch-mechanischen wirkung des Hemicellulosen in Festigungsgewebe der Laubhölzer. *Holzforschung,* **11,** 110-116.

KRATZL K., KISSER W., GRATZL J. et SILBERNAGEL H., 1959. Der β-guajacyläther des Guajacylglycerins, seine Umwandlung in Coniferaladehyde und verschiedene andere Aryl-propan derivate. *Monatsch. Chem.,* **90,** 771-782.

LAPIERRE C., ROLANDO C. et MONTIES B., 1983. Characterization of poplar lignins acidolysis products : capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung,* **37,** 189-198.

LAPIERRE C., MONTIES B., VASSAL-GONTHIER A. et DWORKIN A., 1986. Differential calorimetric study of pine and poplar lignins between 300 an 525° K. *J. Appl. Polym. Science,* **32,** 4561-4572.

LEHTONEN M. et LEHTONEN F., 1983. The determination of volatile phenols in rum and brandies by GC and LC. *Instrumental Anal. Food.,* **2,** 397-407.

LUNDQUIST K., 1970. Acid degradation of lignin. *Acta Chem. Scand.* **24,** 889-907.

MARCHE M., JOSEPH E., GOIZET A. et AUDEBERT J., 1975. Étude théoriques sur le cognac et son vieillissement en fûts de chêne. *Rev. Franç. Oenologie,* N° 57, 1-17.

MONTIES B., 1985. Recent advances on lignin inhomogeneity in *«The biochemistry of Plant Phenolics»* (Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europ. VAN SUMERE C.F. et LEA P.J. Ed.). **25,** 161-181.

MONTIES B., MESTRES C. et BAGDHADI K., 1981. Chemical and physical properties of a brittle culm lignin rich mutant of rice. *Int. Symp. Wood Pulping Chem. (ISWPC) Ekmann-Days,* **4,** 40-44. STFI pub., Stockholm.

MORCK R., YASUDA H., KRINGSTADT K. et HATAKAYAMA H., 1966. Fractionation of kraft lignin by successive extraction with organic solvents. *Holzforschung,* **40,** 51-60.

NABETA K., YONEKUBO J. et MIYAKE M., 1986. Analysis of volatile constituents of european and japanese oaks. *Mokusai Gakk.,* **32,** 921-927.

NAUDIN R., 1986. Élevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne; cas des vins blancs et rouges de garde. C.S.T. Session I.T.V., Institut Technique du Vin publication, 17 pages.

OBST J. et LANDUCCI L.L., 1986. Quantitative ^{13}C-NMR of lignins-methoxy : aryl ration. *Holzforschung,* **40,** 87-92.

PEARL I.A., BEYER D.L., JOHNSON B. et WILKINSON S., 1987. Alkaline hydrolysis of representative hardwoods. *TAPPI,* **40,** 374-378.

PECK E.C., 1957. How wood shrinks and swells. *Forest. Prod. J.,* **7,** 235-244.

PUECH J.L., 1984. Characteristics of oak wood and biochemical aspects of armagnac aging. *Am. J. Oenol. Vitic.,* **35,** 77-81.

PUECH J.L. et VISOCKIS R.J., 1986. Extraction et évolution des composées phénoliques du bois de chêne au cours du vieillissement des whiskies. *Lebens. Untersuch. Forschg.,* **19,** 469-471.

PUECH J.L., LEAUTE R., CLOT G., MONTEDEU L. et MONDIES H., 1982. Étude de la lignine et de ses produits de dégradation dans les eaux-de-vie de cognac. *Bull. Groupe Polyphenol,* **11,** 605-611.

PONTALLIER P., SALAGOÏTY-AUGUSTE M.H., RIBÉREAU-GAYON P., 1982. Intervention du bois de chêne dans l'évolution des vins rouges élevés en barriques. *Connaissance Vigne Vin,* **16,** 45-61.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P., SUDRAUD P., 1975. Vieillissement des vins, chap. 14 in *Trait. d'œnologie* Vol. 3, 710-724. Dunod Ed., Paris.

ROBERT D. et CHEN C.L., 1987. Structural analysis of biodegraded lignins from spruce wood decayed by *Phanerochaetes Chrysosporium* by quantitative ^{13}C NMR spectroscopy. *Fourth Int. Symp. Wood and Pulping Chem.* (ISWPC Paris), 139-145.

ROSEN H.N., 1978. Interactions of alcools and organics acids with wood. *Wood Science,* **10,** 151-157.

SAKAKIBARA A., SASAYA T., MIKI K., et TAKAHASHI H., 1987. Lignans an BRAUN's lignin from softwood. Holzforschung, **41,** 1-11.

SALMEN L., 1984. Viscoelastic properties of *in situ* lignin under water satured conditions. *J. Mat. Scienc.,* **19,** 3090-3096.

SALOMON M. et KOZAK., 1968. Shrinkage of sapwood and heartwood of young douglas fir trees. *Forest Prod. J.,* **18,** 90-94.

SARKANEN K. et LUDWIG C.H., 1971. *Lignins : occurence, formation, structure and reactions.* 916 pages Wiley. Interscience Pub.

SCALBERT A., MONTIES B. et JANIN G., 1987. Comparaison de méthodes de dosage des tanins : application à des bois de différentes espèces. *C.R. 2ème Colloque Science Technique du Bois (NANCY), (sous presse).*

SCALBERT A., MONTIES B., DUPOUEY J.L. et BECKER M., 1986. Polyphenols extractibles du bois de Chêne. *Bull. Groupe Polyphénols,* **13,** 615-619.

SCHUERCH C., 1952. The solvent properties of liquids and their relation to the solubility and fractionnation of lignin. *J. Am. Chem. Soc.,* **74,** 5061-5067.

SEIKEL M.K., HOSTETTLER F.D. et NIEMANN G.J., 1971. Phenolics of *Quercus rubra* wood. *Phytochem.* **10,** 2249-2251.

SHARMA U., BRILLOUET J.M., SCALBERT A. et MONTIES B., 1986. Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oriza sativa L.,* characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharide from rice stem. *Agronomie,* **6,** 265-271.

SINGLETON V.L. et DRAPER D.E., 1961. Wood chips and wine treatment : the nature of aqueous alcool extracts. *Am. J. Oenol. Vitic.*, **12,** 152-158.

SINGLETON V.L., 1974. Some aspects of the wooden container as a factor in wine maturation in «Chemistry of Wine Making». 255-277. A.C.S. series n° 137, WEBB A.D. Ed., 311 p, ACS Pub.

STAMM A.J., 134. Effect of inorganic salts upon swelling and shrinking of wood. J. Am. Chem. Soc., **56,** 1195-1204.

STAMM A.J., 1942. Variation in shrinking and swelling of wood. *Trans. A.S.M.E.*, **63,** 379-386.

STEELINK C., 1972. Biological oxydation of lignin phenols. *Rec. Adv. Phytochem.*, **4,** 239-270.

STONE J.E. et SCALLAN M., 1968. A structural model for cell wall water swollen pulp fibers based on their accessibility to macromolecule. *Cell. Chem. Technol.* **2,** 343-358.

TARKOW H. et FEIST W.C., 1968. The superswollen state of wood. *TAPPI*, **51,** 80-83.

TOLLIER M.T., MONTIES B.,LAPIERRE C., HERVÉ DU PENHOAT C. et ROLANDO C. 1986. Inhomogeneity of angiosperm lignin. *Holzforschung*, **40,** 75-79.

TRICARD C., SALAGOÏTY M.H. et SUDRAUD P., 1987. La scopolétine : un marqueur de la conservation en fûts de chêne. *Connaissance Vigne Vin*, **21,** N° 1, 33-41.

WARDROP A.B. et DAVIES G.W., 1961. Morphological factors relating to the penetration of liquids into wood. *Holzforschung*, **15,** 129-141.

9 Recent advances on lignin inhomogeneity

B. MONTIES

Introduction

Biosynthetic and model compound studies (Freudenberg and Neish 1968) have shown that the basic monomer of the lignin polymer is the phenylpropane C9 unit. In gymnosperm lignin, the majority of monomers have a methoxyl group adjacent to the phenolic hydroxyl to give a guaiacyl unit (G) as shown in Fig. 9.1. Other monomeric units may contain two methoxyl groups

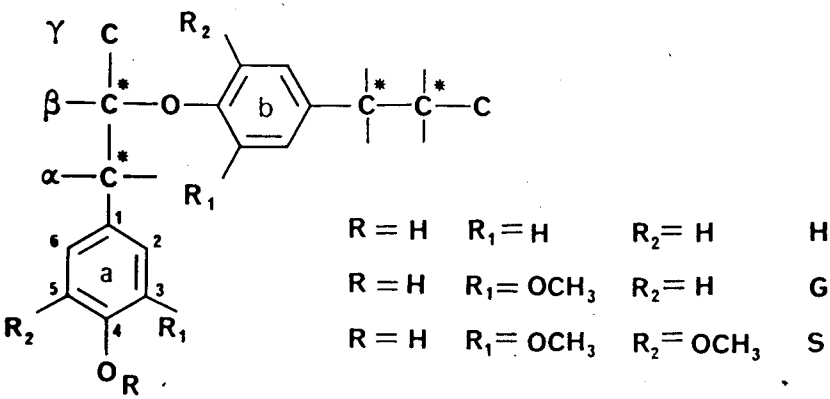


Fig. 9.1. Structure and nomenclature of the phenylpropane C9 monomers shown in a model 'dimer'. Formally, the phenylpropane units can be regarded as a phenylglycerol. The ether linkage joining the two units is a β-aryl ether bond which is the most abundant linkage in lignins and is characteristic of the 'end wise' linear structure according to Sarkanen (1971).

adjacent to the phenol, or contain no methoxyl group at all; these correspond respectively to syringyl(S) or hydrophenyl(H) units (Fig. 9.1). In angiosperm and in monocotyledon lignins, S units occur at about the same frequency as G monomers but H monomers remain in a minority.

Thus, gymnosperm and angiosperm lignins are classified as 'guaiacyl' and 'guaiacyl-syringyl' type lignins, which are the most typical examples of lignin 'inhomogeneity' or 'heterogeneity'.

The use of the generic term, lignin, represents a simplification that does not reflect the many variations reported between the lignin fractions isolated either from the same or from different plants. Since 1970, the number of publications using the terms 'lignin heterogeneity' (Murakoshi and Sakakibara 1971; Terashima *et al.* 1979; Glasser 1980; Monties and Lapierre 1981; Fengel and Wegener 1984) or 'lignin inhomogeneity' (Chang *et al.* 1975; Lee *et al.* 1981; Lange *et al.* 1983) of lignin have greatly increased.

LES POLYMERES VEGETAUX 392/529

Monotes
ex d'auteur
reçu 13 X 85

ANNUAL PROCEEDINGS OF

THE PHYTOCHEMICAL SOCIETY OF EUROPE

EDITED BY

C. F. VAN SUMERE and P. J. LEA

VOLUME 25
(corig)
1985

THE BIOCHEMISTRY OF PLANT PHENOLICS

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

CLARENDON PRESS · OXFORD

393/529

In this review, which cannot be exhaustive in terms of all references available, I will present and discuss mainly results obtained in our laboratory which concern two types of 'heterogeneity' (Monties and Lapierre 1981). The term heterogeneity has been applied at two levels: firstly, monomeric composition of lignin fractions; secondly, type of linkage between phenolic acids and lignin preparations. Some fractionation procedures which may influence the heterogeneity of these preparations will be also discussed. However, it seems desirable to clarify, first, the concept of heterogeneity and to illustrate at what structural level the inhomogeneity of lignin has been emphasized.

Lignin Inhomogeneity or Lignin Heterogeneity?

The term 'heterogeneous' has often been used as a synonym of 'polydisperse' in the description of biological macromolecular preparations. Gibbons (1963) has discussed clearly the fact that a preparation may be monodisperse with respect to one measurable property, polydisperse with respect to a second and heterogeneous with respect to a third. In the view of this author, a mixture of two different molecular species each pure or homogeneous but polydisperse would be heterogeneous. As the molecular and macromolecular properties of the lignin fractions frequently remains ill defined, it seems better to use the term lignin inhomogeneity to describe the variations in the size and structural details of the preparations.

Levels of Inhomogeneity in Lignins

Literature distinguishes several main level of inhomogeneity which include molecular, macromolecular, supermolecular and cytochemical level.

MOLECULAR INHOMOGENEITY IN LIGNINS

Lignin has been studied most intensively at the molecular level. Detailed reviews have been published (Freudenberg and Neish 1968; Sarkanen and Ludwig 1971; Adler 1977; Sakakibara 1980; Glasser 1980) in which lignin molecular models were constructed and altered to include additional informations as they become available. Chemical properties and reactivity of lignin has even been computer simulated by Glasser (1974). Experimental results were combined and interpreted in terms of average phenylpropane substructure in lignin preparations; a structural scheme for guaiacyl lignin including a 95 monomer unit was obtained (Glasser 1980). Comparison of these models reveals discrepancies attributed to differences in types and frequencies of intermonomeric linkages (Glasser and Glasser 1981). As pointed out by Sakakibara (1977), it is important to emphasize that these models provide only statistical informations for example the frequency of intermonomeric linkages. Moreover, with the exception of the scheme proposed by

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 part 1
394/529

Nimz (1974) for birch lignin, all these models are representative of gymnosperm guaiacyl type lignin only. The well-established molecular inhomogeneity corresponding to variations in the frequency of the H, G and S monomers in the 'guaiacyl' and 'guaiacyl-syringyl' classes of lignins (Creighton *et al.* 1944) has been excellently reviewed by Sarkanen and Hergert (1971) and by Adler (1977). However, variations in monomeric composition and in type of monomeric linkage in relation to classification, discussed by these authors, or in relation to cytological origin and condition of growth, such as in reaction woods as reviewed by Monties and Lapierre (1981) were not taken into account. This imparts a special interest in macromolecular aspects of lignin inhomogeneity.

MACROMOLECULAR INHOMOGENEITY IN LIGNIN

The macromolecular structure of lignin has been examined at different levels by Erins *et al.* (1976), Gravitis *et al.* (1976) and Gravitis and Erins (1983). According to these authors and to polymer text-books (Flory 1953; Rodriguez 1971; Manson and Sperling 1977; Bovey and Winslow 1979), it is sufficient to consider here the topological order of the monomers and the resulting spacial structure of lignins.

Topological Order of Monomers in Lignins

Topological order of monomers in lignin fractions should be considered as important because some spacial properties of the lignin polymer may not be closely dependent on the molecular geometry but may be determined mainly by the order among the monomers. At the topological level, lignin inhomogeneity may be accounted for variations in the spacial distribution of the three monomer units in the polymeric structure. Two extreme examples of spacial distribution have been suggested respectively by Brauns (1952) and by Obst (1982).

From comparative analysis of birch lignin fractions, Brauns suggested two different topological arrangement for 'syringyl-guaiacyl' lignins. The first arrangement comprised two types of lignins: one containing only guaiacyl units (type I), the other consisting in a mixture of syringyl and guaiacyl groups (type II):

G-G-G-G-G-G S-G-S-G-S-S-S-G-G-S

Type I lignin Type II lignin

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

The second arrangement involved a type III lignin which contains both type I and type II in a such way that cleavage into type I and type II readily occurred during isolation (dotted line):

395/529

G-G-G-G-G-G-S-G-S-G-S-S-G-S-S

Type III lignin

Contrary to this view, Obst concluded from delignification studies of oak and birch cell wall fractions, that discrete syringyl and guaiacyl homopolymers, if present, would have to be thoroughly mixed; according to his conclusion and to the usual nomenclature of polymer chemistry (Bovey and Winslow 1979), lignin may exist as a syringyl-guaiacyl copolymer with G and S units arranged almost completely in random. With respect to the same nomenclature, the Braun's type III angiosperm lignins may be described either as a block polymer or as grafted polymer (Fig. 9.2) according to whether branching occurs at the terminal or non terminal units of linear type structures.

According to Brauns, homopolymer sequences may be also present but containing only G units. Furthermore, homopolymer syringyl sequences linked by β-aryl ether type linkage (Fig. 9.1) has been suggested from model studies by Sarkanen (1971). According to the conditions of polymerization, the formation of linear ('endwise') and of branched ('bulk') polymers were suggested. The possible formation of such polymers has been supported by results of studies on physico-chemical properties of synthetic lignin models (Lai and Sarkanen 1975; Yamasaki *et al.* 1978*a*; Karmanov *et al.* 1980).

The existence of such 'syringyl lignin' was earlier considered dubious by Freudenberg and coworkers who reported that the syringyl monomer does not lead to lignin like polymers; instead, it is dimerized or oxidized (Freudenberg and Neish 1968). The isolation and characterization of a lignin fraction, from birch wood, rich in syringyl units, by Yamasaki *et al.* (1978*b*), can be taken as indicative of the possible occurrence of homopolymer sequences of the syringyl type. To our knowledge, no other detailed information has been published describing these topological aspects of lignin structure. For some years we have sought evidence of monomeric inhomogeneity in lignin fractions isolated from poplar wood. Discussion of these results, presented later, requires a brief review concerning the supermolecular and cytochemical aspects of inhomogeneity.

Supermolecular Organization in Lignins

The supermolecular level includes the overall architecture of lignins and their general relationship with the other macromolecules of the cell wall. In 1962, Goring discussed the physico-chemical properties of lignin before and after extraction from wood. As lignins are only solubilized after degradation, and since the solubilized lignins show, in general, a wide polydispersity and a low viscosity, Goring suggested that lignin occurs in wood as a three dimensional network. This hypothesis was in accordance with previous studies on deligni-

LES POLYMERES VEGETAUX vol. 2 part 1
396/529

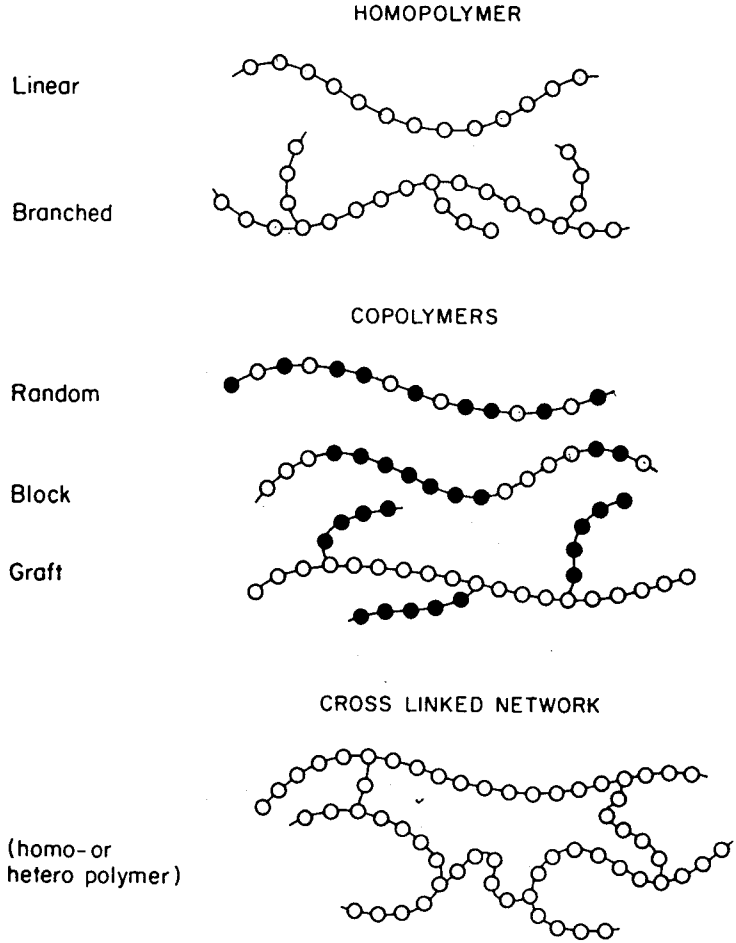


Fig. 9.2. Structures of homopolymers and copolymers. Only two different type of monomers are shown: open and closed circle. The formation of a circle is possible in a cross linked network. According to Gravitis *et al.* (1971), the formation of such a microgel may be a factor of supermolecular inhomogeneity in lignins.

fication (Nokihara *et al.* 1957) and was confirmed by theoretical interpretations of delignification kinetics (Szabo and Goring 1968; Bolker and Brener 1970; Yan 1981; Yan and Johnson 1981).

These interpretations have led to the conclusion that lignins behave like a gel: an infinite network characterized by an infinite average molecular weight (Flory 1953; Bovey and Winslow 1979). Even if soluble lignins and perhaps lignin in wood, appear of finite dimensions (Goring *et al.* 1979; Goring 1983), the infinite dimension of the network is not a serious objection. An infinite

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1
397/529

degree of polymerization is a mathematical definition of a gel, whilst the chemical definition is that a gel is insoluble in good solvents (Yan and Johnson 1981), which is the case for lignins in wood. Thus, at the supermolecular level, lignins seem to exist as gels, the formation of which can be described as being the result of gradual polymerization of highly branched molecules in a crosslinked network (Fig. 9.2). At present, experimental data on lignin gels and gel formation are lacking. According to Gravitis *et al.* (1971) and to Gravitis and Erins (1983), the microglobular particles in lignin preparations reported by Goring (Goring *et al.* 1979; Goring 1983) should result from a microgel formation step during the lignification process. Fig. 9.3 summarizes the Gravitis and Erin's model with slight modifications. The microgel particles are defined as branched macromolecules enclosed in circles. Interesting but perhaps fortuitous, is the fact that only the more elaborate molecular scheme proposed until now (Glasser 1981), includes two adjoining circles with 11 and 29 monomer units, respectively. Model studies on lignification have shown that the solubility of the model oligomers, such as II in Fig. 9.3, is strongly dependent on the conditions of polymerization (Lai and Sarkanen 1975) and on the nature and relative concentrations of monomeric units (Schweers and Faix 1973; Faix and Besold 1981). As the solubility factor is considered as critical during microgel evolution (Karmanov *et al.* 1982) and the polymerization of model lignins (Allan *et al.* 1973), we can assume that the distribution of G and S monomer units are non random at least, for example, in the crosslinked microgels (V, Fig. 9.3). Thus topological and supermolecular inhomogeneity in lignins may be interdependent. However, since no experimental data are currently available to confirm these models, it remains to try and relate these macromolecular data with cytochemical observations.

CYTOCHEMICAL INHOMOGENEITY

Cytochemical inhomogeneity with respect to the distribution of lignins with different monomeric compositions has been clearly shown by ultraviolet microscopy of angiosperm cell walls (Musha and Goring 1975). In birch, the fibre secondary cell wall S_2 contains largely syringyl residues while the vessel secondary wall S_2 consists mainly of guaiacyl units. These results have been confirmed by transmission electron microscopy with energy dispersive X-ray analysis (TEM EDXA) after bromination of lignin by Saka *et al.* (1983). However, some discrepancies which were found between the two methods, may have arisen from low UV absorbance measurement. A good method for resolving this discrepancy is to separate physically various tissue fractions. This type of fractionation has confirmed that lignin in different fractions of birch wood has different proportions of syringyl to guaiacyl monomeric units: secondary walls of the fibers as well as ray cells were found to be richer in syringyl units while middle lamella-, primary wall-, and vessel-lignins were

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 part 1
398/529

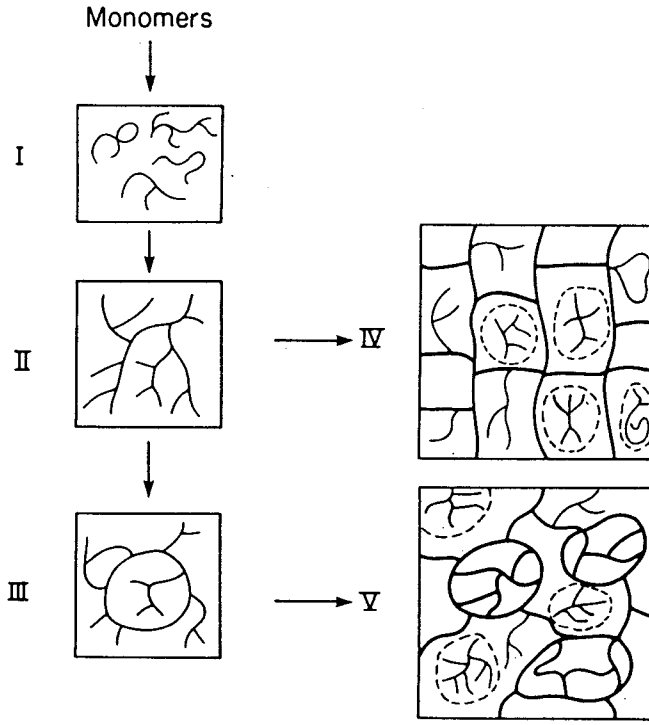


Fig. 9.3. Macromolecular aspect of lignification with formation of heterogeneous network modified from Gravitis and Erins (1983). I: linear (endwise) or slightly branched (bulk) oligomers; II: branched polymer; III: microgel particle: branched macromolecule with circles; IV: homogeneous crosslinked structure obtained by crosslinking branched polymer; V: inhomogeneous crosslinked structure obtained by crosslinking microgel. Mechanically active chains in the network are drawn with a thick solid line, non active as a thin line. Soluble fractions are surrounded by a dashed circle.

richer in guaiacyl units (Hardell *et al.* 1980). Thus cytochemical inhomogeneity of lignins seems clearly established in angiosperm but the relations of this third type of inhomogeneity to the molecular and macromolecular one remains still poorly defined. Two biosynthetic peculiarities of lignins may contribute to this fact: (1) lignin is a very unusual natural product in that it is optically inactive even though asymmetric carbons are present in the molecule (Fig. 9.1); (2) lignin is accumulated during the successive stages of xylem cell differentiation as a non uniform function of the stage of development and localization in the cell walls. The well established lack of optical activity of lignins (Miki *et al.* 1980) is now rationally interpreted as the result of a non stereospecific dehydrogenation of the *p*-hydroxyphenylalcohols via phenoxy radicals (Freudenberg and Neish 1968; Higuchi 1980). However, the non

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1
899/529

uniform process of lignification appears to be controlled at the cellular level (Wardrop 1976) and it progresses independently in the different parts of the wall before and after the thickening stage of S_2 (Fujita *et al.* 1981; Fujita *et al.* 1983). Furthermore during lignification the biosynthesis and the polymerization of the monomer can change as a function of growth conditions (Monties and Lapierre 1981; Boudet *et al.* 1981). Thus, on the basis of these peculiarities, lignin formation in the cell walls may be typified as an *in vivo* radical copolymerization in a heterogeneous medium. According to the laws of copolymerization well established with synthetic polymers (Mayo and Walling 1950; Flory 1953; Bovey and Winslow 1979), the occurrence of structural homogeneous network seems to be an exceptional rather than the normal case (Funke 1968). Thus with reference to synthetic polymers, the different type of inhomogeneity in lignins discussed previously does seem not at all peculiar. In terms of the condition of biosynthesis, the formation of either random or block sequences is thereby possible in the same way as the formation of a grafted copolymer between the lignin and the polysaccharide network.

In order to reveal these possible levels of inhomogeneity by physico-chemical methods the main problem is in solubilizing the lignin fraction of the cell wall with sufficient specificity to avoid destroying the inhomogeneity itself. Combining classical methods of lignin fractionation, we have tried to obtain evidence of variation in the monomer composition of different lignin fractions (topological level), and in the type of linkage between lignin and phenolic acids (supermolecular level). Fractionation and characterization procedures were also briefly studied.

Studies on Lignin Inhomogeneity

Results summarized here were obtained with F. Bayet, Catherine Lapierre and A. Scalbert and only very relevant publications are quoted.

VARIABILITY IN MONOMERIC COMPOSITION

Isolation of the total lignin from wood in a chemically unaltered form is one of the most important conditions for lignin characterization. The widely used procedure of Bjorkman consists of the extraction of lignin from finely ball milled wood, with aqueous dioxane. Despite its advantage this milled wood lignin (MWL) has two limitations: (1) the yield is low, usually less than 30% and thus MWL may be not representative of the total lignin, (2) the lignin is partly depolymerized and the nature of the changes induced by this procedure is not known.

In order to make the products of fractionation more representative, we have combined the Bjorkman procedure with another mild procedure, the Pew method, which uses commercial cellulases to hydrolyze the wood poly-

saccharides of ball milled wood and yields an enzyme lignin which is also partially depolymerized. Three lignin fractions were thereby isolated successively from extractive free poplar wood; a first fraction (LM) isolated according to Bjorkman, a second (LE) according to Pew after cellulase hydrolysis of the residue remaining after preparation of LM and a third fraction (LR) obtained after a second ball milling of the residue from the preparation of LE.

The monomeric composition of these lignins was compared by spectroscopic methods (ultraviolet, infrared, H and ^{13}C NMR) and chemical degradation (nitrobenzene oxydation and acidolysis). Different types of wood were used as reported previously (Monties and Lapierre 1980; Lapierre and Monties 1981; 1982; Lapierre *et al.* 1982; 1983; 1984*b*).

Table 9.1

Extraction yields of three lignin fractions isolated from poplar wood by combination of ball milling and cellulase hydrolysis (yields calculated as per cent of extractive free residue (RP) or of Klasson lignin (KL); other abbreviations in text)

Fractions	LM	LE	LR
%RP	2.93 ± 0.1	7.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2
%KL	16.3 ± 0.7	43.0 ± 2.9	26.8 ± 1.9

Table 9.1 shows the yields of the three fractions obtained during two fractionations run in parallel. Reproducible and nearly quantitative yields were obtained; using reaction wood from the same sample exactly the same type of results were also obtained (Lapierre and Monties 1982).

Table 9.2 shows the variations in monomeric compositions of the three fractions; again in the case of reaction wood lignin fractions exactly the same type of results were obtained.

In every case, the LE fraction was found to be richer in syringyl units than the corresponding LM or LR fractions isolated before or after LE respectively. These differences which were confirmed using other poplar samples (Lapierre, unpublished) were taken as indicative of an inhomogeneity of monomeric composition in poplar lignins.

Using photosynthetically ^{13}C-labelled poplar lignins, we were able to confirm by ^{13}C NMR analysis the results of Table 9.2 (Monties *et al.* 1982; Lapierre *et al.* 1984*a*).

Table 9.3 shows the very good agreement between ^{13}C NMR estimation and nitro-benzene oxydation analysis. It is noteworthy that even using 'non quantitative' conditions, as described by Robert and Gagnaire (1981), a very good agreement was found reproducibly between the two methods. Thus the reservations, expressed by Obst and Ralph (1983) concerning the conditions necessary for quantitative analysis of lignin ^{13}C NMR spectra, may be unwarranted.

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1.
401/529

Table 9.2

Monomeric composition of three lignin fractions isolated from poplar wood results corresponding to the fractions described in Table 9.1 (two fractionations in parallel). Very similar results were obtained in each case during analysis of corresponding reaction wood of poplar

	LM	LE	LR
Nitrobenzene			
S/V	1.43 ± 0.3	1.97 ± 0.03	1.70 ± 0.04
% (S + V)	24.2 ± 0.5	28.4 ± 0.5	26.0 ± 0.6
Acidolyses*			
S/G	0.83 ± 0.02	1.10 ± 0.05	1.00 ± 0.02
% (S + G)	13.0 ± 0.6	13.9 ± 0.8	
Infrared			
$\% \frac{A(S) \text{ at } 1328\ cm^{-1}}{A(G) \text{ at } 1270\ cm^{-1}}$	45 ± 1	55 ± 1	
Proton**			
$\% \frac{HAr.(S)}{HAr.(G)}$	1	1.2	

*Percent of KL weight calculated for the 8 major Hibbert Ketone expressed is equivalent of 2-hydroxy-1-gaiacone (Lapierre *et al.* 1983).

**Surface ratio of the signal for aromatic syringyl (6.4 to 6.8 ppm) and guaiacyl one (6.8 to 7.28 ppm).

Following a proposal by J. Obst, the methoxyl content of some poplar lignin fractions was analyzed at the Forest Products Laboratory (Obst *et al.* 1984). Table 9.4 shows that, in concordance with the acidolysis data from Table 9.2, LE fractions were always richer in methoxyl groups and thus in syringyl units, than corresponding LM fractions. The difference in methoxyl

Table 9.3

Relative content in 'uncondensed' syringyl to guaiacyl units in poplar lignin fractions estimated by ^{13}C NMR integration data and nitrobenzene degradation*

Procedure	Ratio*	LM	LE
^{13}C NMR integration	$\frac{C_2 - C_6(S)}{C_2(G) \text{ and } C_6(G)}$	1.30	1.65
(^{13}C-enriched lignins)		1.25	1.70
Molar ratio	$\frac{\text{Syringaldehyde}}{\text{Vanillin}}$	1.36	1.79
(non-enriched lignins)		1.35[t]	1.80[t]
		1.43[o]	1.97[o]

*Nomenclature according to F[illegible] 'uncondensed units' are defined as unsubstituted at the 5- or 6-position.

[t,o]: Tension and Opposite (normal wood) from Tables 9.1 and 9.2.

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1
402/529

Table 9.4

Methoxyl content of the lignin fractions of poplar wood (preparations corresponding to Tables 9.1 to 9.3)

Lignin fraction	Ash	Total sugar	Methoxyl	
			Average	Corrected*
Opposite wood				
LM	0.83	11.87	16.51	18.91
LE	2.9	9.56	17.16	19.60
Tension wood				
LM	1.85	9.91	15.59	17.67
LE	3.71	9.73	16.49	19.05

*From sugar and ash.

after correction for ash and carbohydrate content, is in agreement with the value which can be predicted from acidolysis values. However, the small difference observed is approaching limits of reliability of the analytical methods (Obst *et al.* 1984). These results though cannot be affected by variations of content in H units: both nitrobenzene oxydation and $KMnO_4$-H_2O_2 oxydation failed to give products corresponding to an H monomer and, furthermore, the *p*-OH benzoic acid content was of the same order in every samples of each fractions.

Using another type of lignin fractionation technique, Kesraoui (1983) has reported very similar variations in the monomeric composition of other poplar lignin fractions. The results are summarized in Table 9.5. MWL and

Table 9.5

Monomeric composition of MWL and LCC fraction of poplar wood (MWL and LCC isolated from non-exploded wood; E.MWL and E.LCC isolated from wood exploded at 228 °C during 25 s at 40 bar; other abbreviations as in Table 9.2)

Lignin fraction	Nitrobenzene	Acidolysis*		
	S/V	S/G	total G	total S + G
MWL	2.4	1.2	9.0	19.9
E.MWL	3.2	2.6	3.6	12.8
LCC	3.3	1.9	2.9	8.5
E.LCC	4.0	3.0	2.1	8.2

*According to procedure of Lapierre *et al.* (1983).

lignin carbohydrate complexes (LCC) were isolated according to Bjorkman (1956, 1957) and homologous samples, E.MWL and E.LCC, were isolated from exploded wood according to Marchesault *et al.* (1980). The similar variation in the relative proportions of G and S monomers in the two series of samples clearly confirms the occurrence of a monomeric inhomogeneity in poplar lignin.

VARIATION IN THE TYPE OF LINKAGE INVOLVING PHENOLIC ACIDS

Ester-linked phenolic acids were first identified in lignin preparations in 1955 when Smith demonstrated the existence of *p*-hydroxybenzoate and *p*-hydroxycinnamate alkali labile groups in lignin from poplar wood and wheat straw. The occurrence of *p*-coumaric (PC) and ferulic (FE) acids in many monocotyledenous and in some dicotyledonous plants has been confirmed; *p*-hydroxybenzoic (PB) and vanillic (VA) acids are virtually restricted to the Salicacae.

A previous publication (Monties, 1980*b*) has reported that, in lignin preparations, PC and PB are mainly linked to the lignin fraction whereas FE and VA are associated with the readily hydrolyzable fraction which is very likely polysaccharide. These results, summarized in Table 9.6, indicated a relatively

Table 9.6

Distribution of phenolic acids between soluble, 'polysaccharidic', and insoluble, 'lignin', fractions prepared by hydrolysis of lignin preparations from poplar and wheat

	Wheat		Poplar	
Fraction	PC	FE	PB	VA
Solubilized (polysaccharides)	17	95	61	98
non-solubilized (lignin)	83	5	39	2
Total content	5.9	0.7	1.64	1.06

Hydrolysis of wheat and poplar preparations was by commercial cellulase and hydrochloric acid respectively; the lignin preparation was isolated after dry milling in a rotating mill (10 d, 450 r.min).

Total content, in mg/100 mg of lignin preparations; fractions, in percent of the total.

specific esterification of cell wall macromolecules and suggested a possible grafting between lignin and polysaccharidic polymers. A possible grafting unit in a hypothetical network may be a polysaccharide-bond phenolic ester

404/520

linked by an ether bond with lignin, according to the classical quinone-methide condensation reaction (Freudenberg and Neish 1968). Combining two exhaustive hydrolysis of esters with one acidolysis to break ether linkages, it was possible to demonstrate the occurrence of two types of linkage involving phenolic acids within the lignin preparation.

Table 9.7

Fractionation of phenolic acids from wheat and poplar lignins by combination of alkaline hydrolysis and acidolysis

Lignin fractions	Wheat				Poplar	
	PC		FE		PB	
	Esters	Ethers	Esters	Ethers	Esters	Ethers
LM	23.7 ± 1.4 (2.3 ± 0.1)	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 (0.2 ± 0.1)	1.2 ± 0.1	23.1 ± 1.1 (0.5 ± 0.1)	3.6 ± 0.1
LE	22.3 ± 0.9 (4.1 ± 1.3)	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2 (0.2 ± 0.1)	4.3 ± 0.6	24.0 ± 1.8 (1.2 ± 0.1)	3.9 ± 0.1
LA	2.0 ± 0.1 (0.9 ± 0.1)	3.4 ± 0.1	1.6 ± 0.4 (0.7 ± 0.1)	11.3 ± 0.9		

LM and LE fractions obtained from wheat by the same procedure used for poplar (Table 9.1), alkali soluble lignin (LA) was solubilized with sodium hydroxide (2N NaOH, 35 °C, 1 h under nitrogen) and purified by precipitations after acidification. Other abbreviations in text; content in percent of extractive free wood or straw. In bracket: yield of the second alkaline hydrolysis of esters (control) done before the acidolysis of ethers.

Table 9.7 summarizes the relative content of ester and ether groups in wheat and poplar lignins. In the case of wheat, these results were readily confirmed using ^{13}C-NMR spectroscopy, by following the disappearance of ester and ether signals during the fractionation and also after synthesis of PC esters and ethers by condensation with methylene quinone (Scalbert 1984; Scalbert and Monties 1985). At the same time as confirming the macromolecular heterogeneity of lignins, these results may be taken as evidence for a branching function of phenolic acids in lignin fraction networks.

VARIABILITY BASED ON FRACTIONATION AND ANALYTICAL PROCEDURE

Since the lignin network has to be broken before characterization, conclusions concerning lignin inhomogeneity may be dependent upon the type of fractionation procedure. The progressive increase in the ratio of syringyl to guaiacyl units in five birch lignin fractions isolated after increasing milling

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1
405/529

time, reported by Lee *et al.* (1981), clearly supports this hypothesis and confirms the general monomeric inhomogeneity of lignin. Nevertheless, the similar syringyl to guaiacyl ratios found in the LM and LE fractions (Table 9.2) which were isolated according to a modified Bjorkman procedure (without solvent during grinding: dry grinding) as well as of the MWL and LCC fractions (Table 9.5) isolated according to the standard Bjorkman procedure suggest that the fractionation procedure is of less importance. We chose to use dry grinding because of the consistently higher yields of extraction we observed under these conditions as shown in Table 9.8 (Monties and Bayet

Table 9.8

Yield of isolation of 'MWL'- and 'LCC'-type lignin fractions isolated under different grinding conditions from wheat straw and poplar wood

Lignin fractions % CW	HR	SR	V	T
Poplar MWL	5.6	2.4	1.5	0.6
Poplar LCC	12.2	8.3	6.7	0.2
Wheat MWL	16.5	3.7	2.8	<0.1
Wheat LCC	12.2	1.7	2.3	0.1

Cell wall (CW) were ground without solvent in a vibratory mill VIBRATOM (V) or with ordinary rotating mills at low- (30 r.min:SR) or at high-speed (400 r.min:HR). 'MWL' and 'LCC' were extracted with dioxane–water mixture respectively 9-1 and 1-1 (V/V). T: control without grinding.

unpublished; Monties 1980*b*). Similar observations have been reported by Salud and Faix (1980). However, Fiserova and Suty (1980) did not observe similar differences in syringyl to guaiacyl ratios between MWL and LCC-type lignin fractions from birch wood. A careful control of the preparation procedure appears essential for studies on lignin inhomogeneity; obviously, similar caution is necessary for interpretation of the characterization data.

For example, Klason lignin, used classically for standard determination of lignin (Effland 1977), is not a correct reference for studies on monomeric inhomogeneity, as syringyl rich acid-soluble lignins are lost during the isolation of the acid insoluble fraction (Musha and Goring 1974). The same objection applies to mild acid prehydrolysis often used to improve the purity of the Klason lignin from annual plants (Monties 1984).

Likewise, improvement in the specificity and in the degradation yields may also be critical for structural elucidation. For example, the resolution of the acidolysis method of Lundquist (1976) has been improved initially by using capillary gas chromatography to confirm the inhomogeneity of the LM and LE lignin fractions from poplar as shown in Table 9.2. Then, in order to increase the degradation yields, the reagent itself was modified (Lapierre *et al.* 1984*b*). By using ethanethiol and BF_3 instead of water and HCl, the degra-

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 6
406/529

dation yields of β-aryl ether model dimers (Fig. 9.1) was increased from 32 to 57% in the case of a homo-syringyl dimer but only from 69 to 70% in the case of the corresponding homo-guaiacyl dimer. As a specific and unexpected increase of yield was observed with the syringyl model, a correction factor was introduced in order to improve the evaluation of the inhomogeneity of the LM and LE lignins from poplar. Table 9.9 shows the dramatic increases

Table 9.9

Inhomogeneity of LM and LE fractions of poplar lignins as shown by analysis of 'non condensed' guaiacyl and syringyl-β-aryl-ether linked monomeric units

Sample	LM		LE	
Methods	Acidol.	Thioacidol.	Acidol.	Thioacidol.
S/G	0.65	0.97	1.09	1.75
P. rough	8.8	17.6	12.4	28.8
P. corrected	18.6	27.9	28.9	47.3

Acidolysis and thioacidolysis carried out on samples described in Tables 9.1 to 9.3. P is the index of frequency of the non-condensed structures, expressed as a percentage of recovered units for 100 phenylpropane units before (P. rough) or after (P. corrected) correction reported in text; other abbreviations: Table 9.2.

of yields and S/G ratio obtained using thioacidolysis. Thus, the monomeric inhomogeneity of poplar lignin fractions seems to be clearly confirmed, even if the absolute value calculated after correction may be disputable. The reactivity of the β-aryl-ether linkage, for example, may not be the same in dimers as in lignin fractions. Furthermore, each of these lignin fractions may be a mixture of polymers and thus may contain subfractions of different monomeric composition. The questions remain open and fractionation studies are currently in progress.

Summary and Conclusions

On the basis of the results obtained, one can summarize by stating there is strong evidence for macromolecular inhomogeneity of lignin preparations at the level of monomeric composition with respect to guaiacyl and syringyl units in poplar, and at the level of the type of linkage involving the phenolic acids in wheat and in poplar. However, as the choices of methods for the preparation and characterization is critical for a detailed description of this inhomogeneity, care must be exercised in interpreting the results.

LES POLYMÈRES VÉGÉTAUX Vol. 2 - part 1

In this respect, it may be interesting to consider the other levels of lignin heterogeneity previously discussed. When considering a possible monomeric inhomogeneity of lignins at the cytochemical level, it is tempting to assume

407/529

that the syringyl type lignin arises mainly from the secondary cell wall, which from UV microscopy data appears richer in syringyl units. This interpretation is often accepted but it does not necessarily imply that the guaiacyl type lignin arises mainly from the primary wall. Comparisons of the monomeric composition of MWL and of total lignin has led Adler (1977) to suggest that MWL lignin should arise in a large proportion from the secondary wall. The same conclusion was reached by Whiting and Goring (1981) from studies on the kinetics of solubilization of MWL from cell wall fractions.

If these assertions are true, it seems possible to accept that guaiacyl and syringyl type lignins originate together from the secondary wall, in the case of angiosperms. This hypothesis is consistent with the non-random model of Brauns discussed previously but without any possibility of distinguishing between two independent polymers (type I and II) or between an easily broken, block or graft, copolymer (type III). The small difference in monomeric composition between MWL fractions and total lignin as discussed by Adler (1977), or between LM, LR and LE as reported here, may be indicative of a pronounced random character of the preparations suggested by Obst (1982).

According to this scheme, the random character of some lignin fractions may also result from the grinding before extraction. In this respect, one can recall the discussion of Hon (1983), which concluded that due to mechanical stress, the lignin polymer appears to suffer more severe degradation than the polysaccharides, without any significant possibility of recombination. The results of Lange *et al.* (1983) also seem to confirm this scheme. Using only organic solvents for the isolation and purification of five fractions of birch lignin, these authors described a parallel increase in the ratio of the syringyl to the guaiacyl monomers and in the mean molecular weight of the fractions.

Combining these different hypothesis and results with the model of Gravitis and Erins, Fig. 9.3 V, it is possible to propose that lignin in the secondary cell wall of angiosperms, occurs as an easily to broken and heterogeneous network in which microgel particles are mainly of the guaiacyl type, and threadlike fragments between the particles are largely of the syringyl type. In the case of poplar and wheat, this lignin network could be grafted to the polysaccharidic polymers of the wall by way of phenolic acid bridges.

The model proposed here combines many more theoretical concepts and hypothesis than quantitative experimental data and is thus subject to qualification. Therefore, although the macromolecular inhomogeneity of angiosperm lignin now seems well established, detailed analyses of this phenomenon are required to ascertain the value of the proposed model.

Acknowledgements

Thanks are due to Marilyn Effland, J. Obst, M. Wezolowski and L. Zank (USDA Forest Products Lab., Madison, USA) for the analysis reported in

LEG POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1
408/529

Table 9.4 and for comments on lignin heterogeneity (J.O.). Linguistic revision of this manuscript by Buswell (INRA visiting scientist from Paisley College, Scotland) is gratefully acknowledged.

References

Adler, E. (1977). Lignin chemistry: past, present, future. *Wood Sci. Technol.*, **11**, 169.

Allan, G. G., Bullock, G., and Neogi, A. N. (1973). Fiber surface modification. XIV. Synthetic analogs of wood. *J. Polym. Sci.*, **11**, 1759.

Bjorkman, A. (1956). Studies on finely divided wood. I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidn.*, **59**, 477–485.

Bjorkman, A. (1957). Studies on finely divided wood. V. The effect of milling. *Svensk Papperstidn.*, **60**, 329.

Bolker, H. T., Brenner, H. S. (1970). Polymer structure of spruce lignin. *Science*, **170**, 173.

Boudet, A., Grand, C., Ranjeva, R., Alibert, G., and Marigo, G. (1981). Controlled variations in the concentration and composition of lignins. *ISWPC Ekman Days*, **3**, 55.

Bovey, F. A. and Winslow, F. H. (1979). *Macromolecules: an introduction to polymer sciences*. Acad. Press, New York.

Brauns, F. E. (1952). *The chemistry of lignin*, pp. 280–281. Acad. Press, New York.

Chang, H. M., Cowling, E. B., Brown, W., Adler, E., and Miksche, G. (1975). Comparative studies on cellulolytic enzyme lignin and milled wood lignin of sweetgum and spruce. *Holzforschung*, **29**, 153.

Chen, C. L., Tai, D., Terazawa, M., Chang, H. M., and Kirk, T. K. (1983). Chemistry of birch lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *ISWPC*, **3**, 13.

Creighton, R. H. J., Gibbs, R. D., and Hibbert, H. (1944). Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant material and application to taxonomic classification. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 32.

Effland, M. J. (1977). Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi*, **60**, 143.

Erins, P., Cinite, V., Jakobsons, M., and Gravitis, J. (1976). Wood as a multicomponent, cross-linked polymer system. *Appl. Polym. Symp.*, **28**, 1117.

Faix, O. and Besold, G. (1978). Herstellung und Characterizung von Dehydropolymerisaten von *p*-HydroxyZimtalkolen (DHP's) unter besonderer Berucksichtigung von reinen 4-Hydroxy-Phenyl-(H), Guajacyl-(G) und Syringyl-(S)-propan Polymerisaten. *Holzforschg.*, **32**, 1.

Fengel, D. and Wegener, G. (1984). In *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. p. 148. de Gruyter, Berlin.

Fiserova, M. and Suty, L. (1980). Comparative studies on milled wood lignins and cellulolytic enzyme lignin of beech wood (*Fagus sylvatica L.*) *Cell. Chem. Technol.*, **14**, 243.

Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer chemistry*. Cornell Univ. Press, Ithaca.

Freudenberg, K. and Nelsh, A. C. (1968). *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, pp. 78–122. Springer Verlag, Berlin.

Fujita, M., Saiki, H., and Harada, H. (1981). The secondary wall formation of compression wood tracheids. II. *Mokuzai Gakkaishi*, **24**, 158.

Fujita, M., Takabe, T., and Harada, H. (1983). Deposition of cellulose, hemicellulose and lignin in the differentiating tracheids. *ISWPC*, **1**, 14.

Funke, W. (1968). Synthese und Bildungmechanismen vernetzter Polymerer. *Chimia*, **22**, 111.

Gibbons, R. A. (1963). Polydispersity. *Nature*, **200**, 665.

Glasser, W. and Glasser, H. (1974). Simulation of reactions with lignin by computer (SIMREL). I. Polymerisation of coniferyl alcohol monomers. *Macromolecules*, **7**, 17.

Glasser, W. (1980). Lignin in *Pulp and Paper* (3rd edn), ed. J. P. Casey, vol. 1, p. 39. John Wiley and Sons.

Glasser, W. and Glasser, H. (1981). The evaluation of lignin's chemical structure by experimental and computer simulation techniques. *Paper* Puu, **63**, 71.

Goring, D. A. I. (1962). The physical chemistry of lignin. *Pure Applied Chem.*, **5**, 233.

Goring, D. A. I. (1983). Some recent topics in wood and pulping chemistry. *ISWPC*, **1**, 3.

Goring, D. A. I., Vuong, R., Gancet, C., and Chanzy, H. (1979). The flatness of lignosulfonate macromolecules as demonstrated by electron microscopy. *J. Applied Polym. Sci.*, **24**, 931.

Gravitis, J., Erins, P., and Cinite, V. (1971). Etude de la formation et de la structure de la lignine d'après les lois communes aux polymères réticulés. *Khim. Drevsn.* (2), 19 (translated from Russian).

Gravitis, J. and Erins, P. (1983). Topological and conformational structure and macroscopic behaviour of lignin. *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.*, **37**, 421.

Hardell, H. L., Leary, G. J., Stol, M., and Westermark, U. (1980). Variations in lignin structure in defined morphological parts of birch. *Svensk Papperstidn.*, **83**, 71.

Higuchi, T. (1980). Biochemistry of lignification. *Wood Res.*, **66**, 1.

Higuchi, T. (1981). Biosynthesis of lignin in *Encyclop. Plant Physiol. New Series* (ed. W. Tanner and F. A. Loewus), vol. 13B, pp. 194–224.

Hon, D. N. S. (1983). Mechanochemical reactions of lignocellulosic material. *J. Appl. Polym. Sci.*, Appld. Polym. Symp., **37**, 461.

Karmanov, A. P., Bogomolov, B. D. and Davydoy, V. D. (1980). Propriétés physiques des polymères en block (bulk) et en ligne (endwise). *Khim. Drevsn.* (3), 112 (translated from Russian).

Karmanov, A. P., Davydov, V. D., and Bogomolov, B. D. (1982). Etat actuel du problème de l'hétérogénéité de la lignine naturelle. *Khim. Drevsn.* (2), 3 (translated from Russian).

Kesraoui, R. (1983). Aspects chimiques et biochimiques des liaisons lignine-hydrates de carbone. *Thèse de 3ème cycle*, U.S.M. Grenoble.

Lai, Y. Z. and Sarkanen, K. V. (1975). Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cell. Chem. Technol.*, **9**, 239.

Lange, W., Faix, O., and Beinhoff, O. (1983). Uber Eigenschaften und Abbaubarkeit von mit Alkohol Wasser-Gemischen isolierten Ligninen. *Holzforschung*, **37**, 63.

Lapierre, C. and Monties, B. (1981). ^{13}C photosynthetically labelled poplar lignins: preparation and ^{13}C NMR characterization. *ISWPC Ekman Days*, **5**, 35.

Lapierre, C. and Monties, B. (1982). Etude de la lignine des bois de réaction du Peuplier. *Colloque Sci. Ind. Bois* **1**, 135, pub. DGRST Paris.

Lapierre, C., Lallemand, J. Y. and Monties, B. (1982). Evidence of poplar lignin

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 part 1
410/529

heterogeneity by combination of ^{13}C and ^{1}H NMR spectroscopy. *Holzforschung*, **36**, 275.

Lapierre, C., Rolando, C., and Monties, B. (1983). Characterization of poplar lignins by acidolysis products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung*, **37**, 189.

Lapierre, C., Monties, B., Guittet, B., and Lallemand, J. Y. (1984*a*). ^{13}C photosynthetically labelled poplar lignins: ^{13}C NMR experiments. *Holzforschung*, **38**, 333.

Lapierre, C., Monties, B., and Rolando, C. (1984*b*). Structure des lignines: evaluation de liaisons arylglycérol-aryléthers par thioacidolyse. *C.R. Acad. Sci.*, 299, III, 441.

Lee, Z. Z., Meshitsuka, G., Cho, N. S., and Nakano, J. (1981). Characteristics of milled wood lignins isolated with different milling-times. *Mokuzai Gakkaishi*, **27**, 671.

Lundquist, K. (1976). Low-molecular weight acidolysis products. *Appl. Polym. Symp.*, **29**, 1393.

Manson, J. A. and Sperling, L. H. (1977). *Polymer Blends and Composites*. Plenum Press, New York.

Marchesault, R. H., Coulombe, S., Hanai, T., and Morikawa, M. (1980). Monomers and oligomers from wood. *Pulp Paper Mag. Can. Trans.*, **6**, TR 62.

Mayo, F. R. and Walling, C. (1950). Copolymerization. *Chem. Rev.*, **46**, 191.

Miki, K., Sasaya, T., and Sakakibara, A. (1980). Lignans from heartwood of Larix leptolepsis Gord. *Mokuzai Gakkaishi*, **26**, 633. See also Sakakibara *et al.* 'Lignans, Braun's lignin and cell wall lignin (1981), *ISWPC Ekman days*, **1**, 73.

Monties, B. (1980*a*). Les lignines, in *les Polymères végétaux: polymères pariétaux et alimentaires non azotés* (ed. Monties), pp. 122–155. Gauthier-Villars, Pub. Paris.

Monties, B. (1980*b*). Biosynthèse et biodégradation de la lignine chez le Blé et le Peuplier. *Rapport Fin Contrat DGRST: MBO* (ed. B. Monties). INRA, 200 p., Paris.

Monties, B. (1984). Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie*, **4**, 387–392.

Monties, B. and Lapierre, C. (1980). Evidence of heterogeneity of lignin fractions isolated from Poplar wood. (Euchem Symp. Abst.) *Kemia Kemi*, (*9*), 490.

Monties, B. and Lapierre, C. (1981). Données récentes sur l'hétérogénéité des lignines. *Physiol. Vég.*, **19**, 327.

Monties, B., Lapierre, C., Gaudillere, J. P., Vilhorgne, M., and Lallemand, J. Y. (1982). Analyse de lignines de Peuplier par spectrométrie de résonance magnétique du carbone et du proton. *Bull. Liaison Groupe Polyphénols*, **11**, 388.

Morohoshi, N. and Sakakibara, A. (1971). On the distribution of condensed type in lignin: comparison of the lignin fractions of hydrogenolysis products in MWL, LCC and wood residue. *Mokuzai Gakkaishi*, **17**, 354.

Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1974). Klason and acid-soluble lignin content of hardwoods. *Wood Science*, **7**, 133–134.

Musha, Y. and Goring, D. A. I. (1975). Distribution of syringyl and guaiacyl moities in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science Tech.*, **9**, 45–58.

Nimz, H. (1974). Das Lignin der Buche—Entwurf eines Konstitutionschema. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **13**, 313.

Nokihara, E., Tuitle, M. J., Felicetta, F. V., and McCarthy, J. L. (1957). Lignin. VIII.

Molecular weight of lignin sulfonates during delignification by bisulfite-sulfurous acid solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4495.

Obst, J. R. (1982). Guaiacyl and syringyl lignin composition in hardwood cell components. *Holzforschung*, **36**, 143.

Obst, J. R. and Ralph, J. (1983). Characterization of hardwood lignin: investigation of syringyl/guaiacyl composition by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Holzforschung*, **37**, 297.

Obst, J., Effland, M., Wesolowski, M., and Zank, L. (1984). Personal communication.

Robert, D. and Gagnaire, D. (1981). Quantitative analysis of lignin by ^{13}C NMR. *ISWPC Ekman Days*, **1**, 86.

Rodriguez, F. (1970). *Principles of polymer systems*. McGraw-Hill Book Comp., New York.

Saka, S., Hosoya, S., and Goring, D. A. I. (1983). The distribution of lignin in hardwoods as determined by bromination with TEM-EDXA. *ISWPC*, **1**, 24.

Sakakibara, A. (1977). Degradation of protolignin and the structure of lignin. *Rec. Adv. Phytochem.*, **11**, 117–139.

Sakakibara, A. (1980). A structural model of softwood lignin. *Wood Sci. Technol.*, **14**, 89.

Sakakibara, A., Miki, K., and Takahashi, H. (1981). Lignans, Braun's lignin and cell wall lignin. *ISWPC Ekman Days*, **1**, 73.

Salud, E. C. and Faix, O. (1980). The isolation and characterization of lignins of *Shorea* species. *Holzforschung*, **34**, 113.

Sarkanen, K. (1971). Precursors and their polymerisation. In *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*, pp. 95–163. Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971). (loc. cit.).

Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971). *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York.

Scalbert, A. (1984). Caracterisation des lignines de paille de Blé: fractionnements, associations avec les oses et les acides phénoliques—*These Docteur Ingenieur*—(*INAPG*)—INRA edit 68p.

Scalbert, A. and Monties, B. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, **24**, 1359.

Schweers, W. and Faix, O. (1973). Vergleichende Untersüchungen an Polymermodellen des Lignins (DHP's) verschiedener Zusammensetzungen: I Mittl (with 7 following papers in the same journal). *Holzforschung*, **27**, 208.

Smith, D. C. C. (1985*a*). Ester groups in lignin. *Nature*, **176**, 267–268.

Smith, D. C. C. (1955*b*). *p*-hydroxybenzoate groups in lignin of aspen (*Populus tremula*). *J. Chem. Soc.*, 2347.

Szabo, A. and Goring, D. A. I. (1968). Degradation of a polymer gel: application to delignification of sprucewood. *Tappi*, **51**, 440.

Terashima, Y., Okada, M. and Tomimura, Y. (1979). Heterogeneity in formation of lignin. I. Heterogeneous incorporation of *p*-hydroxybenzoïc acid into poplar lignin. *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 422.

Wardrop, A. B. (1976). Lignification of plant cell wall. *Applied Polym. Symp.* **28**, 1041.

Whiting, P. and Goring, D. A. I. (1981). The morphological origin of milled wood lignin. *Svensk Papperstidn.*, **84**, R120.

Yamazaki, T., Hata, K., and Higuchi, T. (1978*a*). Separation of s-DHP from a mixture of c- and s-DHP's with special reference to the isolation of syringyl lignin. *Holzforschung*, **32**, 20.

Yamazaki, T., Hata, K., and Higuchi, T. (1978*b*). Isolation and characterization of syringyl component rich lignin. *Holzforschung*, **32**, 44.

Yan, J. R. (1981. Molecular theory of delignification. *Macromolecules*, **14**, 1438.

Yan, J. F., and Johson, D. C. (1981). Delignification and degelation: analogy with chemical kinetics. *J. Applied Polym. Sci.*, **26**, 1623.

Architecture moleculaire (macro supra (fractal) Maison (revus) ici formalisme (meca?)

Animal Feed Science and Technology, 32 (1991) 159–175
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

clic here for the next

Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function

Bernard Monties
Laboratoire de Chimie Biologique (INRA), Institut National Agronomique (CBAI), Centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon (France)

ABSTRACT

Monties, B., 1991. Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 32: 159–175.

Cell wall might be considered as a composite material, made of fibre (cellulose), a matrix (lignin, hemicellulose) and fillers (water, simple organics, tannins). Its properties depend both on plant anatomy (heterogeneity and anisotropy of organs, tissues, cells and cell wall layers) and on the structure of the macromolecules, their orientational order, their associations and the resulting supramolecular structures as particularly discussed in the case of lignin networks.

From selected examples, it is shown that natural or artificial lignocellulosic compounds such as woods, straws or reconstituted woods (fibre and particle boards) can be described as composite materials. Their most typical physico-chemico-mechanical properties are: shrinkage and water swelling behaviour, collapse in relation to extractive and tannin content, improvement of dimensional and biological stability by chemical modifications, anisotropic properties of orientated strand boards and fibre-reinforced polyester-based composites, and lastly, biological properties (digestibility, extensibility).

As for synthetic composite materials, such an approach is a prerequisite for industrial production of competitive lignocellulosic products.

INTRODUCTION

Tailor-made composites with high chemico-mechanical properties have been extensively developed during the past decades (Clark and Fleming, 1986). Advances were made following greater understanding of the relationship between the inner architecture and the external properties of material (Cornsweet, 1970; Liedl, 1986). For example, Rodriguez (1970), Manson and Sperling (1976) and Bear (1986) illustrated some of the macromolecular and supramolecular bases of these relations. At the macromolecular level, the most relevant factors are chain design, including size (average length), shape (composition, regularity or tacticity), combinations of polymer chains in three-dimensional lattices where the polymer chains remain either chemically distinct but physically entangled or covalently bonded in infinite net-

0377-8401/91/$03.50 © 1991 — Elsevier Science Publishers B.V.

works. At the supramolecular level, characterized by the presence of differentiated structures such as membranes, layers, skin and fibres or bundles of fibres, relevant factors have been less clearly identified.

Ironically, it has been suggested that biological structures should be examined to find new, advantageous, supramolecular ways to arrange synthetic composites. Natural biological composites such as the tendon, display similar levels of organization (Hiltner et al., 1985) and wood can be compared with injection-moulded liquid-crystalline polymers (Bear, 1986).

Unfortunately, molecular approaches to the structure of wood and of other lignocellulosic products are relatively recent (Goldstein, 1981). The present paper reviews some lignocellulosic products as composites with emphasis on supramolecular and mainly macromolecular properties. Self-assembling phenomena in the hierarchical organization of biological macromolecules discussed elsewhere (Atlan, 1974; Hills et al., 1975; Colvin, 1983; Vian et al., 1986) are also important in composites (Bear, 1986). Possible self-organization properties in lignin networks have also been discussed (Monties, 1989). Comments on the ultrastructural properties of lignin networks (see Section Molecular architecture of the cell wall: the case of lignins), can be viewed as the second part of a series of papers on the relations between the structure and biological function of lignins in plant cell walls.

COMPOSITES AS HETEROGENEOUS AND ANISOTROPIC MATERIALS

Composites can broadly be defined as assemblies of two or three types of components: (1) a reinforcement, such as fibres or particles, embedded in (2) a matrix or binder material which mainly transfers loads between the reinforcing components, and (3) additives or fillers which provide "speciality" properties.

Synergism between fibre and matrix increases both the stiffness (stress needed to cause a given deformation) and toughness (total strain or stress necessary to cause breakage which determines the energy absorbed at failure (Rodriguez, 1970).

Macroscopic mechanisms involved in this synergism have been thoroughly discussed by Cornsweet (1970), Rodriguez (1970), Manson and Sperling (1976) and Choo et al. (1986).

As fibres or bundles of fibres form the reinforcement in synthetic composites as in natural lignocellulose, the mechanical properties of the products are determined not only by composition but also by the internal order or inner architecture of the material. Unlike homogeneous materials, which have uniform mechanical properties in each direction (isotropy), composites can be inhomogeneous or anisotropic depending on the structure, amount and orientation of both reinforcing fibres and matrix and filler materials. With stiff fibres aligned unidirectionally, longitudinal stiffness is greater than transversal stiffness because fibres and matrix act in parallel in the longitudinal direction and the stiffer element dominates the overall response. Conversely,

transverse stiffness is dominated by the mechanical properties of the matrix, as matrix and fibres work in series, the less stiff component thus dominating the overall response of the composite.

Theoretical formulations, not reviewed here, have been developed in which predictions of average properties agree quite well with experimental data in the longitudinal direction (Nielsen, 1962; Manson and Sperling, 1976).

Anisotropy of mechanical properties of lignocellulosic compounds and wood was recognized and characterized long before the development of advanced synthetic composites. The anisotropic properties of wood have been related tentatively, not only to the gross anatomy of organs and tissues, but also to the structure and composition of the plant cell wall layers at the subcellular level. Critical views on these questions can be found in the reference books of Stamm (1965), Mark (1967), Preston (1974) and Rowell (1984) and in the reviews of Northcote (1972), Roland (1981) and Mudry (1984) on the ultrastructure and the chemistry of the plant cell wall as a composite.

THE PLANT CELL WALL AS LIGNOCELLULOSIC COMPOSITE

Highly evolved plants are characterized by a complex lignocellulosic cell wall whose chemical composition, physical structure and biological functions change according to species and to the age and type of tissues (Catesson, 1980; Harada and Cote, 1985; Roland et al., 1987). Even if lignocellulosic compounds such as wood are described, from a structural point of view, as "materials that are homogeneous on the average" (Mudry, 1984), several levels of heterogeneity can be defined. In the case of woody plants, a first macroscopic level has been defined, at a scale of $\geqslant 10^{-2}$ m, in the tissues of the different organs (bark, phloem, xylem, etc.) with variations in cell wall thickness which can be observed, for example, in differentiated early and late woods. The cylindrical symmetry of stems and trunks allows the definition of three reference directions: longitudinal (L) along the cylinder axis, radial (R) in the direction of the heartwood (core marrow), and tangential (T) to the circumference of radial sections of the stem. Anisotropy of structure, and of cell wall properties previously characterized along these three directions in different tissues, has been reviewed by e.g. Mark (1967) and Guitard (1987).

The first microscopic level, at about 10^{-4} m, can be assigned to the plant cells which appear as hollow, generally perforated and porous tubes with walls created by the superposition of primary, secondary and tertiary layers from the outside to the inside of the cell. Each individual cell wall layer consists of several sublayers or lamellae in which cellulosic fibres (cellulose microfibrils) have been shown by microscopy to be arranged in alternating helices, elongated along the length of the cell in a crossed fibrillar structure. Cell wall layers and fibre bundles can thus be viewed at two other microstructural lev-

els of heterogeneity, at micrometre (10^{-6} m) and nanometre (10^{-9} m) scales, respectively.

Polysaccharides (cellulose and hemicellulose) and lignin correspond to the molecular level of heterogeneity. Until now the ligno-hemicellulosic matrix has been viewed as an amorphous structure. On the contrary, cellulose occurs partly as a crystalline microfibril, in which linear molecular chains are organized into strands (cellulose microfibrils) of elementary fibrils. Elementary fibrils are defined as cellulose strands of the smallest possible dimension, with about 40 cellulose chains (Mackay et al., 1985).

In wood cells, the orientation of the microfibrils in the successive secondary S_1-, S_2- and S_3-layers of tracheids, and perhaps other cell types, changes from a flat to a steep helix according to the microfibrillar angle (θ) to the cell axis. Microfibril angle changes not only according to the type but also to the orientation of these layers (Table 1); more complex patterns in other wall layers have been reviewed by Harada and Cote (1985). Furthermore, a progressive shift in microfibrillar angle between the layers, with intermediate orientation between S_1 and S_2 and between S_2 and S_3, has been clearly characterized by Vian et al. (1986). By combination of direct and indirect cytochemical techniques, glucuronoxylans have been shown to be preferentially concentrated in these intermediate zones in the case of lime wood. From a chemical point of view, the cell walls of woods and, most likely, of annual plants appear as particularly complex lignocellulosic composites whose cellular structure can only be described roughly as comprising cellulosic fibres, acting as reinforcing components, embedded in the successive subcellular layers in a matrix of different types of hemicelluloses and of lignins. The heterogeneity of chemical composition of hemicelluloses and lignins has been reviewed by Joseleau (1981), Kato (1981), Wilkie (1983), Monties (1985) and Fengel and Wegener (1984). Vegetable fibres, such as jute, flax, ramie, kenaf, sisal or coir (for example), are complex composites of fibres and cells glued together in a lignin hemicellulosic matrix. Table 2 (after Satyanarayana et al., 1982), illustrates the variations in size and type of cells from different types of fibres. Composition, properties and processing of natural commercial fibres were recently reviewed by Amin et al. (1986).

TABLE 1

Microfibril angle (θ, in degrees) of the secondary wall layers in the tracheids of *Cryptomeria japonica*

Wall	Early wood			Late wood		
	S_1	S_2	S_3	S_1	S_2	S_3
Radial	68	14	81	83	4	85
Tangential	64	4	85	80	3	82

Data from Harada and Cote (1985).

TABLE 2

Variation in size and number of cell types in various fibres of the coconut tree

Fibre type	Diameter (μm)	Sclerenchyma	Phloem	Xylem	Parenchyma
Rachis	350–400	278	14	6	24
Leaf sheath	1100–1600	1661	3	52	27
Petiole (bark)	250–550	461	3	23	56
Coir (fruit)	100–450	348	36	9	–

Data from Satyanarayana et al. (1982).

CHEMICO-MECHANICAL PROPERTIES OF LIGNOCELLULOSIC COMPOSITES

Some topics have been chosen to illustrate correlations between macroscopic properties and structural levels of plant cell wall composites.

Shrinking and swelling of woods

Variations in wood moisture induce anisotropic changes in the dimensions of wood pieces. Anisotropy of wood shrinkage is, according to Guitard (1987) (Table 3), comparable with the anisotropy of the elasticity modulus. Anisotropy of hygroexpansion and mechanical properties of wood have been related to the gross cell wall properties, particularly to the porosity of the ligno-hemicellulosic matrix and to the orientation of the cellulosic fibre reinforcement (Meylan, 1972). Several quantitative models have been proposed to explain these effects, see for example, Stamm (1965), Stone and Scallan (1968), Barber (1968), Boyd (1977), Skaar (1984), Archer (1987) and Bamber (1987). Low shrinkage and a high modulus in the longitudinal direction have been related to the longitudinal arrangement of cells and cellulosic fibres in normal mature wood. Higher radial shrinkage and lower modulus, usually observed in reaction wood and juvenile wood, may also be analysed on this basis. Furthermore, the excessive bowing or twisting when wood dries and abnormal

TABLE 3

Variation of hygro-expansion coefficients: shrinkage and elasticity modulus of wood according to tangential (T), radial (R) and longitudinal (L) directions

Wood	Shrinkage (%)			Elasticity modulus (N mm^2)		
	T	R	L	T	R	L
Poplar	0.44	0.14	~0.01	6.8	1.2	0.5
Spruce	0.37	0.19	~0.01	14.0	0.8	0.5

Data from Guitard (1987).

TABLE 4

Correlation (with standard deviations given in parentheses) between volumetric shrinkage and extractive content of baldcypress (*Taxodium* sp.) and tupelo (*Nyssa* sp.) woods before and after water extraction

Property	*Taxodium*		*Nyssa*	
	Before	After	Before	After
Shrinkage (%)				
Radial	2.1(1.0)	2.7(1.2)	2.8(0.9)	3.5(1.1)
Tangential	6.2(1.2)	7.9(1.7)	6.0(1.3)	7.3(1.6)
Extractive content (%)	2.3(1.9)	–	3.7(0.6)	–

Data from Choong et al. (1989).

variations of longitudinal shrinkage have been correlated with high microfibrillar angle (θ) in the thickest S_2 layer of the secondary wall. Anisotropic properties of the gross wood also change with tissue type, cell shape and cavity volume and with the mechanical stress produced during growth (Barber, 1968; Boyd, 1977). Shrinkage of wood and even collapse (abnormal shrinkage manifested by the buckling or flattening of wood cells during drying), has also been related to wood density and, mainly, extractive content. Correlations between shrinkage properties and extractive contents and types have been studied by Choong (1969), Chafe (1987) and Choong et al. (1989) in relation to hygroscopicity of wood, type of extraction and height and radial position in the trunk. Table 4 shows changes depending on the correlation between shrinkage and extractive contents, according to the type of wood. Lignocellulosic cell walls can thus be viewed as microporous composites whose dimensional properties can be influenced by the filling up of the pore by simple chemicals such as molecules of water or organic solvents (Rosen, 1978) and oligomers, such as lignins or tannins (Pizzi and Cameron, 1986). Extractives and even water, appear thus as "natural" fillers of lignocellulosic composites. In this respect, combinations of condensed and hydrolysable tannins with lignins in plant cell wall, as suggested by Haslam and Lilley (1985) and by Jouin et al. (1988), might strengthen the plant cell wall by a secondary lignification process owing to cross-linking of lignocellulosic polymers previously deposited. The use of oligomeric polyethylene glycols to stabilize waterlogged woods, can be described as an effect of an artificial filler which diffuses into the wall pores.

Chemical modifications of lignocellulosic products

Chemical treatments of lignocellulosics to modify their properties have been attempted over several decades with three main objectives: (1) dimensional stabilization; (2) protection against biological and environmental deteriora-

tion; (3) improvement of mechanical properties. More than ten such processes for the chemical modification of wood have been reviewed (Manson and Sperling, 1976; Meyer, 1985) but despite much research, no commercial applications have been made. Two examples are described here to show how lignocellulosic materials may be improved.

Wood–polymer composites, in which vinyl-type monomers are polymerized in the void spaces of solid wood are the first example (Meyer, 1977, 1985). Methyl methacrylate (MMA) was the only monomer that could be economically polymerized. After introduction into the solid wood by a vacuum batch process, the monomer was converted into a solid polymer by γ-radiation or catalysed heating, leading to a bulk polymerization in the voids of cells (lumen, intercellular voids, etc.) but not in the cell wall layers (primary, secondary or tertiary). Dramatic improvements in strength were obtained by this process (Table 5), with production of more uniform material in which coefficients of variability were decreased by 50% or more. However, as MMA polymer filled only the cellular voids, the rate of diffusion of water into the walls was only decreased. Swelling in water was similar to that in untreated wood but took 10–20 times longer, thus decreasing the commercial application of this process.

Stabilization of wood products by acetylation is the second and economically most promising example (Rowell et al., 1987), especially with the development of a simple dip procedure in acetic anhydride without cosolvent or catalyst, which shortens the reaction time and allows recovery of byproducts and re-use of chemicals (Rowell et al., 1986). By forming ester bonds, mostly with the reactive hydroxyl groups of the cell wall, acetylation (1) decreases hygroscopicity and improves dimensional stabilization and (2) causes molecular changes in the substrates, thus increasing their resistance to degradation and improving their biological stability. Acetylation occurs without polymerization, by reaction at one site. According to Rowell (1982), lignin can be completely substituted, but only 25% of hydroxyl groups were substi-

TABLE 5

Changes in strength properties, static bending and longitudinal compression assays, and corresponding variation coefficients for methylmethacrylate-treated and untreated bass wood (*Tilia* sp.)

Strength property	Change in percentage of untreated wood		Variation coefficient (%)	
			Untreated	Treated
Modulus of elasticity	25	(48)*	13.3	10.4
Modulus of rupture	78	–	15.7	5.4
Work to proportional limit	154	(90)*	25.0	11.6
Work to maximum load	77	(51)*	24.3	5.3

*Corresponding values for crushing test in longitudinal compression. Data from Meyer (1977).

TABLE 6

Dimensional stabilization (as percentages of the original dimension of oven dried board) of pine and aspen flakeboards by acetylation in the case of water swelling rate tests and cyclic water soaking test (5 days water soaking followed by 2 days oven drying at 105°C)

Acetylation degree (gain %)	Swelling rate (%)		Thickness increase (%)		Weight increase (%)	
	Pine	Aspen	Pine	Aspen	Pine	Aspen
Control	37	55	43	65	120	135
6.0	21	6	22	19	85	22
21.1	2	1	10	9	56	65

Data from Rowell et al. (1986).

tuted in polysaccharides. However, confirmation of these data by physical solid state analysis in situ seems to be required.

Acetylation offers even greater possibilities for processing lignocellulose composites reconstituted from relatively dry and small particles such as flakes, sawdust, straw or annual plant residues than for solid wood. In the case of flakeboards from hardwoods and softwoods, Rowell et al. (1986–1987) have reported strong correlations between the acetylation yields (between 0 and about 20% in weight) and the hygroscopic mechanical properties of boards as shown in Table 6.

Anisotropic properties of lignocellulosic composites

Variations in the properties of oriented strand boards and of fibre-reinforced polyester-based composites illustrate the importance of anisotropic structure of the reinforcing materials as discussed previously.

Oriented strand boards (OSB) were developed after the discovery that particle board properties could be improved by using longer particles, called flakes, more or less orientated in the load direction (Harris and Johnson, 1982). Relations between flake alignment, specific gravity, and physical and mechanical properties measured parallel and perpendicular to the alignment of the flake have been investigated thoroughly by Geimer (1981) and by Avramidis and Smith (1989). Table 7 summarizes the anisotropic properties of these reconstructed lignocellulosic composites in function of the content in phenol-formaldehyde resin forming the embedding matrix. Improved strength as the resin content is increased can be explained, as discussed previously, by the transfer of stress through the matrix as a result of the large coverage area and embedding of flakes.

At the converse of OSB, in which anisotropic properties resulted from uneven distribution of a mixture of flakes from different woods, properties of fibre-reinforced, polyester-based composites (studied by Lin, 1987) illus-

TABLE 7

Anisotropic variations of mechanical properties of oriented flake boards as a function of the orientation of flakes (mixture of *Pinus*, *Tsuga* and *Aspen* sp. flakes) and of the resin matrix content (phenol-formaldehyde at two levels as percentages of oven dry weight of flakes)

Resin content (%)	Direction	Elasticity modulus	Rupture modulus
6	Parallel	42.9	6.6
	Transverse	21.4	2.4
4	Parallel	37.7	6.1
	Transverse	17.5	1.9

Data from Avramidis and Smith (1989).

TABLE 8

Comparison of anatomical and chemical properties of some commercial non-woody fibres

	Coir fruit (*Cocos* sp.)	Jute bark (*Corchorus* sp.)	Sisal leaves (*Agave* sp.)
Length of fibre (cm)			
Cell	0.02–0.1	0.1–0.6	0.1–0.5
Bundle	~20	~180	~120
Diameter of fibre (mm)			
Cell	0.015–0.03	0.015–0.02	0.015–0.02
Bundle	0.1–0.5	–	0.05–0.2
Microfibrillar angle (°)	~40	~8	~15
Composition (%)			
Cellulose	36–43	63–71	67–78
Lignin	41–45	11–13	8–12
Hemicellulose	0.2–0.3	13–15	10–13
Extractives	~10	~2	~2
Tensile strength	Low	Very variable	High

Data from Lin (1987).

trate the effect of even distribution of pure fibres from different annual plants: coir, jute and sisal. Anatomical and chemical data from Lin (1987), (Table 8) underline clearly the dramatic differences between fibre types, even if the large differences between fibres from the same plant (Table 2) are taken into account. Randomly orientated fibre composites were formed by hot pressing fibre mats from coir, jute or sisal in commercial polyester-based, but unspecified, resins. The inherent properties of the cellulosic fibres were major factors affecting the mechanical properties of the composite, such as modulus of elasticity, modulus of rupture and ultimate tensile strength (Table 9). Furthermore, Lin (1987) showed a positive correlation between mechanical properties and both increase in cellulose content and decrease of microfibrillar angle (Table 8). When compared with the data on changes of wood dis-

TABLE 9

Effect of fibre type on properties of fibre-reinforced, polyester-based composites made by hot pressing with coir, jute and sisal

Property	Sisal	Jute	Coir
Swelling (%)	4.1	5.0	3.2
Elasticity modulus in tension (GNm^2)	5.8	7.3	4.2
Ultimate tensile strength (MNm^2)	34	44	22

Data from Lin (1987).

cussed earlier (see Section Shrinking and swelling of woods), these data underline the importance of approaching cell walls as composite at the subcellular and molecular level. Properties of other lignocellulosic composites such as papers and boards are not presented here but can be discussed likewise.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF LIGNOCELLULOSIC COMPOSITES

Studies of biodegradation and biosynthesis have demonstrated the composite nature of plant cell wall. For example, in the biodegradation of wheat cell walls by rumen microorganisms (Chesson et al., 1983) the rate and extent of hydrolysis of isolated cellulose and of wheat cellulose in situ differed. Similar differences were observed after other chemical pretreatments, and the hypothesis was put forward that the extent of biodegradation was determined not only by the chemical nature of the polysaccharides, but also by their specific environment and association with other components, especially as phenolic acids and lignins. The fine structure of plant cell wall architecture has been studied by pore size determination in combination with progressive chemical extraction of hemicelluloses, suggesting that hemicelluloses may be distributed through the three-dimensional lignin network in the inter-microfibrillar voids (Sawabe, 1980). Even if these data show the need for supramolecular studies of plant cell walls as composites, Sawabe's model requires validation. Furthermore, significant differences in digestibility in vitro have been reported between plant species, for example between grasses and legumes (Buxton, 1989; Narasimhalu et al., 1989): the occurrence of several architectural types of plant cell wall as composites thus seems very likely. In comparison with wood, Gramineae cell walls may provide an extreme type of association between the ligno-hemicellulosic matrix and phenolic acids, and possibly also with silica (Table 10).

From a biosynthetic point of view, the properties of cell walls as composites can be illustrated further by studies of elongation during plant growth. Measurements in vivo of cell wall extensibility in developing organs have been recently reinvestigated by stretching living tissue at constant stress in an extensiometer (Kutschera and Schopfer, 1986). Until now, the macromolecu-

TABLE 10

Total para-hydroxycinnamic acids and silica contents of lignin fractions isolated from stems of wheat (*Triticum* sp.) and maize (*Zea* sp.): milled wood (LM), enzyme (LE) and alkali (LA) lignin fraction isolated and characterized according to Scalbert and Monties (1986)

	Wheat			Maize		
	LM	LE	LA	LM	LE	LA
Phenolic acids[1]	2.8	3.0	1.6	3.9	3.6	0.9
Silica (wt.%)	0.6	0.3	0.5	0.2	1.0	0.3

[1]Expressed in percentage of weight of the Klason lignin content of each lignin fraction.

lar basis of these phenomena has not been identified clearly. The viscoelastic extension of living plant cell walls has been more frequently related to slippage of wall polymers and breakage of load-bearing (covalent or non-covalent) clusters of chemical bonds with possible release of soluble polymeric fractions (Cleland, 1981; Bates and Ray, 1981; Fry, 1989).

Even when interpretation of these biosynthetic and biodegradation data is impeded by lack of information on the molecular arrangement and interrelations of the cell wall components (Kato, 1981) it is clear that such interpretation requires an holistic approach of plant cell wall as lignocellulosic composite.

MOLECULAR ARCHITECTURE OF THE CELL WALL: THE CASE OF LIGNINS

According to the electron microscopic studies of Scallan (1974), the structure of the cell wall of wood, but not necessarily of lignified tissues of other plants, consists of concentric lamellae, one or possibly more cellulosic microfibrils thick, arranged in a three-dimensional, honeycomb pattern filled with a lignin–hemicellulose lamella-like matrix. In agreement with the more recent model of Favis and Goring (1984) and Johansson (1985), lignin may occur as small particles tangentially orientated and spaced in the cellulosic honeycomb as disc-shaped platelets (Scallan, 1974). It has been suggested that lignin may be deposited in the wall, between the cellulosic microfibrils, making the wall thicker and inducing growth stresses, but this is still a controversial idea (Bamber, 1987). Nevertheless, at a macromolecular level, lignin may be considered as a group of inhomogeneous, non-random networks (Monties, 1985) arranged in two- or three-dimension polymers differing according to subcellular origin, type of cell and plant species (Goring, 1989). It has long been suggested and recently shown for the differentiating xylem of hardwood and for refining mechanical pulps of softwood and hardwood (Bach-Tuyet et al., 1985), that lignins could be physically and chemically associated with

other cell wall polymers: proteins, hemicellulose and cellulose (Monties and Lapierre, 1981; Fengel and Wegener, 1984). The type of association could differ according to plant species.

With regard to lignohemicellulosic matrices as composites, many questions remain unanswered, particularly at the three levels of orientation, associations and supramolecular structure. Other related functional and methodological questions about solid wood as natural composite have been reviewed recently by Bjorkman (1988) and will not be discussed here.

Molecular orientational order of lignin in situ has been studied recently by solid state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Hatfield et al., 1987) and Raman laser microprobe spectroscopy (Agarwal and Atalla, 1986). By Raman microprobe study, the aromatic ring of lignin monomers has been found most often arranged in the plane of the cell wall surface, indicating a molecular order of lignin which may be related to the preferential orientation of cellulose fibres. However, with a microscopic volume of about 0.9 cm^3, no net molecular orientational order of lignin in cellulose has been found by solid state NMR spectroscopy (Hatfield et al., 1987).

The molecular associations of lignin in situ have also been studied recently by proton spin diffusion techniques of solid state NMR spectroscopy and confirm evidence of associations between lignin and carbohydrate polymers and also tannins (Gerasimowicz et al., 1984; Newman et al., 1989). Covalent linkages between lignin and hemicelluloses have been suggested frequently (Fengel and Wegener, 1984). However, owing to the compatibility relationship between wood cell components, non-covalent interactions are possible. According to Gravitis and Erins (1983), acetylation of hemicelluloses increases their compatibility with lignin and probably also with tannins, but decreases compatibility with cellulose. Thus, plant cell walls have to be described as a polyblend structure (Manson and Sperling, 1976). Such interactions may be significant in chemical stabilization of wood products (see Section Chemical modifications of lignocellulosic products).

The supramolecular structure of lignin has been approached only in simulation studies by Gravitis and co-workers (Ozol-Kalnins et al., 1986). These authors have discussed the formation of lignin model polymers, such as bulk- and endwise-dehydropolymers (DHP) comprehensively described by Sarkanen (1971), in terms of random wall aggregation of particles or of clusters. Diffusion limited aggregation (DLA) and the cluster–cluster aggregation (CCA) processes simulated by Witten and Sander (1981) and Meakin (1983) were used for these estimations. The fractal dimensions suggested by these authors for bulk- and endwise-DHP, according to published data, are shown in Table 11. However, they require re-evaluation, by taking the structural peculiarities of lignin networks and monomers into account, and need to be checked by experiment. According to simulations of stress distribution for a rigid fractal embedded in a two-dimensional medium (Meakin, 1987), significant differences in mechanical stress might occur, both at the surface of

TABLE 11

Fractal dimensions (d.f. ± SD) of bulk and endwise model lignin polymers estimated in the cases of diffusion limited aggregation (DLA) and cluster–cluster aggregation (CCL) on a surface (two dimensions: 2D) or in a volume (three dimensions: 3D)

	End-wise polymer (DLA)		Bulk-polymer (CCL)	
	2D	3D	2D	3D
d.f. ± SD	1.68 ± 0.07	2.51 ± 0.06	1.42 ± 0.03	1.78 ± 0.05

the embedded fibres in lignocellulosic composites and in the volume of the hemicellulosic matrix, depending on the type of lignin polymerization.

CONCLUSION

Various selected examples chosen in this review clearly show that natural and artificial lignocellulosic products such as woods, annual plants, reconstituted wood derivatives, panels and even board and papers can be studied as composites. Both theoretical concepts and industrial processes developed in the framework of the science of composites apply to lignocellulosic products. In this respect, lignocellulose appears, however, to be very highly complex, with a combination of several levels of complexity depending on plant species, organ and tissue types, hollow cellular and multilayered subcellular organization and finally inhomogeneity in macromolecular structure of polymeric components. Furthermore, these polymeric components may be endowed with ultrastructural properties of self-organization, as discussed for example by Northolt and de Vries (1985), Vian et al. (1986) and Monties (1989) for cellulose, hemicellulose and lignin, respectively.

The importance of basic understanding of the relations between molecular structures and mechano-chemical properties has thus to be stressed as the main limitation to understanding levels of ultrastructure, molecular architecture, modification of polymer reactivity, and finally, self-organization phenomena. As for synthetic composites, such knowledge is a prerequisite for industrial use of competitive lignocellulosic products.

REFERENCES

Agarwal, U.P. and Atalla, R., 1986. In situ Raman microprobe studies of plant cell walls: macromolecular orientation and compositional variability in the secondary wall of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. Planta, 169: 325–332.

Amin, M.B., Maadhah, A.G. and Ushani, A.M., 1986. Natural vegetable fibres: a status report. In: C.E.J. Carraher and L.H. Sperling (Editors), Renewable Resource Materials. Plenum Press, New York/London, pp. 29–39.

Archer, R.R., 1987. On the origin of growth stresses in trees. 1. Micromechanics of developing cell wall. Wood Sci. Technol., 21: 139–154.
Atlan, H., 1974. On a formal definition of organization. J. Theor. Biol., 45: 295–304.
Avramidis, S. and Smith, L.A., 1989. The effect of resin content and face-to-core ratio on some properties of oriented strand boards. Holzforschung, 43: 131–133.
Bach-Tuyet, L.T., Iiyama, K. and Nakano, J., 1985. Preparation of carboxymethylcellulose from refiner mechanical pulp: physical and chemical associations among cellulose, hemicelluloses and lignin in wood cell wall. Mokuzai Gakk., 31: 475–482.
Bamber, R.K., 1987. The origin of growth stresses: a rebuttal. Int. Assoc. Wood Anat. Bull., 8: 80–84.
Barber, N.F., 1968. A theoretical model of shrinking wood. Holzforschung., 22: 97–103.
Bates, G.W. and Ray, P.M., 1981. pH dependent interaction between pea cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth. Plant Physiol., 68: 158–164.
Bear, E., 1986. Advanced polymers. Sci. Am., 254: 179–186.
Bjorkman, A., 1988. Studies on solid wood. 1 – Comprehension of the natural composite wood. Cell Chem. Technol., 22: 245–254.
Boyd, J.D., 1977. Relationship between fiber morphology and shrinkage of wood. Wood Sci. Technol., 11: 3–22.
Buxton, D.R., 1989. In vitro digestion kinetics of temperate perennial forage legume and grass stems. Crop Sci., 29: 213–219.
Catesson, A.M., 1980. Les tissus végétaux. In: B. Monties (Editor), Les Polymères Végétaux. Gauthier-Villars, Paris, pp. 1–29.
Chafe, S.C., 1987. Collapse, volumetric shrinkage, specific-gravity and extractives in Eucalyptus and other species. 2. The influence of wood extractives. Wood Sci. Technol., 21: 27–41.
Chesson, A., Gordon, A.H. and Lomax, J.A., 1983. Cell wall organization and the biodegradation of cereal straws. Biodeterioration, 5: 652–660.
Choo, T.W., McCullough, R.L. and Pipes, B.R., 1986. Composites. Sci. Am., 254: 193–203.
Choong, E.T., 1969. Effect of extractives on shrinkage and other hygroscopic properties of ten southern pine woods. Wood Fiber, 1: 124–133.
Choong, E.T., Fogg, P.J. and Pollock, C.B., 1989. Variation in shrinkage properties of second-growth baldcypress and tupelo-gum. Wood Fiber Sci., 21: 17–29.
Clark, J.P. and Flemings, M.C., 1986. Advanced materials and the economy. Sci. Am., 255: 43–49.
Cleland, R.E., 1981. Wall extensibility: hormones and wall extension. In: W. Tanner and F.A. Loewus (Editors), Plant Carbohydrates: II, Extracellular Carbohydrates. Encyclopedia of Plant Physiology, New Ser., Vol. 13B. Springer, Berlin, pp. 255–269.
Colvin, J.R., 1983. Ultrastructure of plant cell wall: a biophysical point of view. In: W. Tanner and F.A. Loewus (Editors), Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13B, Springer, Berlin, pp. 9–27.
Cornsweet, T.M., 1970. Advanced composite materials. Science, 168: 433–438.
Favis, B.D. and Goring, D.A.I., 1984. A model for the leaching of lignin macromolecules from pulp fibers. J. Pulp Pap. Sci., 10: J.139–J.143.
Fengel, D. and Wegener, G., 1984. Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Walter de Gruyter, Berlin, 613 pp.
Fry, S.C., 1989. The structure and functions of xyloglucan. J. Exp. Bot., 40: 1–11.
Geimer, R.L., 1981. Predicting shear and internal bond properties of flakeboard. Holz. Roh-Werkstoff., 39: 409–415.
Gerasimowicz, W.V., Hicks, K.V. and Pfeffer, P.E., 1984. Evidence for the existence of associated lignin carbohydrate polymers as revealed by carbon-13 CP MAS solid state NMR spectroscopy. Macromolecules, 17: 2597–2603.
Goldstein, I.S., 1981. A new dimension in wood utilization. Wood and Fiber, 13: 1.

Goring, D.A.I., 1989. The lignin paradigm. In: W.G. Glasser and S. Sarkanen (Editors), Lignin: Properties and Materials, Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 397: 2–10.
Gravitis, J. and Erins, P., 1983. Topological and conformational structure and macroscopic behavior of lignin. J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp., 37: 421–440.
Guitard, D., 1987. Mécanique du Matériau Bois et Composites. Cepadues, Toulouse, 238 pp.
Harada, H. and Cote Jr., W.A., 1985. Structure of wood. In: T. Higuchi (Editor), Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press, New York, pp. 1–42.
Harris, R.A. and Johnson, J.A., 1982. Characterization of flake orientation in flakeboards. Wood Fiber, 14: 254–262.
Haslam, E. and Lilley, T.H., 1985. New polyphenols from old tannins. In: C.F. van Sumere and P.J. Lea (Editors), The Biochemistry of Plant Phenolics. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur., Vol. 25, Clarendon Press, Oxford, pp. 237–256.
Hatfield, G.R., Sardasthi, M. and Maciel, G.E., 1987. Analysis of molecular orientational order in solid samples by nuclear magnetic resonance: application to lignin and cellulose in wood. Anal. Chem., 59: 1659–1664.
Hills, G.J., Phillips, J.M. and Roberts, K., 1975. Self assembly of plant cell wall in vitro. J. Mol. Biol., 96: 431–441.
Hiltner, A., Cassidy, J.J. and Baer, E., 1985. Mechanical properties of biological polymers. Annu. Rev. Mater. Sci., 15: 455–482.
Johansson, A., 1985. Comment to the Goring lamella model and the leaching of lignin. J. Pulp Pap. Sci., 11: J.78–J.80.
Joseleau, J.P., 1981. Les hémicelluloses. In: B. Monties (Editor), Les Polymères Végétaux. Gauthier Villars, Paris, pp. 87–121.
Jouin, D., Tollier, M.T. and Monties, B., 1988. Lignification of oakwood. 1. Lignin determination in sapwood and heartwood. Cell. Chem. Technol., 22: 231–243.
Kato, K., 1981. Ultrastructure of the plant cell wall: biochemical point of view. In: W. Tanner and F.A. Loewus (Editors), Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates. Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13B, Springer, Berlin, pp. 29–46.
Kutschera, U. and Schopfer, P., 1986. In vivo measurement of cell wall extensibility in maize coleoptiles: effects of auxin and abscisic acid. Planta, 169: 437–442.
Liedl, G.L., 1986. The science of materials. Sci. Am., 254: 105–112.
Lin, J.T.H., 1987. Some properties of fiber-reinforced, polyester based composites, made with coir, jute and sisal fibers. University of Washington, University Microfilm International Publishers, Ann Arbor, MI, 142 pp.
Mackay, A.L., Tepfer, M., Taylor, I.A.P. and Volke, P., 1985. Proton nuclear magnetic moment and relaxation study of cellulose morphology. Macromolecules, 18: 1124–1129.
Manson, J.A. and Sperling, L.H., 1976. Polymer Blends and Composites. Plenum Press, New York/London, 513 pp.
Mark, R.E., 1967. Cell Wall Mechanisms of Tracheids. Yale University Press, New Haven/London, 310 pp.
Meakin, P., 1983. Formation of fractal clusters and networks by irreversible diffusion limited aggregation. Phys. Rev. Lett., 51: 1119–1122.
Meakin, P., 1987. Stress distribution for a rigid fractal embedded in a two dimensional elastic medium. Phys. Rev., 36: 325–331.
Meyer, J.A., 1977. Wood-polymers composites and their industrial applications. In: I.S. Goldstein (Editor), Wood Technology: Chemical Aspects, Am. Chem. Soc. Symp. Ser., 43: 301–325.
Meyer, J.A., 1985. Wood-polymers material. In: R. Rowell (Editor), The Chemistry of Solid Wood. Am. Chem. Soc. Symp. Ser., 207: 256–289.
Meylan, B.A., 1972. The influence of microfibril angle on the longitudinal shrinkage–moisture content relationship. Wood Sci. Technol., 6: 293–301.

Monties, B., 1985. Recent advances on lignin inhomogeneity. In: C.F. van Sumere and P.J. Lea (Editors), The Biochemistry of Plant Phenolics. Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur., Vol. 25, Clarendon Press, Oxford, pp. 161–183.

Monties, B., 1989. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organization of lignin networks. Ann. Sci. For., 46 (Suppl.): 848–855.

Monties, B. and Lapierre, C., 1981. Données récentes sur l'hétérogénéité des lignines. Physiol. Veg., 19: 327–348.

Mudry, M., 1984. Panorama des travaux scientifiques mondiaux sur la mécanique et la rhéologie du bois. In: C. Huet, D. Bourgoin and S. Richmond (Editors), Rhéologie des Matériaux Anisotropes: Rheology of Anisotropic Materials. C.R. 19è Coll. G.F.R. Cepadues, Paris, pp. 353–410.

Narasimhalu, P., Graham, H. and Aman, P., 1989. Effects of ozonation on the chemical composition and in vitro degradation of triticale internodes and red clover stems. Anim. Feed Sci. Technol., 24: 159–172.

Newman, R.H., Morgan, K.R. and Leary, G.J., 1989. Nuclear spin diffusion studies of spatial relationship between chemical components of plant cell wall. In: Proc. 5th Int. Symp. Wood Pulp. Chem., 2: 221–223.

Nielsen, L.E., 1962. Mechanical Properties of Polymers. Reinhold, London, 274 pp.

Northcote, D.H., 1972. Chemistry of plant cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol., 23: 113–132.

Northolt, M.G. and de Vries, H., 1985. Tensile deformation of regenerated and native cellulose fibers. Angew. Makromol. Chem., 133: 183–203.

Ozol-Kalnins, V.J., Kokorievitch, A.J. and Gravitis, Ya-A., 1986. Evaluation des dimensions fractales et chimiques de polymères bulk et endwise. Khim. Drev., 5: 108–109. (In Russian: translated title.)

Pizzi, A. and Cameron, F.A., 1986. Flavonoid tanins: structural wood components for drought-resistance mechanism of plants. Wood Sci. Technol., 20: 119–124.

Preston, R.D., 1974. The Physical Biology of Plant Cell Walls. Chapman Hall, London, 491 pp.

Rodriguez, F., 1970. Principles of Polymer Systems, McGraw-Hill, New York, 560 pp.

Roland, J.C., 1981. Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. In: B. Monties (Editor), Les Polymères Végétaux. Gauthier Villars, Paris, pp. 45–65.

Roland, J.C., Reis, D., Vian, B., Satiat-Jeneumetre, B. and Mosiniak, M., 1987. Morphogenesis of plant cell walls at supramolecular level. Protoplasma, 140: 75–91.

Rosen, H.N., 1978. Interactions of alcohols and organic acids with wood. Wood Sci., 10: 151–157.

Rowell, R.M., 1982. Distribution of acetyl groups in southern pine wood reacted with acetic anhydride. Wood Sci., 15: 172–182.

Rowell, R., 1984. The Chemistry of Solid Wood. Advances in Chemistry Series, Vol. 207. Am. Chem. Soc., Washington, DC, 614 pp.

Rowell, R.M., Tillman, A.M. and Simonson, R., 1986. A simplified procedure for the acetylation of hardwood and softwood flakes for flakeboard production. J. Wood Sci. Technol., 6: 427–448.

Rowell, R.M., Esenther, G.R., Nicholas, D.R. and Nilsson, T., 1987. Biological resistance of southern pine and aspen flakeboards made from acetylated flakes. J. Wood Sci. Technol., 7: 427–440.

Sarkanen, K.V., 1971. Precursors and their polymerization. In: K.V. Sarkanen and C.H. Ludwig (Editors), Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Wiley Interscience, New York, pp. 150–155.

Satyanarayana, K.G., Pillai, C.K.S., Sukaraman, K. and Vijayan, K., 1982. Structure properties studies of fibers from various parts of coconut tree. J. Mater. Sci., 17: 2453–2462.

Sawabe, O., 1980. The fine structure of wood cell wall postulated in view of pure structure; Part I. Mokuzai Gakk., 26: 641–646.

Scalbert, A. and Monties, B., 1986. Comparison of wheat straw lignin preparations: I. Holzforschung, 40: 119–127.
Scallan, A.M., 1974. The structure of the cell wall of wood: a consequence of anisotropic intermicrofibrillar bonding? Wood Sci. Technol., 6: 266–271.
Skaar, C., 1984. Wood–water relationship. In: R. Rowell (Editor), The Chemistry of Solid Wood. Advances in Chemical Series, Vol. 207, Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 127–173.
Stamm, A.J., 1965. Wood and Cellulose Science. Ronald Press, New York, 549 pp.
Stone, J.E. and Scallan, A.M., 1968. A structural model for the cell wall of water-swollen wood pulp fibers based on their accessibility to macromolecules. Cell. Chem. Technol., 2: 343–358.
Vian, B., Reis, D., Mosiniak, M. and Roland, J.C., 1986. The glucuronoxylans and the helicoïdal shift in cellulose microfibrils in Linden wood: cytochemistry in muro and on isolated molecules. Protoplasma, 131: 185–199.
Wilkie, K.C.B., 1983. Hemicelluloses. Chem. Technol., 306–319.
Witten Jr., T.A. and Sander, L.M., 1981. Diffusion limited aggregation a kinetic critical phenomenon. Phys. Rev. Lett., 47: 1400–1403.

n° 87

Physiol. Vég., 1981, **19** (2), 327-348.

Données récentes sur l'hétérogénéite de la lignine

BERNARD MONTIES et CATHERINE LAPIERRE

Laboratoire de Chimie biologique et Photophysiologie, I.N.R.A.,
Institut national agronomique,
Centre de Grignon, 78850 *Thiverval-Grignon*

(Manuscrit reçu le 22 novembre 1980, accepté le 22 janvier 1981)

RÉSUMÉ

Mots clés : hétérogénéité, hétéropolymérisation, lignines, déhydropolymère, acides aromatiques.

Les progrès importants, faits durant les cinq dernières années, permettent d'affirmer l'existence d'une hétérogénéité de la lignine. Dans cette revue sont regroupées des données concernant l'hétérogénéité des lignines et de polymères modèles (déhydropolymères). On a envisagé seulement trois principaux types d'hétérogénéité par variation, soit de la composition monomérique, soit de la fréquence des liaisons intermonomères, soit des réactions d'hétéropolymérisation. Dans ce dernier cas, on a discuté particulièrement l'existence de liaisons entre les acides aromatiques et les lignines elles-mêmes ou les polyosides présents dans les préparations.

SUMMARY

Key words: heterogeneity, heteropolymerisation, lignins, dehydropolymers, aromatic acids.

Significative progress done during the last five years allows to state the occurrence of lignin heterogeneity. Data concerning heterogeneity of lignins and of models (dehydropolymers) are reviewed. Only three patterns of heterogenity by variation of either the monomeric composition or the intermonomeric linkage frequency or heteropolymerisation are discussed. In the last case, occurrence of linkages between aromatic acids and lignin itself or accompanying polysaccharides is especially discussed.

INTRODUCTION

La notion d'hétérogénéité des lignines rend compte de l'existence de différences qualitatives entre les fractions de lignine isolées, soit de plantes différentes, soit d'une même plante. L'existence d'une telle hétérogénéité est connue depuis longtemps. Dès 1944, le groupe de HIBBERT (CREIGHTON *et al.*, 1944) a rapporté des différences entre les proportions relatives des monomères constituant la fraction non condensée des lignines de plantes différentes. Cependant, jusqu'aux environs de 1970, peu d'études ont été consacrées à l'analyse de l'hétérogénéité des lignines, principalement à cause du manque de résolution des méthodes de caractérisation des lignines.

Depuis 1970, et surtout depuis ces 5 dernières années, la fréquence des publications mentionnant l'existence d'une hétérogénéité des lignines a beaucoup augmenté. Pour cette raison nous avons fait une revue des publications qui nous ont semblé les plus significatives en ce domaine.

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

431/529

Dans une revue récente (MONTIES, 1980), nous avons discuté les méthodes récentes de caractérisation, la structure, l'hétérogénéité et la biosynthèse des lignines. Parmi les divers types possibles d'hétérogénéité nous en avons distingué trois principaux :

– l'hétérogénéité de composition monomérique qui résulte de différences entre la fréquence des monomères;

– l'hétérogénéité de fréquence des liaisons intermonomériques qui résulte de l'existence de différents types de liaisons entre monomères;

– l'hétérogénéité résultant de la liaison des lignines avec des molécules autres que les monomères et qui correspond donc à des phénomènes d'hétéro-polymérisation.

Ici encore nous avons limité la discussion à ces trois types principaux. Auparavant il est nécessaire de rappeler brièvement quelques données concernant la structure des liaisons intermonomères des lignines. Ce rappel permettra de montrer que, même lors de la synthèse *in vitro* de polymères modèles de lignine (déhydropolymères ou DHP), on peut observer les trois types d'hétérogénéité. Dans ce domaine aussi des progrès ont eu lieu récemment.

1. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES LIGNINES-MODÈLES (DHP)

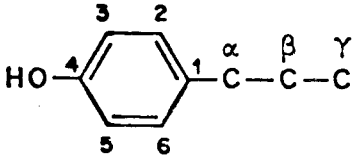
Les molécules modèles de lignines sont synthétisées par polymérisation oxydative des trois alcools hydroxy-cinnamiques constitutifs des lignines (*fig.* 1) :

– l'alcool coumarylique (hydroxy-1-benzène-propénylol-4) ou monomère hydroxybenzoyl (H);

– l'alcool coniférylique (méthoxy-2-hydroxy-1-benzène-propénylol-4) ou monomère gaïacyl (G);

– l'alcool sinapylique (diméthoxy-2.6-hydroxy-1-benzène-propénylol-4) ou monomère syringyl (S).

Notation *usuelle* α β γ
Notation *Freudenberg* γ β α



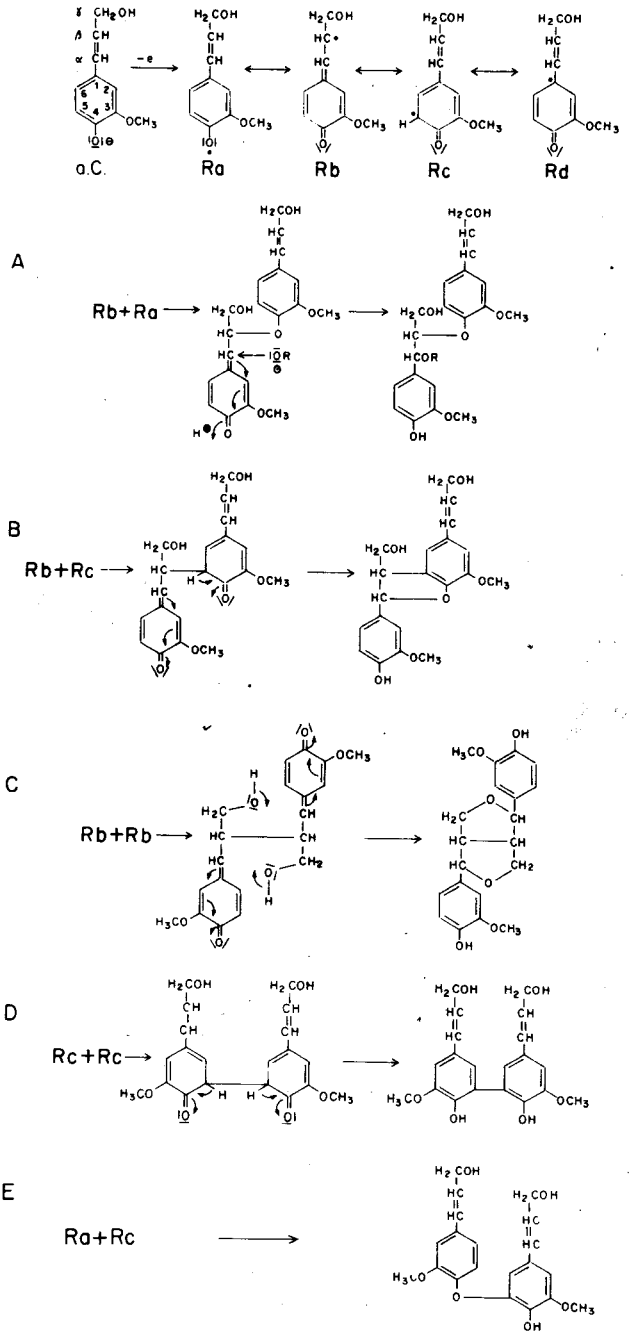
Nom du cycle	Hydroxy-benzoyl (H)	gaiacyl (G)	syringyl (S)
Substitution du cycle	4 hydroxy-	3 méthoxy- 4 hydroxy-	3 méthoxy- 4 hydroxy- 5 méthoxy-

FIG. 1. – Structure et nomenclature des unités phénylpropane.

– *Structure and nomenclature of the phenylpropanoïd units*

Lors de leur polymérisation oxydasique *in vitro*, chacun de ces monomères, seul ou en mélange, est susceptible de donner lieu à formation de dimères, oligomères et polymères grâce à des liaisons intermonomériques variées.

Dans la figure 2 est présentée la structure de quelques liaisons intermonomériques parmi les plus fréquentes. La plupart de ces dimères ont été isolés par FREUDENBERG


a.C.
Ra
Rb
Rc
Rd
A
Rb+Ra
B
Rb+Rc
C
Rb+Rb
D
Rc+Rc
E
Ra+Rc

et al., il y a une vingtaine d'années (FREUDENBERG, 1968). Indépendamment de la nature même des liaisons intermonomères, la figure 2 permet d'opposer deux types de dimères : les unités non condensées et les unités condensées. Dans les unités condensées, telles B, D, E, la réaction de condensation a lieu par substitution d'un hydrogène aromatique; il en résulte une liaison entre carbones aromatiques difficile à dégrader. Au contraire, dans les unités non condensées telles A et C, il n'y a pas eu substitution sur le cycle aromatique; on doit donc s'attendre à retrouver parmi les produits de dégradation de ces structures les noyaux H, G et S originels constitutifs des monomères.

Il ne faudrait pas déduire de la figure 2 que les monomères incorporés dans la lignine ne puissent pas subir de réaction de rupture du squelette phénylpropane (*fig.* 1) à 9 atomes de carbone. Des ruptures du squelette en C_9 sont possibles entre le carbone C_1 aromatique et le carbone α adjacent. La figure 3 illustre ce type de réaction qui a été analysée récemment par TOMIMURA et TERASHIMA (1979). Ces auteurs ont prouvé que la rupture du monomère se fait de façon « conservative » : le maillon propane reste fixé à la lignine sous forme de glycéraldéhyde-2-aryl-éther. Comme dans la figure 2, dans le cas de la formation de l'alkyl-aryl-éther (A), on constate de plus sur la figure 3 que l'attaque nucléophile en α de la méthylène quinone permet la formation soit d'alcool, soit d'éther, soit d'esters benzyliques.

Ces derniers mécanismes permettent d'envisager la possibilité d'une hétérogénéité des molécules modèles des lignines et donc des lignines elles-mêmes par hétéropolymérisation avec des alcools ou des acides organiques.

A. Hétéropolymérisation des DHP

De façon générale, toute méthylène quinone, qu'elle soit de type aryl-éther (*fig.* 2) ou de type diaryl-propane (*fig.*3), est *a priori* susceptible de donner lieu à addition nucléophile sur son carbone α. Cet aspect de la réactivité des méthylènes quinones a été revu et discuté récemment de façon détaillée (LEARY, 1980). Des réactions d'addition peuvent avoir lieu autant avec des fonctions carboxyliques et phénoliques qu'avec des hydroxyles provenant d'alcools ou de l'eau elle-même. Utilisant comme modèle de fonction alcool-benzylique les deux alcools vanillique et vératrylique, HEMMINGSON a montré que les réactions d'éthérification ont lieu à des vitesses relativement rapides même en milieu aqueux dans des conditions douces (HEMMINGSON *et al.*, 1978; HEMMINGSON, 1979). Ces résultats confirment donc la possibilité d'une hétérogénéité des DHP par addition sur les carbones benzyliques des molécules très diverses.

FIG. 2. — Structure des liaisons intermonomères parmi les plus fréquentes dans les lignines. Seuls sont représentés des composés de la série G. L'alcool coniférylique (aC) donne par déhydrogénation les radicaux mésomères (Ra, Rb, Rc, Rd) qui par condensation forment les dimères de type aryl-alkyl-éther-β-O-4 (A), coumarane (B), résinol (C), diphényl (D) et aryl-aryl-éther (E). Lors de la formation de A par condensation en β, la méthylène quinone peut donner lieu à attaque nucléophile en α pour former le groupement α-aryl-éther $\alpha\,\overset{|}{\underset{|}{C}}-O-R$.

— *Most prominent lignin intermonomeric linkages. Only guaiacyl compounds are shown. Mesomer radicals* (Ra, Rb, Rc, Rd), *resulting from coniferyl alcohol* (aC) *dehydrogenation, form dimeric structure of type: aryl-alkyl-ether-β-O-4* (A), *coumarane* (B), *resinol* (C), *diphenyl* (D) *and aryl-aryl-ether* (E). *After the formation of* (A) *by condensation on* β, *nucleophilic attack of the* α *carbon of the quinone methide forms* α-*arylether function* $\alpha\,\overset{|}{\underset{|}{C}}-O-R$

En 1976, TANAKA *et al.*, ont synthétisé un ester benzylique entre le carbone 6 d'un acide glucuronique et le carbone α d'un gaïacyl-glycérol-β-O-4 gaïacyl éther; cette hétéropolymérisation a eu lieu selon le mécanisme représenté sur le modèle A (*fig.* 2) (TANAKA *et al.*, 1976). Par la suite, ces mêmes auteurs ont aussi synthétisé des éthers benzyliques en 6 de la molécule de glucose (TANAKA *et al.*, 1979). Ces résultats démontrent l'existence d'une hétérogénéité des modèles de lignine par hétéropolymérisation et ils ont fait l'objet d'une revue récente par HIGUCHI (1980). Il convient cependant de souligner que ces modèles de complexes lignine-polyoside ont cependant été obtenus par synthèse en milieu organique. Compte tenu de la complexité et de l'importance des effets de milieu sur ces réactions, surtout en présence d'eau (LEARY, 1980), il restait à prouver l'existence de ces réactions en milieu aqueux. La possibilité de ce type de réaction vient d'être établie dans des sirops de glucose par KATAYAMA *et al.* (1980 *a* et *b*). Après déshydrogénation enzymatique d'alcool coniférylique par des peroxydases ou des laccases dans des sirops de glucose, à plus de 50 % de concentration, ces auteurs ont isolé et caractérisé plusieurs dimères éthérifiés par du glucose, après réaction de l'hydroxyle C_6, et correspondant respectivement à des méthylènes quinones de type aryl-alkyl-éther (*fig.* 2) et diarylpropane (*fig.* 3).

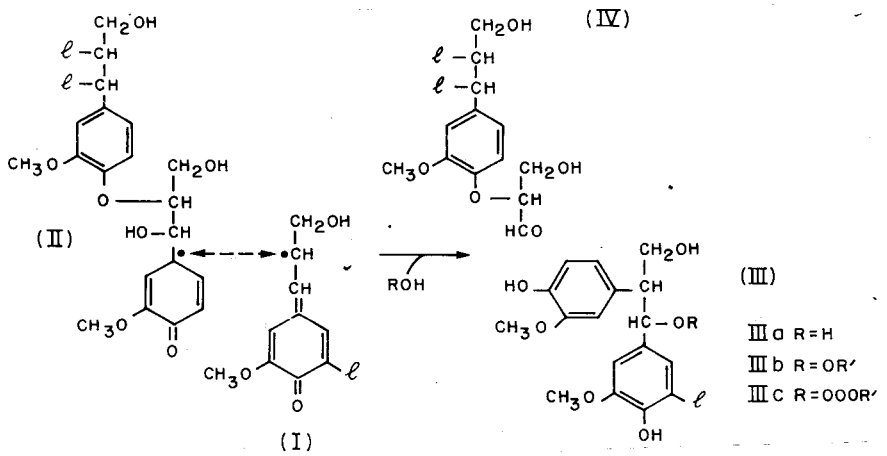


FIG. 3. — Formation de structures diarylpropanol et glycéraldéhyde-2-aryl éther par réaction de méthylène quinones. Condensation radicalaire entre deux méthylène quinones de fragments déhydroconiféryl (I) et gaïacyl glycérol-β-O-4-déhydroconiféryl ether II constitutif de la lignine (I). Selon la composition du milieu il peut y avoir formation d'alcool benzylique (IIIa), d'éther benzylique (IIIb) ou d'ester benzylique (IIIc).

— *Diarylpropanol and glyceraldehyde-2-aryl ether formation by reaction of quinone methide. Radical condensation between two quinone methides from dehydroconiferyl* (I) *and guaiacyl glycerol-β-O-4 dehydroconiferyl ether* (II) *from lignin* (I). *According to the medium composition, benzyl alcohol* (IIIa), *benzyl ether* (IIIb) *or benzyl ester* (IIIc) *can be formed.*

Ces résultats sont donc significatifs à trois titres au moins. D'une part, ils confirment l'existence d'une hétérogénéité des modèles de lignine par hétéropolymérisation. D'autre part, ils montrent que ces réactions sont possibles en milieu aqueux à condition de trouver des conditions favorables. Enfin, ils conduisent à supposer que des réactions de ce type peuvent avoir lieu *in vivo* dans les parois cellulaires, analogues à des sirops, et cela bien qu'il puisse y avoir formation préalable d'alcools benzyliques par réaction avec l'eau en milieu plus hydraté tel que des organites du cytoplasme.

Ces effets de solvants conduisent à envisager plus en détail l'influence de la composition du milieu sur la fréquence des liaisons intermonomères dans les molécules modèles de lignine.

B. Hétérogénéité des liaisons intermonomères dans les DHP

La possibilité de variations de la fréquence des liaisons intermonomériques dans les DHP a été envisagée en détail, dès 1971, par SARKANEN; ce problème a été discuté à nouveau récemment (MONTIES, 1980). Il suffit de rappeler ici que, lorsque les DHP sont obtenus par apport lent du monomère dans le milieu de réaction (DHP « à la goutte »), on est conduit à prévoir la formation de polymères linéaires (DHP « en ligne ») dans lesquels devraient prédominer des liaisons de type aryl-alky-éther de type β-O-A (structure A, *fig.* 2). Au contraire dans le cas d'un apport rapide de monomères (DHP « à la verse »), il y aurait formation de polymères plus ramifiés (DHP « en bloc ») dans lesquels devraient prédominer des structures condensées de type phénylcoumarane, diphényle, etc. (B, D, E, *fig.* 2).

TABLEAU I

Variabilité de la fréquence des liaisons intermonomères en fonction des conditions de polymérisation et de la nature du milieu et des monomères (entre parenthèses : agent de polymérisation).

Frequency variability of the intermonomere linkage in relation to polymerisation conditions and to medium and monomeres composition (brackets: polymerisation system).

Milieu	Monomère (alcool en C_9)	Fréquence relative des liaisons		
		Coumarane (1)	Ether β-*O*-4 (1)	Résinol (1)
Eau DHP à la verse (peroxydase $+H_2O_2$)	*p*-coumarylique (H)	48	20	32
	coniférylique (G)	54	19	27
	sinapylique (S)	–	9	91
Eau + acétone, 40 + 3 vol. ($FeCl_3$)	coniférylique	27	27	46
	sinapylique	–	27	73
Eau + dioxanne, 2 + 5 vol. ($FeCl_3$)	coniférylique	39	39	22
	sinapylique		85	15
Dioxanne pur ($FeCl_3$)	sinapylique	–	94	–
(1) *Voir* légende de la figure 2.				

Pour le moment, à notre connaissance, ce type d'hétérogénéité demeure encore hypothétique. Depuis 1976, on dispose cependant de données indiquant l'existence d'une hétérogénéité des DHP par variation de la fréquence des liaisons intermonomères. Le tableau I illustre ce type de variabilité d'après TANAHASHI *et al.* (1976). On constate que, quelque soit le type de monomère H, G où S, les conditions de milieu et de polymérisation affectent de façon sensible les proportions relatives des liaisons intermonomères formées; il paraît donc raisonnable de conclure qu'il peut exister une hétérogénéité de ce type dans les DHP.

C. Hétérogénéité de composition monomérique dans les DHP

La question de l'existence même d'une hétérogénéité de la composition monomérique des DHP n'est pas aussi simple qu'elle peut le paraître à premier abord. Il ne suffit pas en effet de mettre en présence des proportions variées de monomères dans un milieu réactionnel pour obtenir un copolymère de composition semblable; ce fait est très général. Les réactions de polymérisation des modèles de lignine ne font pas exception à cette règle.

La polymérisation de l'alcool sinapylique en fournit un exemple type puisqu'il a été longtemps supposé, après FREUDENBERG (1968), que seuls des dimères de type résinol (*fig.* 2) pouvaient se former. Les résultats du tableau I montrent que cette conclusion doit être nuancée. Mieux, en 1978, une série de polymères mixtes entre les alcools coniféryliques et sinapyliques a pu être synthétisée et fractionnée par YAMASAKI *et al.* (1978 *a*). Ces auteurs ont constaté que les rapports molaires entre les unités S et G pouvaient varier de 0,1 à 4,0 démontrant ainsi de façon indiscutable l'existence de DHP de type syringyl et gaïacylsyringyl. Il convient de souligner à ce propos que dès 1973 SCHWEERS et FAIX avaient rapporté l'incorporation de l'alcool sinapylique dans des DHP ternaires de type H, G, S. Comparant 10 polymères différents, ces auteurs ont montré que la présence de quantités relativement élevées d'alcool sinapylique entraîne la formation de produits solubles mais que cependant le rendement de son incorporation est comparable à celui des autres monomères. Par la suite, la structure de ces polymères fut analysée en détail (SCHWEERS et FAIX, 1973).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats, obtenus pour la plupart durant ces 5 dernières années, permet de conclure maintenant avec certitude qu'il existe une hétérogénéité des molécules modèles de lignine au niveau de leur composition monomérique, de la fréquence des liaisons intermonomères et, enfin, de leur hétéropolymérisation avec d'autres molécules. Compte tenu de la similitude profonde entre DHP et lignines il ne paraît pas déraisonnable de rechercher ces mêmes types d'hétérogénéité dans les lignines elles-mêmes.

II. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES LIGNINES

Dans le cas des lignines, on peut imaginer d'autres cas d'hétérogénéité en plus des trois types envisagés dans le cas des modèles.

Il en est ainsi, par exemple, pour les modes de polymérisation parce que les lignines sont des polymères alors que les modèles sont au plus des oligomères. On admet en effet actuellement que la lignine forme des réseaux tridimensionnels qui interpénètrent les macromolécules pariétales. De ce fait, on peut supposer qu'il puisse exister des variations par exemple du degré de réticulation de ces réseaux, de l'importance de leurs fractions gel et sol ainsi que de la disposition spatiale des réseaux eux-mêmes, toutes choses restant égales par ailleurs. On peut donc s'attendre à ce qu'il existe dans les lignines une hétérogénéité de mode de polymérisation. Comme cependant les propriétés macromoléculaires des lignines sont, à la fois, encore très mal connues et discutées (PLA, 1980; YAN et JOHNSON, 1980) nous n'envisagerons par la suite, dans le cas des lignines, que les trois cas abordés pour les molécules modèles.

A. Hétéropolymérisation des lignines

Ce type d'hétérogénéité est de loin le plus mal connu et le plus délicat à analyser. Les études des molécules modèles permettent de supposer que des additions nucléophiles sur les carbones benzyliques des méthylènes quinones (*fig.* 2 et 3) sont principalement à l'origine des phénomènes d'hétéropolymérisation. Or il existe dans

les parois végétales de très nombreux composés à fonctions hydroxyles nucléophiles (fonctions alcool et acides carboxyliques des polyosides, fonctions phénol et alcool des lignines, fonctions aminées des protéines, acides organiques aliphatiques ou aromatiques et surtout eau). On peut donc supposer que tous ces composés peuvent donner lieu à hétéropolymérisation soit pendant la polymérisation (même en phases hydratées), soit après la polymérisation (par réaction secondaire des fonctions alcool benzylique résultant d'additions d'eau en milieu moins hydraté : LEARY, 1980) soit enfin après vieillissement, séchage des produits et même extraction des lignines (par réarrangements des liaisons benzyliques formées précédemment).

Il est actuellement impossible de faire la part de ces trois types de phénomène dans l'origine des effets d'hétéropolymérisation. Pour cette raison nous limiterons cette revue au cas des liaisons avec les acides aromatiques, que nous avons déjà brièvement discuté (MONTIES, 1977, 1980) et qui est relativement le mieux connu.

L'existence même de liaisons de type ester entre lignine et acides aromatiques, de type *p*-hydroxybenzoïque et *p*-coumarique, a été rapportée depuis 25 ans par SMITH (1955 *a* et *b*). Ce phénomène est observé principalement chez certaines Salicacées (VENVERLOO, 1971) et Monocotylédones (NAKAMURA et HIGUCHI, 1976) dans lesquelles peut être observée une estérification de parois par de l'acide férulique (HARRIS et HARTLEY, 1976, 1980).

Dans la perspective de l'hétérogénéité des lignines les résultats de NAKAMURA et HIGUCHI (1976) sont particulièrement pertinents. En effet, ces auteurs ont confirmé la présence d'acides *p*-hydroxybenzoïque et *p*-coumarique liés sous forme ester respectivement aux lignines de Bambou (*Phyllostachys pubecens*) et de Peuplier (*Populus X-euramericana* cv. I 214). De plus, dans ce même travail, ils ont démontré l'existence de deux groupes de liaisons ester différentes par leur résistance à l'hydrolyse acide en milieu dioxanne-aqueux (acidolyse).

La comparaison de cinétiques d'acidolyse de molécules modèles a conduit ensuite ces auteurs à supposer que, quel que soit l'acide aromatique, les esters les plus fragiles sont les esters benzyliques alors que la fraction plus résistante est constituée par des esters aliphatiques formés sur les fonctions alcool primaire des carbones γ des maillons propane.

Ce premier ensemble de résultats montre donc, non seulement, l'existence de l'hétéropolymérisation mais aussi sa complexité puisque des liaisons différentes peuvent s'établir entre la lignine et l'hétéropolymère. Il convient, à ce propos, d'ajouter que lors de ces études modèles NAKAMURA et HIGUCHI (1978) ont de plus observé l'incorporation de l'acide *p*-coumarique dans ces DHP sous forme d'autres liaisons de type vraisemblablement condensé (diphényle, coumarane, etc.). L'existence de ce dernier type d'hétéropolymérisation dans la lignine elle-même vient d'être démontrée récemment par TERASHIMA *et al.* (1979) après incorporation d'acides benzoiques et féruliques dans le xylème de tiges de jeunes peupliers hybrides (*Populus nigra* × *Populus maximowiczii*).

Les conclusions de NAKAMURA et HIGUCHI (1978) concernant la présence de liaisons ester sur les atomes α et γ des maillons propanes des lignines de bois moulus de Peuplier et de Bambou posent cependant un problème. On ne peut en effet exclure, dans ces préparations de lignine, la présence d'oses ou de polyosides estérifiés par des acides phénoliques qui seraient, de ce fait, facilement hydrolysables comme le sont les esters benzyliques aromatiques.

Afin de tester cette hypothèse nous avons choisi d'analyser des lignines « au dioxanne » préparées par acidolyse douce afin de réduire le plus possible leur teneur en

oses sans dénaturer de façon importante la lignine elle-même. Les résultats de ces analyses, qui ont été déjà rapportés brièvement par ailleurs (MONTIES, 1977), sont résumés dans le tableau II. La comparaison des teneurs relatives en oses et esters phénoliques de lignines de Peuplier et de Blé est compatible, surtout dans le cas de la paille, avec une estérification de la lignine elle-même. Compte tenu des conditions d'hydrolyse et des données modèles de NAKAMURA et HIGUCHI, il est très vraisemblable que les acides phénoliques estérifient les alcools en γ du « cœur » de ces lignines au dioxanne.

TABLEAU II

Bilan des esters phénoliques et des oses présents dans les lignines au dioxanne de Peuplier et de Blé

Phenolic esters and ose contents in dioxanne lignins of poplar and wheat

A partir de lignines isolées dans le dioxanne aqueux (9 : 1 vol.) à chaud (30 min, HCl 0,2 N, reflux) on a isolé les acides phénoliques par hydrolyse alcaline (1 h, NaOH 2 N, 35°C) et les oses par hydrolyse acide (1 h, HCL 6 N, 95°C). Dosages densitométriques après séparation par chromatographie sur couche mince. Résultats en pourcentage de la lignine sèche et, entre parenthèses, porportions relatives ou traces (tr).

Lignine	Esters phénoliques		Oses	
	Nature	TOTAL	Nature	TOTAL
Bois de Peuplier	*p*-hydroxybenzoique vanillique (tr)	0,5	xylose (10) mannose (1) glucose (1) galactose (1) ac.uronique (tr)	1
Paille de Blé (1)	*p*-coumarique (10) férulique (1)	2,5	arabinose (10) xylose (10) glucose (1) galactose (1) ac.uronique (tr)	0,25

(1) Résultats très voisins pour des feuilles de plantules âgées de 15 jours.

Au cours de la préparation de ces lignines au dioxanne, nous avons constaté qu'une fraction des acides aromatiques, *p*-hydroxybenzoïques ou *p*-coumariques est rendue soluble par l'acidolyse. Un tel résultat peut être expliqué par l'hydrolyse de fonctions ester liées de façon facilement hydrolysable soit à la lignine elle-même, soit aux polyosides.

Pour tester cette hypothèse nous avons préparé des lignines soit de paille de Blé soit de bois de Peuplier moulu à l'aide d'un broyeur rotatif ordinaire. Nous avons ensuite comparé la nature et la teneur des acides phénoliques liés à ces préparations. Dans le cas de la lignine de bois de Peuplier (*Populus X-euramericana* cv. I 214) les oses ont été solubilisés par hydrolyse acide (tableau III). Dans le cas de la lignine de paille de Blé (*Triticum aestivum* cv. Champlein) les oses ont été solubilisés par hydrolyse enzymatique (tableau IV). Dans les deux cas, on constate que l'élimination des oses entraîne la solubilisation des acides phénoliques méthoxylés (acide vanillique du Peuplier et acide férulique du Blé). De façon complémentaire, on constate un

enrichissement relatif de la lignine des résidus insolubles en acides phénoliques non méthoxylés. Quel que soit le mode de liaison de ces acides avec la lignine, ces résultats confirment donc l'hétérogénéité de la fraction esters phénoliques liée aux préparations de lignine. Conformément aux observations de HARRIS et HARTLEY (1976, 1980) et de FRY (1979), qui ont décrit l'estérification des polyosides pariétaux dans des parois non lignifiées, les résultats des tableaux III et IV semblent pouvoir être expliqués par l'existence de liaisons entre les acides phénoliques, méthoxylés ou non, et les polyosides. Au moins dans le cas de la paille de Blé, les liaisons avec les polyosides seraient de type ester puisque une fraction des acides présents dans le filtrat n'est extractible qu'après hydrolyse alcaline (tableau IV).

TABLEAU III

Bilan du fractionnement des acides hydroxybenzoiques présents dans la lignine de bois de Peuplier ultramoulu

Comparison of the hydroxybenzoic acid fractions isolated from ultragrinded poplar wood

Lignine de type Bjorkman extraite par le dioxanne aqueux (9 : 1 vol.) de bois de Peuplier ultramoulu à sec dans un broyeur rotatif (10 j, 450 tr . min^{-1}, 4°C). Après hydrolyse chlorhydrique (1 h, HCl 6 N, 100°C) les acides ont été isolés de la fraction soluble et du résidu par hydrolyse alcaline (1 h, NaOH 2 N, 35°C) éventuelle et extraction par l'éther éthylique. Dosage par densitométrie ultraviolette après séparation sur couche mince. Teneurs en milligrammes/100 mg MS et, entre parenthèses, en pour cent de chacun.

Fraction	Acides		TOTAL calculé
	p-hydroxy-benzoique	Vanillique et syringique	
Filtrat : libres.	1,60 (61)	1,04 (98)	2,64 (62)
Résidu : h. alcaline.	1,04 (39)	0,02 (2)	1,06 (38)

TABLEAU IV

Bilan du fractionnement des acides hydroxycinnamiques présents dans la lignine de paille de Blé ultramoulue

Comparison of the hydroxycinnamic acid fractions isolated from ultragrinded wheat straw

Lignine de type Bjorkman extraite par le dioxanne aqueux (9 : 1 vol.) de paille de Blé ultramoulue à sec dans un broyeur rotatif (10 j, 450 tr. min^{-1}, 4°C). Après traitement par une cellulase (cellulyzine Calbiochem) les acides ont été libérés de la fraction soluble (filtrat) et du résidu par une hydrolyse alcaline (1 h, NaOH 2 N, 35°G) éventuelle et extraction par l'éther éthylique. Dosage par densitométrie ultraviolette après séparation sur couche mince, teneurs en milligrammes/100 mg MS et, entre parenthèses, en pour cent de chacun.

Fraction	Acides		TOTAL calculé
	p-coumarique	Férulique	
Filtrat :			
libre.	0,48 (8)	0,64 (90)	1,12 (17)
h. alcaline.	0,51 (9)	0,03 (5)	0,54 (8)
Résidu : h. alcaline.	4,93 (83)	0,03 (5)	4,96 (75)

Ainsi, malgré la vraisemblance de liaisons entre les acides phénoliques et les polyosides pariétaux, l'existence d'une hétéropolymérisation entre lignines et acides aromatiques demeure possible. Il existerait, de plus, plusieurs types de liaisons, ce qui constitue donc, à la limite, un premier exemple d'hétérogénéité des lignines par variation des fréquences de liaison.

B. Hétérogénéité des liaisons intermonomères des lignines

Bien que relativement mieux connu que le précédent, le second type d'hétérogénéité des lignines, lié à la fréquence des liaisons intermonomères, demeure cependant mal connu.

En 1971, MOROHOSHI et SAKAKIBARA ont publié une série d'articles concernant la répartition hétérogène des types de liaisons intermonomères dans des préparations de lignine isolées soit de façons différentes soit extraites de bois de réaction. A partir de bois moulus dans des broyeurs vibrants, ces auteurs ont isolé successivement des lignines de bois moulu (MWL) puis des complexes lignine-polyoside (LCC); ils ont caractérisé ces préparations de lignine par des méthodes physiques (résonance magnétique nucléaire du proton) et chimiques (acidolyse, oxydations par le permanganate ou le nitrobenzène). Dans leurs études ces auteurs se sont attachés à distinguer globalement les variations de degré de condensation des lignines, c'est-à-dire les variations de proportions relatives entre unités condensées et unités non condensées dont la définition a été rappelée plus haut.

Dans un premier temps, ils ont montré que les lignines MWL de Pin (*Picea jezoensis*) sont relativement plus riches en liaisons non condensées aryl-glycérol-β-aryl-éther (type A, *fig.* 2) que ne l'est le résidu des bois extraits (MATSUKUKA et SAKAKIBARA, 1971). De plus, mettant à profit une méthode originale d'hydrogénation catalytique MOROHOSHI et SAKAKIBARA ont observé que les liaisons C – C entre maillons propanes sont plus fréquentes dans les lignines de type MWL alors que les liaisons C – C de type diphényle sont relativement plus fréquentes dans les lignines de type LCC (MOROHOSHI et SAKAKIBARA, 1971 *a*).

Dans un second temps, analysant des bois de réaction, ces derniers auteurs ont trouvé une hétérogénéité de la fréquence des liaisons intermonomères en comparant les lignines de bois de réaction et celles de leur bois opposé. Dans le cas de Gymnosperme (*Abies sachalinensis*), le bois de réaction est plus riche en lignine, il contient moins de méthoxyle et de carbonyles conjugués et la fréquence des unités condensées est presque double de celle trouvée dans le bois opposé. Cette différence de degré de condensation n'a pas été observée par contre entre le bois de tension et le bois opposé d'Angiosperme (*Fraxinus mandschurica* var. *japonica*) (MOROHOSHI et SAKAKIBARA, 1971 *b* et *c*).

En conséquence, même si ces données ne permettent pas une analyse fine de l'hétérogénéité de la fréquence des liaisons, elles établissent de façon indiscutable l'existence de ce phénomène.

Par la suite, une analyse plus fine de ce type d'hétérogénéité a été rendue possible grâce à la mise au point d'une nouvelle méthode de dégradation des lignines par double oxydation. Le principe et les avantages de cette méthode ayant été discutés précédemment (MONTIES, 1980) il suffit ici de rappeler que, à l'aide de cette méthode, la lignine est caractérisée par les proportions relatives de huit acides aromatiques formés par dégradation ménagée des liaisons intermonomériques. Comparant les proportions relatives des acides correspondant aux monomères non condensés et aux diverses structures condensées les auteurs de la méthode ont conclu à une non

homogénéité de la structure de la lignine entre des plantes de genres différents et même de la lignine correspondant à différents organes d'une même plante (ERIKSON *et al.*, 1973). En conséquence, et bien que les rendements de dégradation des lignines soient de l'ordre de 50 à 75 %, ces résultats illustrent clairement l'importance du second type d'hétérogénéité des lignines (*fig.* 4).

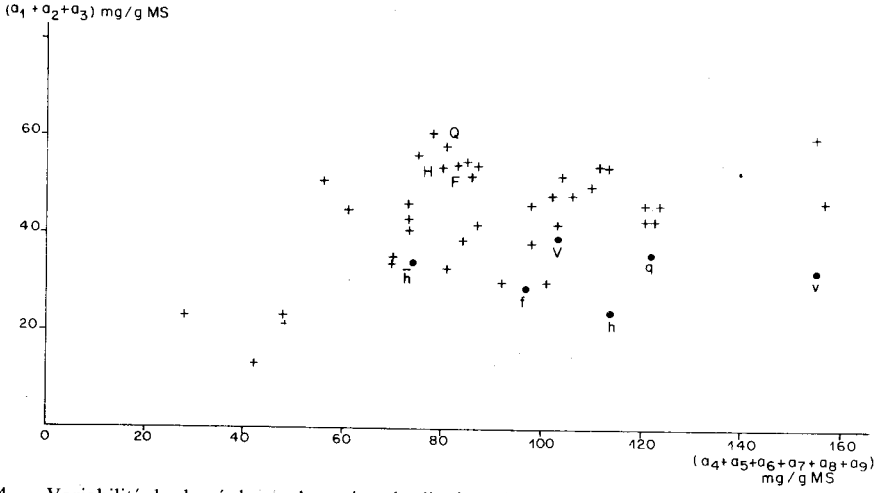


FIG. 4. — Variabilité du degré de condensation des lignines de Dicotylédones. Les teneurs en monomères non condensés et condensés, calculées d'après les résultats de ERICKSON *et al.* (1973), correspondant respectivement à $(a_1+a_2+a_3)$ et à $(a_4+a_5+a_6+a_7+a_8)$. Aux analyses des bois de *Quercus* (Q), de *Fraxinus* (F), de *Fagus* (H) et de *Vitis* (V) correspondent celles des lignines des écorces (lettres minuscules) et des racines (lettre minuscule surlignée).

— *Variation of the condensation degree in the dicotyledons lignins. The contents of condensed and non condensed monomers were calculated from* ERICKSON et al. (1973) *data;* $a_1+a_2+a_3$ *non condensed and* $(a_4+a_5+a_6+a_7+a_8)$ *condensed units respectively. Corresponding to data for* Quercus (Q), Fraxinus (F), Fagus (H) *and* Vitis (V) *woods are given data for barks lignins (small letters) and for root lignins (small overlined letter).*

Très récemment enfin l'existence d'une variabilité du degré de condensation des lignines a pu être confirmée par incorporation biosynthétique d'acide férulique doublement marqué sur son cycle aromatique par du ^{14}C et sur le carbone-5 par du tritium.

Après réactions de condensation des motifs gaïacyls, les variations du rapport des activités $^{3}H/^{14}C$ permettent l'estimation du degré de condensation sur le seul carbone-5 des noyaux gaïacyl. Utilisant cette méthode TOMIMURA *et al.* (1979 *a*) ont tout d'abord montré que chez le Pin (*Pinus thunbergii*) le bois de compression contient davantage de noyaux gaïacyl condensés; chez le Peuplier (*Populus X-euramericana* cv. I 214) la même analyse n'a pu être conduite à cause de la compétition des réactions de méthoxylation et de condensation sur le carbone-5. Dans un second temps une analyse plus fine de ce phénomène a été réalisée sur des tiges inclinées de quatre types d'arbres : ces résultats sont résumés dans le tableau V d'après TOMIMURA *et al.* (1980 *a*). Enfin ces mêmes auteurs ont montré que le degré de condensation des noyaux gaïacyl pouvait être modifié très significativement et de façon antagoniste chez les angiospermes et les gymnospermes par apport de substances de croissance (TOMIMURA *et al.*, 1979 *b*). Ces derniers résultats, résumés dans le tableau VI, permettent de constater que l'hétérogénéité induite par apport de substances de croissance est plus

TABLEAU V

Variation du degré de condensation des unités gaiacyl dans les bois de réaction de Gymnospermes (bois de compression du Gingko et du Pin) et d'Angiospermes (bois de tension du Peuplier et de l'Acacia).

Condensation degree variation of the guaiacyl units in reaction wood from gymnosperms (compression wood of gingko and pine) and from angiosperms (tension wood of poplar and robinia).

Le pourcentage de condensation (DC) est calculé en fonction du rapport de double marquage $^3H/^{14}C$ après incorporation d'acide férulique-5 ^3H-cycle $U^{14}C$ par des fragments de tiges maintenus inclinés à 45°; mesures faites sur 4 quadrants découpés après 72 h de survie.

Matériel	$^3H/^{14}C$ précurseur	Quadrant			
		Dessus	Latéral 1	Latéral 2	Dessous
Gingko biloba :					
$^3H/^{14}C$	3,57	1,79	1,85	1,75	1,72
DC (%)	–	50	49	51	52
Pinus thunbergii :					
$^3H/^{14}C$	3,03	1,45	1,49	1,41	1,14
DC (%)	–	52	51	51	62
Populus euramericana :					
$^3H/^{14}C$	3,57	1,79	1,75	1,79	1,82
DC (%)	–	50	51	50	50
Robinia pseudoaccacia :					
$^3H/^{14}C$	3,57	1,92	1,89	2,04	2,00
DC (%)	–	46	48	53	44

TABLEAU VI

Variation du degré de condensation des unités gaiacyl de bois d'une Gymnosperme (*Pinus thunbergii*) et d'une Angiosperme (*Nerium indicum*) en fonction de traitement hormonal pendant la survie.

Condensation degree variation of the guaicyl units of a gymnosperm (Pinus thunbergii) *and of an angiosperm* (Nerium indicum) *after treatments with growth substances.*

Le pourcentage de condensation (DC) est calculé en fonction du rapport de double marquage $^3H/^{14}C$ après incorporation d'acide férulique-5 ^3H-cycle-$U^{14}C$ par des fragments de tiges verticaux recevant le précurseur par le bas, et les hormones par le haut, après dispersion dans la lanoline (AIA : acide indolacétique; ABA : acide abscissique; témoin : lanoline seule).

Matériel	$^3H/^{14}C$ précurseur	Témoin	AIA	ABA
Pinus :				
$^3H/^{14}C$	3,57	1,55	0,90	2,15
DC (%)		57	75	40
Nerium :				
$^3H/^{14}C$	2,56	1,32	1,52	1,25
DC (%)		49	40	51

marquée que celle des bois de réaction puisque dans le premier cas un effet est aussi observable chez l'Angiosperme *Nerium indicum*.

Compte tenu de ces trois groupes de résultats, il paraît donc actuellement difficile de ne pas admettre l'existence d'une hétérogénéité de la fréquence des liaisons intermonomériques autant dans les différentes lignines de bois normaux que dans les bois anormaux induits par réaction à des stimuli exogènes.

C. Hétérogénéité de composition monomérique des lignines

Ce troisième type d'hétérogénéité est, depuis longtemps, le plus étudié même s'il reste encore relativement mal connu. Il a été surtout analysé par oxydation par le nitrobenzène alcalin. Or, cette méthode ne permet de caractériser que la fraction non condensée; de plus, son rendement, de l'ordre de 50 %, est variable selon les structures des liaisons intermonomères.

Malgré ces limites relatives, qui ont été discutées par ailleurs (MONTIES, 1980), cette méthode a été et est encore beaucoup utilisée. C'est grâce à elle que, dès 1944, il a été possible de démontrer la variabilité des proportions relatives des trois monomères de type H, G et S en fonction de la classification systématique des végétaux (CREIGHTON *et al.*, 1944). Une partie de ces résultats, résumés dans les tableaux VII et VIII, permet deux sortes de commentaires concernant d'une part la variabilité de plantes faisant exception à la classification, d'autre part la variabilité de la composition monomérique dans les divers tissus d'une même plante. Dans ces deux tableaux, la composition monomérique est exprimée au moyen du rapport s/v des rendements du syringaldéhyde (s) à la vanilline (v) qui sont représentatifs des monomères non condensés de type S et G respectivement.

TABLEAU VII

Variabilité de la composition monomérique des lignines en fonction de la classification des végétaux

Variability of the monomeric composition of lignins in relation to the systematic classification

La composition monomérique en unités non condensées a été estimée après oxydation par le nitrobenzène alcalin : teneurs exprimées en pourcentage de la matière sèche tant pour les aldéhydes *p*-hydroxybenzoïques (vanilline, v; syringaldéhyde, s) que la lignine de KLASON (LK). Résultats d'après CREIGHTON *et al.* (1944) (1) et SHIO et HIGUCHI (1978) (2).

Classification	LK (%)	Aldéhydes		Réaction de MAÜLE
		s+v (%LK)	s/v	
Gymnosperme :				
typique (1) . . .	25 à 35	15 à 24	0 (1)	–
Gnétacées (2). .	25 à 35	26 à 40	3	+
Angiosperme :				
typique (1). . . .	18 à 23	35 à 51	3	+
Winteracées (2).	30 à 35	30 à 33	1	+
Monocotylédone :				
typique (1). . . .	18 à 23	16 à 37	1 à 4	+

(1) Syringaldéhyde non détectable.

Les données du tableau VII montrent que, à la distinction classique entre Gymnospermes et Angiospermes typiques faite grâce à la réaction cytologique de MAÜLE, correspond une différence parallèle des valeurs v/s. Contrairement aux Angiospermes, les Gymnospermes ne contiennent pratiquement pas de monomères de type S. Dans les deux cas cependant, il existe des exceptions : certaines Gnétacées se comportent comme des Angiospermes et inversement des Angiospermes primitives (Wintéracées) ont des réactions de Gymnospermes. Ces différences, observées dès 1944, viennent d'être confirmées récemment par SHIO et HIGUCHI (1978) grâce à des méthodes d'analyse plus fines telles que la spectrométrie infrarouge et surtout l'acidolyse qui permet l'estimation du rapport S/G grâce à l'analyse de gaïacyl – et de syringyl-propanones formées spécifiquement à partir des monomères non condensés des structures aryl-alkyl éther β-O-4 ([1]).

Les données du tableau VIII illustrent la variabilité du rapport s/v en fonction de la nature des tissus provenant d'une même plante. Tant lors de la maturation du bois (formation du bois de cœur d'après CREIGHTON *et al.*, 1944) que lors de l'induction de bois de réaction (bois de tension des Angiospermes d'après BLAND et SCURFIELD, 1964) ou que dans différents tissus (tissu normal ou cultivé *in vitro* d'après VENVERLOO, 1969), on constate des différences très importantes des valeurs du rapport s/v.

Ces données permettent de supposer qu'il existe une hétérogénéité de la composition monomérique des lignines tant entre plantes différentes qu'entre les tissus d'une même plante. Il convient de rappeler cependant, que ces données ne concernent que les unités non condensées et donc que ces variations de s/v peuvent *a priori* résulter autant de réactions de condensation, affectant plus spécifiquement les noyaux gaïacyl sur le carbone-5, que des différences d'activité et d'incorporation biosynthétique des différents monomères.

Les variations du rapport s/v, en fonction de l'âge des tissus, sont à ce propos importantes à discuter. Les données de VENVERLOO (1969), présentées dans le tableau VIII, permettent de constater une augmentation du rapport s/v en fonction de l'âge du xylème. Cette évolution est généralement observée chez les Angiospermes mais une exception est connue, chez les Légumineuses, avec *Erythrina crista galli*. Cette Angiosperme se distingue par un rapport s/v voisin de zéro et une réaction de MAÜLE pratiquement nulle. En 1978, KUTZUKI et HIGUCHI ont montré que chez *Erythrina* le rapport s/v diminue avec l'âge (tableau VIII); ils ont attribué cet effet à des variations d'une enzyme participant à la conversion de l'acide férulique en acide sinapique : l'acide férulique-5-hydroxylase. Pour ce faire, ces auteurs ont comparé l'incorporation des acides férulique- et sinapique-^{14}C dans les unités non condensées de la lignine caractérisée par acidolyse. Le tableau IX résume ces résultats dans le cas de *Populus* et de *Erythrina*. On constate que chacun de ces acides est incorporé dans les monomères syringyl et gaïacyl et que le rapport d'incorporation β s/β v dans les unités syringyl et gaïacyl correspondantes dépend non seulement du type de plante mais encore de la nature du précurseur.

Ainsi, confirmant la possibilité d'une hétérogénéité de composition monomérique des lignines, ces derniers résultats illustrent, en plus, la complexité de ce phénomène. Il convient de remarquer à ce propos que d'autres facteurs ou d'autres mécanismes sont susceptibles d'affecter ce troisième type d'hétérogénéité.

C'est ainsi que des mécanismes enzymatiques différents, hydroxylases et O-méthyltransférases, ont été mis en cause pour expliquer l'existence de différences de

([1]) Les avantages et limites de cette méthode ont été discutés par ailleurs (MONTIES, 1980).

composition monomérique. Complétant les revues récentes consacrées à ces problèmes (SHIMADA, 1972; HIGUCHI *et al.*, 1977) on peut mentionner aussi les résultats de GRAND et RANJEVA (1979) qui attribuent un rôle important aux hydroxycinnamate-CoA ligases dans le contrôle qualitatif de la lignification chez le Peuplier.

TABLEAU VIII

Variabilité de la composition monomérique des lignines en fonction du type de tissus et de son âge

Variability of the monomeric composition of lignins in relation to the type and the age of the tissues

Teneurs exprimées en pourcentage de la matière sèche tant pour les lignines de KLASON (LK) et à l'acide thioglycolique (Lth) que pour les aldéhydes *p*-hydroxybenzoïques (v, vanilline; s, syringaldehyde), obtenus après oxydation par le nitrobenzène alcalin. Intensité des colorations : + nette, (+) faible, – non détectée. Résultats d'après CREIGHTON *et al.* 1944 (1), BLAND et SCURFIELD, 1964 (2), VENVERLOO, 1969 (3) et KUTZUKI et HIGUCHI, 1978 (4).

Matériel	Lignine totale	Produits d'oxydation		Réaction de MAÜLE
		TOTAL	s/v	
Acer rubrum (1)	(LK)	(% LK)		
bois de cœur	23,6	39,2	2,9	
aubier	20,6	44,5	3,7	
Eucalyptus camaldulenses (2)	(LK)	(% LK)	–	
tige verticale	22,7	42	2,6	
tige inclinée :				
bois de tension (dessus)	15,2	46	3,0	
bois opposé (dessous)	21,5	42	2,4	
Populus nigra (3)	(Lth)	(% Lth)		
xylème secondaire âgé	14	42	2,0	+
xylème secondaire jeune	4	27	1,1	+
xylème primaire	2	12	traces	–
phloème	8	15	0,9	+
périderme	9	13	0,2	(+)
culture tissu 2,4 D	1	18	0,6	+
culture tissu ANA	3	16	0,5	+
Erythrina crista galli (4) :				
xylème âgé	–	–	0,04	–
xylème jeune	–	–	0,15	(+)
parenchyme âgé	–	–	0,01	–
parenchyme jeune	–	–	0,10	(+)

De même parmi les facteurs affectant l'hétérogénéité de composition monomérique, qui ont fait l'objet d'études récentes, on peut citer l'âge des tissus. Confirmant les études modèles de HIGUCHI (1957) qui avait rapporté une augmentation du rapport s/v du haut vers le bas de tiges de Bambou, des observations analogues ont été faites sur des tiges de Canne de Provence *Arundo donax* (JOSELEAU *et al.*, 1977) et de jeunes Peupliers *Populus X-euramericana* cv. I 214 (GRAND et RANJEVA, 1979). Il est vraisemblable, d'après les résultats de VENVERLOO (tableau VIII), que ces variations

puissent résulter de variations qualitatives ou quantitatives de la composition tissulaire et donc, qu'elles ne sont pas nécessairement liées à des variations de composition monomérique des lignines.

TABLEAU IX

Incorporation des acides férulique et sinapique dans les monomères non condensés des lignines de type « Angiosperme » chez *Populus nigra* (Salicacée) et chez *Erythrina crista galli* (Légumineuse).

Incorporation of ferulic and sinapic acid in the non condensed monomers of the angiosperms lignins of Populus nigra (Salicaceae) *and of* Eythrina crista galli (Leguminosae).

Résultats exprimés en pourcentage de la radioactivité ^{14}C administrée sous forme d'acides férulique-2-^{14}C (FE) et sinapique-2-^{14}C (SI) et incorporée dans les alcools β-oxy-coniférylique (β G) et -sinapylique (β S) obtenus par acidolyse.

Précurseur incorporé	Résidu pariétal	Produits d'acidolyse			
		TOTAL	βS	βG	βS/βG
P. nigra :					
FE.	18,1	1,81	0,082	0,412	0,20
SI.	14,6	1,41	0,076	0,087	0,88
E. crista galli :					
FE.	56,5	4,11	0,086	0,263	0,33
SI.	13,6	1,41	0,075	0,028	2,7

Un second facteur affectant la composition monomérique des lignines a été étudié récemment par GRAND et RANJEVA (1979). Ces auteurs ont montré que le xylème de Peuplier incorpore la radioactivité d'un précurseur, la phénylalanine ^{14}C, dans les motifs gaïacyl et syringyl lorsque la survie a lieu à la lumière; au contraire, à l'obscurité, l'incorporation a lieu dans les seuls noyaux syringyls. Comme précédemment, ces résultats ne sont pas nécessairement liés à des variations de composition monomérique des lignines. On peut supposer en effet que le marquage de gaïacyl à la lumière résulte de la synthèse accélérée d'éléments vasculaires riches en lignine de type gaïacyl; la formation de vaisseaux sous éclairement a été observée dans le phloème de Carotte maintenu en survie (MIZUNO *et al.*, 1971). Quoiqu'il en soit l'influence de la photopériode sur le métabolisme des précurseurs dans les lignines ne fait pas de doute (TOMIMURA, 1980 *b*); de plus, il vient d'être rapporté que les lignines synthétisées sous éclairement continu sont plus difficilement biodégradées par les microorganismes que les lignines synthétisées sous photopériode normale (PHELAN *et al.*, 1979).

Comme les précédents, ces derniers résultats peuvent être expliqués *a priori* autant par une accumulation sélective des précurseurs dans des tissus particuliers que par une variation de la composition monomérique d'une fraction particulière de lignine.

En conséquence, l'ensemble de ces remarques conduit donc à rechercher des évidences de l'hétérogénéité de composition monomérique au niveau des parois isolées et des fractions de préparation de lignine.

Hétérogénéité monomérique dans les parois isolées

L'existence d'une hétérogénéité de composition monomérique dans des fragments de parois isolées a été rapportée récemment par HARDELL *et al.* (1980). Après avoir

désintégré mécaniquement du bois de Bouleau (*Betula verrucosa*), ces auteurs ont séparé par filtrations et centrifugations des fractions enrichies en paroi primaire et lamelle mitoyenne, en paroi secondaire, en rayons et en vaisseaux. La composition monomérique de ces fractions a été étudiée par combinaison de plusieurs microméthodes dont l'oxydation par le nitrobenzène. Confirmant les conclusions préliminaires obtenues par microspectrophotométrie par FERGUS et GORING (1970) et MUSHA et GORING (1975), ces auteurs ont constaté que la lignine des parois secondaires et des rayons est plus riche en motifs syringyls (rapport s/v de l'ordre de 3,0) alors que celle des parois primaires et des vaisseaux est relativement plus riche en motifs gaïacyls (rapport s/v de l'ordre de 1,5). Ces observations établissent donc pour la première fois, semble-t-il, de façon chimique, l'existence d'une hétérogénéité de composition monomérique des lignines dans les parois des cellules d'Angiospermes. De plus, ces observations permettent de supposer l'existence dans les Angiospermes de fractions de lignine relativement enrichies en motifs gaïacyl et syringyl; la justesse de cette hypothèse est confirmée par des publications récentes.

Hétérogénéité monomérique des fractions de lignine

L'isolement et la caractérisation d'une fraction de lignine riche en motifs syringyls à partir du bois d'Angiospermes différentes ont été rapportées en 1978 par YAMASAKI *et al.* Ces auteurs ont obtenu plusieurs fractions caractérisées par des rapports s/v compris entre 0,7 et 4,7. Compte tenu des méthodes mises en œuvre, on peut considérer que ce travail établit pour la première fois l'existence de lignine de type syringyl. Il convient de rappeler cependant que dès 1939, dans un travail rarement cité, LIEFF *et al.* ont très nettement montré l'existence de lignines de type gaïacyl et syringyl dans les Angiospermes et que, en 1952, BRAUNS avait, d'après ces résultats, supposé l'existence d'au moins deux types de lignines.

Combinant les observations de HARDELL *et al.* (1980) et les conclusions de ces trois groupes d'auteurs, il est actuellement tentant de décrire l'hétérogénéité de composition monomérique des lignines en admettant l'existence d'au moins deux types extrêmes de lignines : une lignine de type gaïacyl caractéristique des Gymnospermes et des parois primaires des Angiospermes, très pauvre en motifs syringyls et une lignine de type syringyl caractéristique des parois secondaires des Angiospermes typiques, très pauvre en motifs gaïacyls.

Quelques données récentes concernant le fractionnement des préparations de lignine ne sont pas incompatibles avec cette hypothèse. C'est ainsi que DOI *et al.* (1974) ont rapporté des différences allant du simple au double des rapports s/v de lignine de type MWL et de type LCC extraites successivement de bois ultramoulu de *Cercidiphyllum japonicum*. De même, utilisant un protocole de préparation différent de celui de DOI *et al.* (1974), nous avons pu isoler de bois ultramoulu de Peupliers (*Populus Trichocarpa* cv. *Fritzi* et *X. euramericana* cv. I 214) deux fractions de lignine dites LM, de type MWL, et LE, de type LCC. Ces fractions ont été caractérisées par des méthodes physiques (spectroscopie infrarouge, résonance nucléaire magnétique du ^{13}C) et chimiques (oxydation par le nitrobenzène et acidolyse). Toutes ces méthodes ont permis d'établir de façon concordante que la fraction LE est nettement plus riche en motifs syringyls que la fraction LM (MONTIES et LAPIERRE, 1980). Il est remarquable que dans ces deux derniers travaux les fractions de lignine les plus riches en motifs syringyls aient été celles de type LCC c'est-à-dire les plus étroitement associées aux polyosides. Compte tenu des observations de HARDELL *et al.* (1980), on peut supposer qu'elles sont originaires des parois secondaires.

Quelle que soit l'exactitude de cette dernière hypothèse, ces deux derniers groupes de résultats permettent d'affirmer l'existence d'une hétérogénéité de composition monomérique des lignines.

CONCLUSION

Après avoir dans une première partie envisagé les molécules modèles de lignine puis les préparations de lignines, il paraît raisonnable de conclure qu'il peut exister au moins trois types d'hétérogénéité dans les lignines : hétérogénéité de la composition monomérique, hétérogénéité de la fréquence des liaisons et, enfin, hétérogénéité par hétéropolymérisation qui est de loin la plus mal connue.

Il est incontestable que de grands progrès ont eu lieu durant ces 5 dernières années grâce à l'introduction ou à l'utilisation combinées de méthodes d'analyse souvent délicates à mettre en œuvre.

Il n'en demeure pas moins que beaucoup reste à faire dans le domaine de l'hétérogénéité et tout particulièrement dans celui de l'hétéropolymérisation. S'il est très vraisemblable que les différences de composition monomérique sont déterminées dans la plante, on ne peut exclure que des réarrangements puissent avoir lieu au niveau de certaines liaisons intermonomères et au niveau de l'hétéropolymérisation pendant le vieillissement des parois cellulaires ou le séchage des bois et des produits lignocellulosiques après récolte.

Même si elle paraît très difficile, l'analyse de ces phénomènes mérite d'être approfondie car elle pourrait être utile sur les plans théoriques et pratiques.

Remerciements

Les résultats originaux concernant la présence et le fractionnement des acides phénoliques (tableaux II, III, IV) ont été obtenus dans le cadre d'un contrat DGRST « Matériau Bois » entre 1976 et 1979 : contrats n°s 76-7-0550, 77-7-1138 et 78-7-2560.

BIBLIOGRAPHIE

BLAND D. E. et SCURFIELD G., 1964. — The chemistry of reaction wood IV. The distribution and nature of lignin in seedlings of hardwoods. *Holzforschung*, **18**, 161-166.

BRAUNS F. E., 1952. — The acylation and acylysis of lignin. In *The Chemistry of Lignin*. Academic Press, New York, 280-281.

CREIGHTON R. H. J., GIBBS R. D. et HIBBERT H., 1944. — Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. *J. Am. chem. Soc.*, **66**, 32-37.

DOI S., MOROHOSHI N. et HARAGUCHI T., 1974. — Properties of lignin in decayed wood. *Mokuzai Gakkaishi*, **20**, 230-237.

ERICKSON M., MIKSCHE G. R. et SOMFAI I., 1973. — Characterisierung der Lignine von Angiosperm durch oxydativen Abbau. *Holzforschung*, **27**, 113-117, **27**, 147-150, **28**, 135-138 et **28**, 157-159.

FERGUS B. J. et GORING D. A. I., 1970. — The localization of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue, *Holzforschung*, **24**, 113-117.

FREUDENBERG K., 1968. — The constitution and biosynthesis of lignin. In *Constitution and biosynthesis of lignin*, K. FREUDENBERG et A. C. NEISH, éd., Springer, Berlin, Heidelberg et New York, 44-122.

FRY S. C., 1979. — Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta*, **146**, 343-351.

GRAND D. et RANJEVA R., 1979. — La lignification chez le Peuplier. III. Variation du niveau d'activité d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des monomères en fonction du degré de lignification et de la nature des tissus. *Physiol. vég.*, **17**, 433-444.

HARDELL H. A., LEARY G. J., STOLL M. et WESTERMARK U., 1980. — Variations in lignin structure in defined morphological parts of birch. *Svensk Papperstdn*, **83**, 71-74.

HARRIS J. P. et HARTLEY R. D., 1976. — Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Graminae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature*, **259**, 508-510.

HARRIS J. P. et HARTLEY R. D., 1980. — Phenolic constituents of cell walls of monocotyledones, *Biochem. System. Ecol.*, **8**, 153-160.

HEMMINGSON J. A., LEARY G., MILLER I. J., THOMAS W. A. et WOODHOUSE A. D., 1978. — A new class of linkage between carbohydrates and lignin model compounds, *J. chem. Soc., Chem. Comm.*, 92-93.

HEMMINGSON J. A., 1979. — A new way of forming lignin carbohydrate bonds: etherification of model benzyl alcohols in alcohol water mixtures. *Austral. J. Chem.*, **32**, 225-229.

HIGUCHI T., 1957. — Biochemical studies on lignin formation. *Physiol. Plant.*, **10**, 633-648.

HIGUCHI T., SHIMADA M., NAKATSUBO F. et TANAHASHI M., 1977. — Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignin in woods. *Wood Sc. Technol.*, **11**, 153-167.

HIGUCHI, 1980. — Biochemistry of lignification, *Wood Research*, **66**, 1-16.

JOSELEAU J. P., MIKSCHE G. E. et YASUDA S., 1977. — Structural variation of *Arundo donax* lignin in relation to growth, *Holzforschung*, **31**, 19-20.

KATAYAMA Y., MOROHOSHI N. et HARAGUCHI T., 1980 *a*. — Formation of lignin carbohydrate complex in enzymatic dehydrogenation of coniferyl alcohol. I Dectection of acid hydrolysable linkage between D-glucose and dehydrogenation products of coniferyl alcohol. *Mokuzai Gakkaishi*, **26**, 358-362.

KATAYAMA Y., MOROHOSHI N. et HARAGUCHI T., 1980 *b*. — Formation of lignin carbohydrate complex in enzymatic dehydrogenation of coniferyl alcohol. II Isolation of lignin carbohydrate complex with guaiacyl-glycerol-β-coniferyl ether and other dimeric compound as lignin moiety. *Mokuzai Gakkaishi*, **26**, 414-420.

KUTZUKI H. et HIGUCHI T., 1978. — The formation of lignin of *Erythrina cristagalli. Mokuzai Gakkaishi.*, 24, 625-631.

LEARY G. J., 1980. — Quinone methides and the structure of lignin. *Wood Sc. Technol.*, **14**, 21-34.

LIEFF M., WRIGHT G. F. et HIBBERT H., 1939. — Studies on lignin and related compounds XL the extraction of birch lignin with formic acid. *J. Am. chem. Soc.*, **61**, 1477-1482.

MATSUKUKA M. et SAKAKIBARA A., 1971. — On the heterogeneous distribution of chemical structure in lignin. *Mokuzai Gakkaishi*, **15**, 35-39.

MIZUNO K., KOMAMINE A. et SHIMOKORIYAMA M., 1971. — Vessel formation in culture carrot root phloem slices. *Plant Cell Physiol.*, **12**, 823-830.

MONTIES B., 1977. — Variabilité structurale des lignines : estérification du cœur des lignines de Blé et de Peuplier par des acides phénoliques *Physiol. vég.*, **15**, 375.

MONTIES B., 1980. — Les lignines. In *Les Polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, MONTIES B., éd., Gauthier-Villars, Paris, 120-155.

MONTIES B. et LAPIERRE C., 1980. — Evidences of heterogeneity of lignin fractions isolated from Poplar wood. (Abstr. Comm. EUCHEM Symp. Lignin Chemistry, June 1980, Helsinki), *Kemia Kemi*, **9**, p. 490.

MOROHOSHI N. et SAKAKIBARA A., 1971 *a*. — On the distribution of condensed type in lignin: comparison of the lignin fractions of hydrogenolysis products in MWL, LCC and wood residue. *Mokuzai Gakkaishi*, **17**, 354-361.

MOROHOSHI N. et SAKAKIBARA A., 1971 *b*. — The chemical composition of reaction wood. I. *Mokuzai Gakkaishi*, **17**, 393-399.

MOROHSHI N. et SAKAKIBARA A., 1971 *c*. — The chemical composition of reaction wood. II. *Mokuzai Gakkaishi*, **17**, 400-404.

MUSHA Y. et GORING D. A. I., 1975. — Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Sc. Technol.*, **9**, 45-58.

NAKAMURA Y. et HIGUCHI T., 1976. — Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin. *Holzforschung*, **30**, 187-191.

NAKAMURA Y. et HIGUCHI T., 1978. — Ester linkage of *p*-coumaric acid in bamboo lignin. III. Dehydrogenative polymerisation of coniferyl *p*-hydroxybenzoate and coniferyl *p*-coumarate. *Cell. Chem. Technol.*, **12**, 209-211.

PLA F., 1980. — Étude de la structure macromoléculaire des lignines. *Thèse Doct. Etat*, Université scientifique et médicale de Grenoble.

PHELAN M., CRAWFORD D. L. et POMETTO A. L., 1979. — Isolation of lignocellulose decomposing actinomycetes and degradation of specifically ^{14}C labelled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* Strains. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 1270-1276.

SARKANEN K. V., 1971. — Lignin precursors and their polymerisation in *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*, K. V. SARKANEN et CH. LUDWIG, éd., Wiley Interscience, 150-155.

SCHWEERS W. et FAIX O., 1973. — Vergleichende Untersuchungen an Polymermodellen des Lignines (DHP's) verschiedener Zusammensetzungen *Holzforschung*, **27**, 208-113, **28**, 45-50, **28**, 50-54, **28**, 94-98, **28**, 179-185, **29**, 48-55 et **28**, 224-229.

SHIMADA M., 1972. — Biochemical studies on bamboo lignin and methoxylation in hardwood and softwood lignins. *Wood Research*, **53**, 19-65.

SHIO T. et HIGUCHI T., 1978. — Studies on the lignins of *Podocarpus*, *Gnetum*, *Drimys* and *Pseudowinteria*. *Wood Research*, **63**, 1-10.

SMITH D. C., 1955 *a*. — Ester groups in lignin, *Nature*, **176**, 267-268.

SMITH D. C., 1955 *b*. — *p*-hydroxybenzoate groups in the lignin of Aspen (*Populus tremula*). *J. Chem. Soc.*, 2347-2351.

TANAHASHI M., TAKEUCHI H. et HIGUCHI T.,1976. — Dehydrogenative polymerisation of 3,5 disubstituted *p*-coumaryl alcohols. *Wood Research*, **61**, 44-53.

TANAKA K., NAKATSUBO F. et HIGUCHI T., 1976. — Reactions between guaiacylglycerol-β-guaiacylether and several sugars. I. reaction of quinonemethide with D-glucuronic acid. *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 653-659.

TANAKA K., NAKATSUBO F. et HIGUCHI T., 1979. — Reactions between guaiacylglycerol-β-guaiacylether and several sugars. II. reaction of quinonemethide with pyranohexoses. *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 653-659.

TERASHIMA N., OKADA M. et TOMIMURA Y., 1979. — Heterogeneity in formation of lignin. I. Heterogeneous incorporation of *p*-hydroxybenzoic acid into poplar lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 422-426.

TOMIMURA Y. et TERASHIMA N., 1979. — Heterogeneity in formation of lignin. II. Incorporation of side chain and methoxyl carbon of ferulic acid into lignin in tree xylem. *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 427-430.

TOMIMURA Y., YOKOI T. et TERASHIMA N., 1979 *a*. — Heterogeneity in formation of lignin. III. Formation of condensed type structure with bond at position 5 of guaiacyl nucleus, *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 595-599.

TOMIMURA Y., YOKOI T. et TERASHIMA N., 1979 *b*. — Heterogeneity in formation of lignin. IV. Various factors which influence the degree of condensation at position 5 of guaiacyl nucleus. *Mokuzai Gakkaishi*, **25**, 743-748.

TOMIMURA Y., YOKOI T. et TERASHIMA N., 1980 *a*. — Heterogeneity in formation of lignin. V. Degree of condensation in guaiacyl nucleus. *Mokuzai Gakkaishi*, **36**, 36-42.

TOMIMURA Y., SASAO Y., YOKOI T. et TERASHIMA N., 1980 *b*. – Heterogeneity of lignin. VI. Selective labelling of guaiacyl-syringyl lignin. *Mokuzai Gakkaishi*, **26**, 558-563.

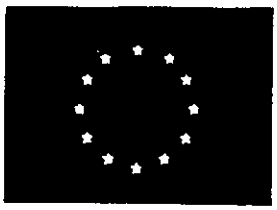
VENVERLOO C. J., 1971. – The lignin of *Populus nigra* L. cv. "Italica" and some other salicaceae. *Holzforschung*, **25**, 18-24.

VENVERLOO C. J., 1969. – The lignin of *Populus nigra* L., a comparative study of the lignified structures in tissue cultures and tissues of the tree. *Acta Bot. Neerl.*, **18**, 241-314.

YAMASAKI T., HATA R. et HIGUCHI T., 1978 *a*. – Separation of s-DHP from a mixture of c- and s-DHPs with special reference to the isolation of a syringyl lignin. *Holzforschung*, **32**, 20-23.

YAMASAKI T., HATA K. et HIGUCHI T., 1978 *b*. – Isolation and characterization of syringyl component rich lignin, *Holzforschung*, **32**, 44-47.

YAN J. F. et JOHNSON D. C., 1980. – Molecular weight distribution in the lignin sol. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 850-855.



European Commission

COST 92
Metabolic and
physiological aspects
of dietary fibre in food

Recent progress in the analysis of dietary fibre

Proceedings of a workshop held on
28 and 29 October, 1994
in Copenhagen (Vedbæk), Denmark

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

1995

THE DETERMINATION OF LIGNINS : QUANTITATIVE AND QUALITATIVE APPROACHES

B. MONTIES

Laboratoire de Chimie biologique (INRA)
Institut National Agronomique Paris-Grignon - Centre de Grignon
78850 Thiverval-Grignon
France

clic here for the next

SUMMARY

Chemical methods for characterization of the molecular structure and the content of lignin in "native" and "industrial" lignocellulosic products are critically reviewed. Analytical difficulties of lignin analysis are exemplified in the case of the characterization of residual lignin in chemical pulps and concerning the determination of lignin content and monomeric composition in samples from different botanical origins and from transgenic plants or mutants. The significance of "native" and "transformed" lignins is then discussed in relation to their general biodegradability. Chemical characterization of lignin is finally discussed emphasizing three main topics: cytochemical determination according aromatic aldehydes detection, monomeric composition analysis including the relative interest of some solvolytic and oxidative procedures and finally determination of lignin content based on UV spectrophotometry and gravimetric determinations.
It is concluded that the solvolytic procedures which allow a selective depolymerization of lignins and determinations of corresponding "lignols" are particularly well adapted for both qualitative and quantitative assessment of the lignin structure, qualities and contents.

1. INTRODUCTION : SOME EXAMPLES OF ANALYTICAL DIFFICULTIES

Qualitative characterization of molecular structure of lignins and quantitative determination of lignin content have been recognized since a long time as a difficult task even in the case of in situ "natural" lignin from woods and herbaceous plants (1). These tasks become even more difficult, when such characterizations are to be done on "industrial" products, such as cellulosic fibre for paper and dietary fibre, or on chemically and biologically "transformed" materials. These difficulties arise mainly from the fact that the molecular structure and reactivity of lignins are even now relatively poor known not only, as macromolecules, in the case of "native" samples but especially, in the case of "industrial" products and materials. The reasons are that the macromolecular physico-chemical properties, the reactivity of the characteristic functional groups, the molecular structure and even the monomeric composition of the residual lignin remaining after these industrial treatments can be specifically changed.

The characterization of residual lignin in the chemical pulps can be chosen as a first example, to enlighten these difficulties.
More than twenty years ago, the possibility to determine the content of residual lignins in these pulps was discussed by MARTON (2), who emphasized the interest of both infrared and ultraviolet spectroscopy taking into account the structural feature of kraft lignin.
At the present time, and even when the chemistry of the alkaline delignification of wood has been studied more in detail (3), investigations of the residual lignin in chemical pulps require elaborated combinations of analytical procedures not only for isolation after enzymatic or solvent extractions respectively (4,5), but also for determination of total content, including acid - or alkali - soluble fractions, but excluding sugar, polysaccharides and even proteins (4). Further attempts to describe the molecular structure of residual lignin involving combinations of sophisticated acidolytic depolymerization procedures (6), nuclear magnetic spectroscopy experiments (7) and gel permeation chromatography (8) have until now provided significant information which however are not enough specific and precise, to allow any unambiguous determination of any accurate content in "residual lignin".
A second example of such difficulties can be found in relation to the biological variability of lignification, which has been extensively studied in this INRA laboratory (9). This variability deserve a special attention in relation to the growing interest to produce fibre, both for dietary use and for production of paper, from selected plant cultivars or clone, from mutants or from obtained transgenic lines. Indeed, natural and/or induced differences in chemical structure of lignin seem occasionally large enough to effect the specificity and thus the accuracy of the current analytical methods.
This is, for example, the case for the variability of the monomeric composition of lignins in relation to the determination of "lignin content" using sulphuric acid reagent according to the reference Klason lignin (KL) procedure. Again, about twenty years ago, a strong correlation was found between the monomeric composition of lignin, as expressed by the ratio methoxyl groups per monomeric units which measure their content in dimethoxylated syringyl units, and the formation of an acid soluble lignin fraction (ASL). This fraction which ranged from about 10 to 30% of the Klason lignin in the woods of Angiosperm (10) has not been taken currently into account when using the reference KL procedure. Even, at present time, calculations of the "total" lignin content, by addition of KL and ASL, have seldom been reported even when a large natural variability in the monomeric composition of Angiosperm lignin has been described in the absolute and relative content in syringyl monomeric units (9-11). Taking into account such biological variability can be particularly relevant when characterizing transformed products or plant material collected at different stages of maturity: large changes in syringyl to guaiacyl ratio (S/G) susceptible to affect the "total lignin" determination, have been described for example after wood degradation by fungi (12) or during the development of plants and the biosynthesis of lignin (13,14). Furthermore, other changes in the molecular structure and thus, in the reactivity of lignins, cannot be excluded in the case of mutants and transgenic plants. Such variations, which in some case require specific adaptation of the analytical procedures, have been recently reported in the case of the brown midrib (b.m.) mutants of Maïze indicating changes in alkali solubility and monomeric composition of lignin (15).

Correlated changes were even found between the monomeric composition of lignin and the content in cell wall linked phenolic acids, particularly between syringyl units and p-coumaric acid, during the development of the internodes of the Maïze stem (16). Further in the case of transgenic Tobacco manipulated for the lignin biosynthesis pathway, a new and unusual monomer: 5-hydroxyguaiacyl, has been found (17), which has been described, for the first time in a **b.m.** mutant of Maïze (18) and was also recently reported in the corresponding **b.m.** mutants of Sorghum (19).
Providing a third illustration of the specific analytical difficulties encountered, one have to stress that this unusual type of lignin monomeric unit, characterized by the 4,5-**ortho**-diphenolic functionality cannot be detected as lignin monomeric unit when using any oxidative depolymerisation procedure, such as for example nitrobenzene oxidation, as, such *o*-diphenols are oxidatively transformed during this reaction. The absence of 5-hydroxyvanillin among the nitrobenzene oxidation products of Arabidopsis mutants recently reported (20), could be likely, related to this phenomenon. At the opposite, non oxidative procedure such as thioacidolysis, allows the identification of such orthodiphenols corresponding not only to the syringyl monomers in "native" lignins but also, to the guaiacyl monomers and corresponding catechol structure in "industrial" lignins and corresponding pulps and fibre (21).
Finally, a last and clearer illustration of such analytical difficulties to characterize lignin can be found in the identification of chromophore and/or specifically reactive functionalities in lignins. This is the case for the origin of the yellow colour and the photoyellowing of industrial pulps and cellulosic fibre (22), but also for the reddish colour, specifically associated with the xylem cell wall component of plants genetically manipulated for lignin biosynthesis (23,24). In both cases, the large number of possible chromophoric grouping, associated with their low relative chromophoric contents, their low relative concentration, and also their frequently high chemical reactivity impeded, until now, any rapid and unambiguous identification of the corresponding chemical structure.

2. DIETARY FIBRE AND LIGNINS : A MATER OF DEFINITIONS

Considering now more specifically the dietary fibre (DF), one assume as a "standard" physiological definition that "DF are components of plant materials in the diet which are resistant to digestion in the gastrointestinal tract " (25). Chemically, DF include thus, various amounts of not only, "natural components"; such as cell-wall and non-cell-wall polymers, but also "transformation products" such as denatured starches, and cooking reaction compounds. Indeed, "in situ" lignins, lignin like polymers and industrial lignins are well known to be degraded by only few species of fungi (26) and bacteria (27); they appear to be resistant to digestion even in rumen ecosystem (28) and thus can be classified as dietary fibre. As however, lignin biodegradation can be induced oxidatively (26,27) with, in some cases, subtle changes in macromolecular properties without total degradation of the whole macromolecule to CO_2 (29), care has to be taken, for possible metabolism of, for example, "transformed" - or "predigested" - lignin dietary fibre, even in the anaerobic conditions of the animal tract.
In combination to the possible solubilization of cell wall phenolics suggested to occur

in these conditions (28), studies of such metabolisms requires both specific and accurate analytical assessment of what is defined as lignins in "dietary fibre".

3. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF LIGNINS : THREE POINTS OF VIEW

This presentation being necessarily brief, only few topics will be discussed using as references previous articles and reviews (29,30) and particularly, two authoritative books (31,32), in which experimental procedures and analytical methods have been critically reviewed. Stressing the potential variability of fibre lignins, only cytochemistry, monomeric composition and content determination will be discussed, referring to the smallest number of publications.

3.1 From cytochemical point of view, lignins are usually defined as "forming reddish colour after reaction with acid phloroglucinol; this reaction has been used to determine the amount of cinnamaldehyde units in native lignins" (31). This colour reaction has been used frequently to provide a determination of the lignin content not only in "native" but also in "transformed" lignified products such as fibre. Care has to be taken on the specificity of this colour-reaction with other carbonyl functionalities. Further, as most of the aldehydes can be easily destroyed after many chemical reactions (acid-bases, oxido-reduction, ..) care has also to be taken on the history of the DF to be analyzed in this respect. The disappearance of this colour reaction has been observed after mild pretreatment of poplar wood (33) and wheat straw (unpublished) even when only few percent of the total lignin was extracted as shown by combined chemical analysis. That the use of such lignin staining was thought to be of limited value for predicting cell wall digestibility of forages fibre (34), is likely related to this fact. Further, in the case of industrial products, the formation of such types of aromatic aldehydes has been reported after mild oxidations or after heating (35), strengthening the previous injunctions of wisdom (1,30).

3.2 From monomeric composition point of view, lignins have been defined as "macromolecules in which phenylpropane monomers are mainly linked by aryl-alkyl-ether (A.A.E) chemical bounds" (1,30), providing operational possibilities for both identification and quantification of lignins among lignin like polymers.
Acidolysis and thioacidolysis (21,31), allowing to depolymerize lignin with recovery of solvolytic products whose substitution pattern are characteristic of the A.A.E linkages (21), provide these two possibilities, as recently shown in the case of lignin like phenolic fraction from suberin (36). Further, the quantitative estimation of these solvolysis products allow to calculate relative yields of depolymerisation, which are representative of the content and the molecular composition of any lignin fractions. Indeed, the relative content in monomeric-, dimeric-, trimeric-,..., oligomeric- "lignols" (37), occurring in lignins can be determined using such fractional solvolysis. In this prospect, care has to be taken to control the reproducibility and to evaluate the recovery yields of these solvolysis products, as previously discussed. Whatever may be, such quantitative depolymerization procedure seems to provide, at present, the most accurate

possibilities for both qualitative and quantitative evaluation of lignins in both "natural" and 'transformed" lignocellulosic products or fibre, as emphasized in the introduction. More than twenty years ago such views have been perspicaciously indicated by NIMZ (37) who chosed thioacetic acid for partial depolymerization of lignin. In fact many other reagents such as alcohols, glycols or thiols have been used for both quantitative (13) and qualitative (38) solvolysis, without being fully evaluated for such quantitative possibilities. For example, detergents or thioglycolic acid have been frequently used for lignin content determination; possibilities of formation and losses of soluble solvolysis fractions (S.S.F) of lignin have been unfrequently discussed (13). Finally, with reference to these solvolytic procedures of lignin depolymerization which preserve the phenylpropane structure of the monomeric units, one have to underline that oxidative methods, such as alkaline nitrobenzene or cupric oxidations (31,32) suffer a main limitation to destroy most of the phenylpropane units, providing thus less accurate identifications of lignins (30,36). Further, changes in the conditions of oxidation (time and temperature) have been shown to induce significant variations in the recovery yields of the corresponding monomeric units. Such phenomenon, which has been accounted to optimize the analytical procedure (13), could be also relevant when characterizing dietary fibre from different origins. Recently, such variations have been observed in the case of lignin fraction from grasses, indicating that the oxidative degradation of the phenolic monomers occurred according to a kinetic which was different for the corresponding phenyl, guaiacyl and syringyl monomers (39).

3.3 From "total" content determination point of view, lignins can be defined as "aromatic polymers, insoluble in water and closely associated to the cell-wall matrix", thus particularly fitted for spectroscopic and gravimetric determinations (11,30).
Merely from the aromatic structure of its lignols constitutive units and their corresponding strong and relatively specific ultraviolet (UV) absorbances, lignin contents have been estimated by UV spectroscopy after solubilization. Standardized procedures have been critically evaluated stressing the need of complete "solubilization" of the cell wall components, without formation of non-lignin UV absorbing compounds (32); the most critical factor being their reliability due to the occurrence of large differences in the absorbing coefficients, according to the nature and the history of the samples (31). Indeed these differences could be particularly large and relevant in the case of "transformed" fibre, with reference to the effects of industrial processes but also, in the case of any solubilized fractions such as any "S.S.F", as previously discussed. Further, such differences could be also relevant in the case of "natural" fibre in which, according to their botanical origin (9,31), strongly UV absorbing phenolic acids occur as chemically linked components of the cell walls and of lignin fractions. At our knowledge, no systematic evaluation of such changes in absorptivity coefficient has been published, even in the case of cereals products such as brans and straw fibre. Recently, new procedures for the determination of these phenolic acids have been reported (40,41), allowing extended determination of the total contents, after chromatographic separation of the corresponding individual components: the monomeric phenolic acids. Due to the occurrence of the corresponding dimeric and likely oligomeric derivatives of these phenolic acids, it would be interesting to combine these procedures with milder solvolytic methods, in order to provide more representative and more accurate figure

based on the quantitative determinations of individual components, as previously suggested for the "lignols" (§§ **3.2**). By using such a procedure, it would be possible to determine the absorptivity of each fraction being analyzed, granting, at least in part and indirectly, the "not practicable" requirement expressed by DENCE (31) "to determine the absorptivity for each sample being analyzed".
Finally, concerning the gravimetric determinations of lignins which, at present, remain the reference procedure, the same type of limitations, in accuracy and sometime in precision, have been underlined in relation to the variability of the Insoluble Residue "IR" recovered and defined as "lignin" (1,31,32). As emphasized in the introduction and confirming the necessity to take into account any solvolysis soluble lignin fractions (1,10,30,42), the systematic occurrence of such "solubilization" has been recently reported after acid detergent determinations (43,44). Bringing these last data together with the selective formation of acid soluble lignins (§§ **1**) and the formation of S.S.F according to the many solvolytic mechanism of lignins (§§ **3.1**), one can suggest that, whatever the analytical procedure chosen, the disorganisation of the lignocellulosic structure and associated lignins, induces the formation of both **insoluble-**, as "repolymerized", and **soluble-**, as "solvated", products. This is the case not only during acidolysis and thioacidolysis in organic solvents (21,31) but also during the various acid solvolysis in water corresponding to the "Klason" or the "acid insoluble" types of lignin determination (30,31,42). This is also, very likely the case for the "glycol" or "detergent" determinations of the dietary fibre and their associated lignins.

4. CONCLUSIONS

Concerning the determination of the "total lignin" content, in both the natural and industrial lignocellulosic products and fibres, one could emphasize a need of analysis summing up soluble and insoluble fractions. Such approach which even now seems very difficult and tedious, has been only unusually attempted (45).
Considering now the determination of representative lignin fractions and the availability of standardized fractionation procedures of lignins (31), any solvolytic procedure could seem fitted for use when combined with a gravimetric determination of an Insoluble Residue and a careful assessment of the possible losses and coprecipitations. In order to be reliable, such procedure have to be optimized for each sample being analyzed.
Furthermore, the possibility to prepare, by use of some of these standardized acidolytic procedures, defined lignin fractions, from monomers to small oligomers, associated with the possibility to separate and quantify their contents by High Performance Chromatography, seems to allow new paths combining quantitative and qualitative determination of the solubilized fractions. As previously discussed (21), thioacidolysis provides one of these pathways as it can be applied for the specific identification of lignins in very different lignocellulosic compounds. Acidolysis, thiolysis or aminolysis procedures could also be, however, investigated in this respect, with the aim to provide a complementary evaluation of the Insoluble Residue. In this respect gel permeation chromatography could be associated to characterize the oligomeric fractions as previously shown (29,32,46). In spite of such procedures could require lengthy and sometime sophisticated adaptations, they seems to be particularly fitted to provide data

on the contents and the molecular structure of lignin, which are required to characterize the potential biological properties of dietary fibre.

REFERENCES

(1) LAI, Y.Z. and SARKANEN, K.V., "Lignins: occurrence, formation, structure and reactions", SARKANEN, K.V. and LUDWIG, C.H. (ed.), Wiley-Interscience pub., 1971, Chapter 5, p.190.

(2) MARTON, J. in Ref (1), Chapter 16, p. 681.

(3) GIERER, J., Wood Sci. Technol., 1985, 19, 289.

(4) HORTLING, B., RANUA, M. and SUNDQUIST, Nordic Pulp Paper Res. J., 1990, 5, 33.

(5) ISOGAI, A., ISHIZU, A. and NAKANO, J., J. Wood Chem. Technol., 1987, 7, 311.

(6) GELLERSTEDT, G., LINDFORS, E.L., LAPIERRE, C. and MONTIES, B. Svensk Papperstind., 1984, 87, R61.

(7) FUKAGAWA, N., MESHITSUKA, G. and ISHIZU, A., J. Wood Chem. Technol., 1992, 12, 425.

(8) MLYNAR, J. and KOSIKOVA, B., J. Wood Chem. Technol., 1992, 12, 261.

(9) MONTIES, B. Proceed 6th International Symposium on Wood and Pulping Chem., I.S.W.P.C. Melbourne, Australia, APPITA pub., 1991, vol.1, 119.

(10) MUSHA, Y. and GORING, D.A.I., Wood Science, 1974, 7, 133.

(11) FENGEL, D. and WEGENER, G., "Wood: chemistry, ultrastructure, reactions", WALTER de GRUYTER (ed.), 1984, Chap. 6, 4, p.151.

(12) AGOSIN, E., BLANCHETTE, R.A., SILVA, H. and LAPIERRE, C., Applied Envir. Microbiol., 1990, 56, 65.

(13) VENVERLOO, C., Acta Bot. Neerl., 1969, 18, 241.

(14) KUTZUKI, H., HIGUCHI, T., Mokuzai Gak., 1978, 24, 625.

(15) CHABBERT, B., TOLLIER, M.T. and MONTIES, B., J. Sci. Food Agric., 1994, 64, 455.

(16 CHABBERT, B., TOLLIER, M.T. and MONTIES, B., J. Sci. Food Agric., 1994, 64, 349.

(17) MONTIES, B., TOLLIER, M.T., CHABBERT, B., LAPIERRE, C., LEGRAND, M., FAVET, N., ATASANOVA, R., MARTZ, F. and FRITIG, B., Proceed 4th Internat. Cong. Plant Molec. Biol., Amsterdam, 1994, Book Abstracts: 10-1, No. 1840.

(18) LAPIERRE, C., TOLLIER, M.T. and MONTIES, B., C.R. Acad. Sci., Paris, 1988, 37, III, p. 723.

(19) CHABBERT, B., TOLLIER, M.T. and MONTIES, B., Proceed 7th Internat. Symp. Wood Pulping Chem., ISWPC, Beijing, China, CTAPI, pub., vol.1, p.462.

(20) CHAPPLE, C.S., VOGT, T., ELLIS, B.E. and SOMMERVILLE, C.R., The Plant cell., 1992, 4, 1413.

(21) ROLANDO, C., MONTIES, B. and LAPIERRE, C., "Methods in Lignin Chemistry", LIN, S.Y. and DENCE, C.W. (eds), Springer (pub.) Chap. 6.4, 334.

(22) HIRASHIMA, H. and SUMIMOTO, M., TAPPI, J., 1994, 77, 146.

(23) TOLLIER, M.T., CHABBERT, C., LAPIERRE, C., MONTIES, B., FRANCESH, C., ROLANDO, C., JOUANIN, L., CORNU, D., BAUCHER, M., and INZE, D., Polyphénols 94, Palma de Mallorca (Spain) May 23-27 - INRA edit - Collogues 69 - p. 339.
(24) HIGUCHI, T., ITO, T. and UMEZAWA, T., J. Biotechnol., 1994, 37, 151.
(25) SOUTHGATE, D.A.T., Marabou Food and Fibre Symp., Nutritional Rev., 1977, 35, and related papers - discussions: p. 1-72.
(26) BAAR, D.P. and AUST, S.D., Environ. Sci. Technol., 1994, 28, 79A.
(27) ZIMMERMAN, W., J. Biotechnol., 1990, 13, 119.
(28) AKIN, D.E. and BORMEMAN, W.S., J. Dairy Sci., 1990, 73, 3023.
(29) MONTIES, B., FEMS, Microbiol. Rev., 1994, 13, 277.
(30) MONTIES, B., "Methods in Plant Biochemistry", HARBORNE, J.B. (ed.), Academic Press pub., 1989, Vol. 1, Chap. 4, p.113..
(31) LIN, S.Y. and DENCE, C.W., "Methods in Lignin Chemistry", Springer pub., 1992, p. 578
(32) WOOD, W.A. and KELLOGG, S.T., "Methods in Enzymology, vol. 161, Biomass part B, Lignin, pectin, chitin", 1988, p. 1-326.
(33) CZANINSKI, Y., MONTIES, B., REIS, D. and CATESSON, A.M., I.A.W.A. Bull.n.s., 1987, 8, 310.
(34) CONE, J.W. and ENGELS, F.M., J. Agric. Sci. (Cambridge), 1990, 114, 207.
(35) MONTIES, B., J. Internat. Sciences Vigne et Vin, 1987, 21, 39.
(36) BORG-OLIVIER, O. and MONTIES, B., Phytochem., 1993, 32, 601.
(37) NIMZ, H., Angew. Chem. Internat. Edit., 1974, 13, 313.
(38) MOROMOSHI, N. and GLASSER, W.G., Wood Sci. Technol., 1979, 13, 165.
(39) BILLA, E., TOLLIER, M.T. and MONTIES, B. (to be published).
(40) BACH-TUYET, T.B., IIYAMA, K. and STONE, B.A., Phytochem., 1994, 36, 773.
(41) PROVAN, G.J., SCOBBIE, L. and CHESSON, A., J. Sci. Food Agric., 1994, 64 (in press).
(42) MONTIES, B., Agronomie, 1984, 4, 387.
(43) HATFIELD, R.D., JUNG, H.J., RALPH, J. and BUXTON, D.R., J. Sci. Food Agric., 1994, 65, 51.
(44) LOWRY, J.B., CONLAN, L.L., SCHLINK, A.C. and Mc SWEENEY, C.S., J. Sci. Food Agric., 1994, 65, 41.
(45) SMELTORIUS, J.A., Holzforschung, 1971, 25, 33.
(46) PASCO, M.F. and SUCKLING, I.D., Holzforschung, 1994, 48, 501.

13

Variability in the lignification of plant cell walls in relation to production of cellulosic fibres

B. Monties

13.1 INTRODUCTION

Plant cell walls are characterized by the occurrence of linked phenolic compounds such as lignin and related phenolic acids. The structure, and thus the reactivity of these phenolics, varies according to many factors such as plant species and conditions of plant development. This heterogeneity of the cell wall phenolic acids profoundly affects the biological and physico-chemical properties of plant organs such as stems and leaves. Furthermore, occurrence of these phenolics determines the efficiency of isolation of the cellulosic fibres which are the characteristic strengthening elements of not only *in situ* plant cell walls but also fibrous products such as papers and boards (Monties, 1989a, 1991a).

Occurrence of variations in lignification pattern (lignin content and composition) and in cellulosic fibre morphology has been reported in relation to genetic and phenotypic conditions of development (Fahn, 1982; Fujita and Harada, 1991). The effects of such variations on fibre production and the quality of products (plant cell wall digestibility, mechanical strength of plant organs, and the paper-making properties of fibres from both trees and crops) have also been reported. This chapter summarizes these data with emphasis on the possibility of manipulating lignification of plant cell walls and with the aim of improving both production and fibre quality.

New Crops for Temperate Regions. Edited by K. R. M. Anthony, J. Meadley and G. Röbbelen. Published in 1993 by Chapman & Hall, London. ISBN 0 412 48020 4

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - Part 1

13.2 CELL WALL-LINKED PHENOLICS AND CELLULOSIC FIBRES

Cellulosic fibres occur in different types of plant tissues such as xylem, phloem and sclerenchyma (Fahn, 1982). However, from an industrial point of view, cellulosic fibres may correspond to 'fibres' or individual cells isolated from these plant tissues; or to 'bundles', which correspond to partially dissociated fibre (cells); or even to 'cellulosic fibrils', which correspond to associated polymeric cellulose chains.

Three main types of practical criteria can be used to classify interest in the plant fibres.

1. An industrial one related to production of cellulosic materials, mainly papers, by pulping processes.
2. An agricultural one corresponding to digestibility of plant cell walls and fibres by animals and by humans.
3. A biological one related to the mechanical properties of the plant organs, stems and leaves for example.

Several morphological, anatomical, physical and chemical parameters, summarized in Table 13.1, have been defined to describe plant fibres and to predict their technical properties mainly on an empirical basis. As has been clearly emphasized by Van Soest (1964), in the case of digestibility of plant cell walls, the danger facing such empirical studies is the promotion of inadequate methods and theories by persons who are overanxious to produce practical, low-cost and routine tests without a critical evaluation of their limitations. In this respect, chemistry is faced with the very difficult challenge of contributing to the explanation of these properties of fibres and materials at a molecular level.

In the case of cell wall-linked phenolics such as phenolic acids and lignins, the main difficulty is to account for the high reactivity of phenolic compounds which allows, as previously reviewed by Monties (1989a), formation and rearrangement of polymeric networks by molecular association with other cell wall components, such as polysaccharides and proteins.

Illustrating this chemical challenge, some well-recognized consequences of the variability in the cell wall-linked phenolic compounds will be discussed in relation to these three main types of practical interest.

13.2.1 Cell wall-linked phenolics and pulping processes

With respect to the production of paper-making fibres by the chemical alkaline, or 'kraft', pulping process, Chang and Sarkanen (1973) have

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

Table 13.1 Current technical parameters defined for plant fibre characterizatic

Rough content	total yield (weight percent) NDF (neutral detergent fibres)[a] ADF (Acid detergent fibres)[a]
Anatomy	tissue area (surface percent) fibre length, diameter stiffness, curling
Physico-mechanical	tensile modulus (tissue fraction, fibre fracture strength, brittleness surface activity (tension, adhesion) water retention value porosity
Chemical	supramolecular order (architecture) macromolecular structure molecular composition cellulose (C), hemicellulose (H) lignin (L), related polymers (Rp) cell wall-linked phenolic acids

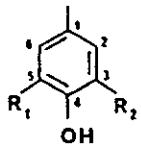
[a] According to the Van Soest procedure (Van Soest, 1964), NDF and ADF provide a rougl estimation of total 'macromolecular content' = (C + H + L + Rp) and 'lignocellulosi content' = (C + L + Rp).

compared the kinetics of delignification of two gymnosperm 'softwoods' (*Tsuga heterophylla* and *Abies amabilis*) and two angiosperm 'hardwoods' (*Acer macrophyllum* and *Arbutus menziesii*). Identical rates were observed for both species of softwood; this behaviour was anticipated on the basis of the similar nature of gymnosperm lignins. On the other hand, *Acer* was delignified more than twice as fast as the softwood species and *Arbutus* five times faster. When these rates of delignification were plotted against the ratio of the syringyl to guaiacyl monomeric units, which is indicative of the molecular composition of lignin (Fig. 13.1), a straight line was obtained. These results have demonstrated a strong correlation between high delignification rate and high syringyl content in lignin fractions.

Furthermore, at the molecular level, these authors have suggested that this higher extractability of the syringyl-rich lignin fractions is due to the fact that syringyl monomers are probably less extensively bonded by alkali-stable linkages (or 'condensed carbon–carbon bonds', involving the carbon-5 of the syringyl aromatic cycle) than the corresponding guaiacyl monomers, in which C_5 is free (Fig. 13.1).

Even though this hypothesis requires experimental validation, these results demonstrate the large variability of reactivity among the cell

LES POLYMERES VEGETAUX, Vol. 2 - part 1
464/529



R_1: H	R_2: H	: H
R_1: H	R_2: OCH_3	: G
R_1: OH	R_2: OCH_3	: HG
R_1: OCH_3	R_2: OCH_3	: S

Figure 13.1 Substitution patterns of monomeric units found in lignins. H, phenyl; G, guaiacyl; HG, 5-hydroxy guaiacyl; S, syringyl structures.

wall-linked phenolics in relation to the production of cellulosic fibres.

Confirming the importance of this variability, the characteristic high alkali extractability of monocotyledons, such as grasses and straw, is noteworthy.

The high extractability of grass lignins has been recognized and used since about 1910, for example the so-called Beckman process, to improve the digestibility of Gramineae forages by cattle after mild alkaline treatment. In an attempt to explain this phenomenon, at the molecular level, two mechanisms have been suggested.

First, Scalbert and Monties (1986) proposed that the occurrence of ether linkages between phenolic acids, mainly *p*-coumaric and ferulic acids, and the lignin network would allow solubilization of lignin fractions by cleavage of corresponding ester bridges with other cell wall components, such as polysaccharides (external bridges) or lignin macromolecule (internal bridges) with formation of ionizable carboxylic groups (Monties, 1991b).

Second, Lapierre *et al.* (1989) proposed that the occurrence of a relatively large content of guaiacyl monomeric units with free phenolic functionality on carbon-4 of their aromatic cycle would allow an easier solubilization by ionization under alkaline conditions.

Even though, until now, the relative importance of these two mechanisms has not been evaluated experimentally, these data clearly illustrate the practical interest and the specificity of the variability of the properties of the cell wall-linked phenolics in relation to the alkaline processing of cellulosic fibres from all types of plants (angiosperm and gymnosperm).

Furthermore, emphasizing the specific importance of the cell wall lignification patterns in relation to pulping processes, Paszner and Behera (1989) have reported that, due to preferential delignification of the cell corners, an early fibre liberation responsible for the high yield of organosolve pulping can be obtained from any woody species by alkali earth metal salt catalysed process. This phenomenon appears to be controlled by the physical and chemical properties of lignin, par-

LES POLYMERES VEGETAUX, Vol. 2, part 1
465/529

ticularly molecular and macromolecular heterogeneity of lignin ne works occurring in the different morphological layers of the cell wall particularly in the middle lamella.

13.2.2 Cell wall-linked phenolics and fibre digestibility

Considering the digestibility of the plant cell wall, it must be em phasized that the concept of 'dietary fibres' is rather confusing a it can be applied to compounds not digested in the intestinal trac irrespective of their morphology and composition (Southgate *et al.* 1989). In this respect, neutral detergent fibres (NDF) and acid detergen fibres (ADF), as defined according to Van Soest (Table 13.1), suffer th same conceptual limitation (Van Soest, 1964), even though they enabl correlations to be demonstrated between chemical composition an *in vitro* or *in vivo* biodegradability of plant tissue.

As noted previously, molecular mechanisms underlying these cor relations still remain largely unknown. However, in agreement wit the variations in pulping rates of the plant species discussed previously very clear differences in fibre and plant cell wall digestibility have beer reported and related to changes in lignification pattern.

This is, for example, the case between grass and legume forages. A equal lignin content in ADF, the digestibility of legumes, such as alfalfa, is about two times greater than for grasses, e.g. *Bromus* o *Lolium*. Confirming that these differences among plant species hold true whatever the total lignin content in a range between 2 and 10% of dry matter, Van Soest (1964) has suggested that, relative to grasses, alfalfa and other leguminous forages contained a 'smaller but considerably less digestible, lignified cell wall fraction', implying a greater proportion of alfalfa cell wall independent of lignification and thus more digestible.

In addition to the cytochemical differences between these species, not discussed here, this observation can be explained by variations in lignification patterns between grasses and legumes.

First, a difference in lignification pattern may be related to the occurrence of cell wall esters of *p*-coumaric and ferulic acids, specifically found in grasses. In addition to the high alkaline solubility of grass lignins, discussed previously, it has been shown that esterification of hemicelluloses, mainly by ferulic acid (Ishii *et al.*, 1990), could reduce the enzymatic digestibility of grass polysacchardes and fibres in agreement with the Van Soest hypothesis.

Furthermore, differences in monomeric composition of lignins could contribute to explain the variations in digestibility between grasses and legumes. Recently, in a comparison of the monomeric composition of lignin from legume stem (alfalfa and clover) and grasses (wheat

culm), relatively low syringyl to guaiacyl ratios, about 0.6–0.8, have been found in the legumes, indicating a relatively low content of syringyl monomers in leguminous species (Monties, 1991b). As in the case of gymnosperm softwood lignin, discussed previously, it can be suggested that legume lignin, which is richer in guaiacyl monomeric units, is relatively highly condensed and thus induces a lower enzymatic digestibility of the corresponding polysaccharide fraction cell wall, by reducing, for example, the porosity and thus the accessibility to enzymes of the cell wall polysaccharides.

Finally, even when correlations can be shown between fibre digestibility and structural variability of cell wall-linked phenolics, it has to be emphasized that several other morphological and anatomical parameters, such as grinding energy and leaf strength and brittleness have also been related to digestibility (Lees *et al.*, 1982; Vincent, 1982).

Comprehensive and careful studies of these effects, which cannot be discussed here, have been published by Vincent (1982), and indicate correlations between the strength and brittleness of leaves and the amount of sclerenchyma, its distribution and its anatomical interactions with vascular bundles. Some of these correlations are thus also relevant to the biological function of plant fibres (strengthening of plant organs).

13.2.3 Cell wall-linked phenolics and plant organ strength

In the case of wood, the main morphological role of lignins currently accepted is to permeate the polysaccharide components of the cell wall layers and to fill up the intercellular spaces making the plant cell walls both more waterproof and thus mechanically-resistant (Monties, 1989b). It is very likely that this reticulating function also holds, not only for lignins, but also for related phenolic acids in the case of crops and particularly grasses (Monties, 1989a).

As noted above, the strength and brittleness of plant organs have been tentatively related to the phenolic content in plant cell walls, as tensile and fracture properties of plant tissues are thought to be governed both by the mechanical properties of individual bundles of sclerenchyma fibre and by the interactions between these fibre bundles mediated by cell wall reticulating phenolics (Vincent, 1982; Monties, 1991a).

Occurrence of brittle mutants and ecotypes has been previously reported for rice (*Oryza sativa*) and fescue (*Festuca arundinacea*) and was characterized for lignin content and composition by Sharma *et al.* (1986) and Gaudillère and Monties (1989).

LES POLYMERES VEGETAUX Vol. 2 - part 1

Table 13.2 summarizes these data, showing that lignin content is significantly higher in brittle rice but not in brittle fescue. As no

46775298

Table 13.2 Lignin contents and monomeric composition of normal (NO) and brittle (BR) cultivars of rice (stems) and fescue (leaf and stem). Klason lignin content and monomeric composition in guaiacyl (vanillin = G) and syringyl (syringaldehyde = S) products recovered from nitrobenzene oxidation of lignin, expressed in per cent of extracted cell wall content (ECW) of plant organs (means standard deviation <10%)

% ECW	Rice		Fescue	
	NO	BR	NO	BR
Klason lignin	12.5	14.9	20.4	19.4
Vanillin	1.4	1.4	1.2	1.3
Syringaldehyde	1.1	1.1	0.4	0.4
S/G	0.8	0.8	0.3	0.3

significant differences appear in monomeric composition of lignin between these brittle and corresponding normal plants, it can be concluded that brittleness of plant organs is not directly related to the lignification.

In the case of maize stalk, a similar conclusion was reached by Albrecht *et al.* (1986), who emphasized that an increase of structural material (ADF, cell wall content or lignin) was not necessary to impart increased stalk strength or stalk-rot resistance. In agreement with the speculation of these authors that the distribution of structural material in the stalk (e.g. concentration in the rind) may also be involved, a very strong correlation (0.98) can be found from their data between the changes in stalk strength and the ratio of cellulose to lignin contents as calculated from these data by differences between ADF, NDF and lignin (L) (see Table 13.1). The fact that 'ratio of content' rather than 'contents' was more strongly related to mechanical properties could thus be indicative of the importance of the molecular architecture of the plant cell wall and to the tissue and cellular anatomy. These suggestions are in agreement with previous data recently discussed and detailed by Goto *et al.* (1991) and Vincent (1991), respectively.

Illustrating the relevance of these anatomical factors, the variability in morphology of cellulosic fibres will be considered now as changes in fibre morphology which can be induced by treating plants with, for example, growth factors. Changes in lignification patterns will be discussed in a later section.

13.3 VARIABILITY IN CELLULOSIC FIBRE MORPHOLOGY

Before discussing fibre morphology more specifically, the occurrence of anatomical variations in organs such as stems has to be underlined,

ESPROLYMERES VEGETAUX Vol. 2 part 1
468/529

LIGNIN CONTENT, MONOMERIC COMPOSITION AND SCLERENCHUMA RELATIVE AREA N.S VASCULAR BUNDLES IN NORMAL AND BRITTLE ECOTYPES OF FESCUE LEAVES

	Festuca arund. LEAVES	
% Ex. (C.W.R)	NORMAL	BRITTLE
. Lignin (K.L.)	20.4	19.4
. N. B. Ox (V.)	1.2	1.3
. S/V	0.3	0.3
. SCL. vs V.B. %	65 to 85	105 to 145

(according to TOLLIER M.T., CATESSON A.M., MONTIES B.)

le tableau ci dessus a été presenté comme diapo

as large differences have been found leading to the definition of morphological types on the basis of differences in tissue arrangements and lignification patterns found in the sclerenchyma, vascular bundle sheaths, subepidermal and epidermal cell shape, size and wall thickness. Particularly dramatic differences have been reported among the Monocotyledoneae, for example sorghum (Schertz and Rosenow, 1977), *Panicum* (Wilson *et al.*, 1983), and bamboo (Wai and Murakami, 1984). Even when the heritability and the environmental origin of these anatomical changes have not been evaluated precisely, it is important to emphasize such factors here in relation to the technical properties of cellulosic fibres discussed earlier. Such variations have been shown to affect lodging resistance and stalk strength (Schertz and Rosenow, 1977), dry matter digestibility (Wilson *et al.*, 1983) and paper-making properties. Strength and optical properties of papers are respectively mainly related to fibre length and lumen diameter (Wai and Murakami, 1984).

Brittleness of leaves and physical disintegration upon chewing during eating by animals (grinding energy and particle size distribution) have been correlated with the lignin contents of several roughages (Lee and Pearce, 1984). According to recent data obtained by Vincent (1991) for the leaves of *Stipa gigantea*, anatomical variations in leaves significantly influence the brittle character of some Gramineae leaves, particularly the interspersion of sclerenchyma bundles with lignified material of similar mechanical properties. This seems also to be the case of the *Festuca arundinacea* brittle ecotype (Table 13.2), described previously by A.M. Catesson, in which earlier formation of larger sclerenchyma bundles was found when compared with the normal ecotype (Monties and Calet, 1992).

The differences in the paper-making properties of rice and wheat straws fibres demonstrate the technical importance of the variability in the morphology of fibres. Murakami's group (Jin *et al.*, 1988, 1990) have found very significant differences in average fibre length, width, slenderness and coarseness between fibres of rice and wheat and these were correlated with differences in paper sheet properties (pore structure, elastic modulus, folding endurance, tensile strength and irreversible deformations, for example). Confirming the occurrence of large anatomical differences between grasses, these data agree with the well-established qualitative differences between softwood and hardwood fibres regarding paper-making pulp.

In this respect, evaluation of the variability of morphological properties of cellulosic fibres between tree species has seldom been reported. The generality of this phenomenon could be indicated by data reported by Yanchuk *et al.* (1984), when comparing 15 putative *Populus tremuloides* clones for the pattern of variation and heritability of

ESPOL-YMPRESO VEGETAL X Vol. 2 470/529

fibre length among clones. Significant differences ranging from abou 0.5 to 1.2 mm fibre length, with a mean standard deviation of 0.1 mm were reported depending on the clones and the radial distance fror the pith to the bark. Such variations, which compare with thos reported for wheat (0.9 ± 0.1) and rice (1.3 ± 0.5) by Jin *et al.* (1990) would very likely affect the technical properties of the correspondin cellulosic fibrous material. In the case of aspen (Yanchuk *et al.*, 1984) however, heritability analysis indicated only a moderate genetic control confirming the importance of silvicultural or cropping practices in th case of trees or agricultural fibre production.

Furthermore, corresponding changes in lignification pattern wer not reported in these studies even when they could affect the isolatio and the technical qualities of fibres as suggested earlier. This aspec will now be discussed.

13.4 NATURAL AND INDUCED VARIATIONS IN LIGNIFICATION AND FIBRES

With reference to the 'natural' phenotypic and genotypic variations i fibre morphology already noted, it is important to recall that simila differences can be induced by treating plants with growth substance and plant hormones.

In 1961, the effect of treatment of industrial fibre plants [such as jut (*Corchorus olitorius*), kenaf (*Hibiscus cannabinus*) and hemp (*Cannabi sativa*)] with sprays of gibberellic acid was demonstrated by Stan (1963). Highly significant increases in length, 20–130% for the whol stem and as much as 400% for single internode fibre cells, were observed. In trees, the occurrence of this effect was also reported b Digby and Wareing (1966), who also demonstrated that the hormona balance between growth substances, such as auxin (indoleacetic acid IAA) and gibberellic acid (GA), promoted changes in tissue anatomy (phloem and xylem vessels or fibres). A process for increasing the overall yield of fibres from industrial plants and crops by application o growth substances has been patented (Aloni, 1985); marginal effects on fibre length and paper-making qualities were however reported in the case of kenaf under GA application (Abbott *et al.*, 1988). However, tc our knowledge, changes in lignification were not reported in these studies, even when earlier studies had indicated that changes in lignification pattern (lignin content and composition) were induced by hormonal treatment of plant tissue cultures (Venverloo, 1969; Hoffmann *et al.*, 1985). Very recently, the first indications of quantitative (content) and qualitative (monomeric composition) changes in lignification pattern of xylem and phloem fractions induced by application of growth factor mixtures (IAA, GA and ethrel, an ethylene precursor) have been

Table 13.3 Changes in lignification pattern from kenaf treated with growth factor mixtures: auxin (IAA) and gibberellic acid (GA) over 20 days. (Lignin content, alkaline extractability and monomeric composition in syringyl (S) and guaiacyl (G) monomers as shown by thioacidolysis of the phloem and xylem fractions according to Tollier *et al.* (1991)

Treatment	*Tissue*	*None*	*IAA + GA_3*	*Ethrel*
Klason lignin (% CW)	Phloem	6.8	8.4	18.9
	Xylem	14.0	19.2	14.9
Extractability (relative units)	Phloem	69	56	78
	Xylem	50	34	42
S/G	Phloem	8.10	4.84	3.11
	Xylem	1.33	1.52	1.38
S + G[a]	Phloem	1766	1163	415
	Xylem	2270	1717	1776

[a]S, G = yield in μmol/g of klason lignin.

reported in the case of *Coleus blumei* (Aloni *et al.*, 1990) and kenaf (Tollier *et al.*, 1991). Table 13.3 summarizes these results, confirming that lignification pattern can be dramatically changed by treatment with growth factors.

Finally, in agreement with these data and the results discussed previously, it can be concluded that the phenotypic variability in fibre morphology, which can be induced by growth substances and very likely by environmental factors, is probably correlated with large variations in lignification pattern. The practical significance of these data and correlations has never been evaluated to our knowledge and could be important from both the agricultural production and the industrial processing points of view.

In this discussion regarding natural versus induced variability in lignification, genetic variability in lignification pattern has also to be considered.

Occurrence of an additional 5-hydroxy guaiacyl monomeric unit (Fig. 13.1) incorporated in the lignin from a brown-midrib (bm_3) mutant of maize was reported for the first time by Lapierre *et al.* (1988). The occurrence of such an unusual unit, which is not found in the corresponding normal maize cultivar, suggests that the methylation step of 5-ferulic acid to sinapic acid, catalysed by a catechol-*o*-methyl transferase, occurs to only a limited extent in this mutant. Due to the future probability of genetic manipulation of enzymes involved in lignin monomers biosynthesis, occurrence of such a mutant is indicative of other possible changes in lignification pattern of cellulosic fibres.

Due, however, to the well-known topochemical selectivity of lignification of cell wall layers, of cells and even of tissue, a detailed analysis and control of the expression of the genes involved in lignin biosynthesis remain to be obtained. In a recent report (Monties, 1991b), albeit on a very limited number of wood samples, an absence of correlation between fibre morphology and lignin monomeric composition was reported in the case of four angiosperms, which is indicative of the absence (or of a weak biosynthetic correlation) between xylem fibre morphology and corresponding lignin monomeric composition. Such an absence of 'coupling' would allow lignin manipulation without side effects on fibre morphology. Possible side effects on fibre isolation and properties remain, however, possible.

Furthermore, as recently shown by Donaldson (1991), seasonal changes in lignin distribution during tracheid development occur in the case of wood formation in pine trees. Providing the first preliminary evidence that trees with low middle lamella lignin concentration show a slower lignification of the secondary wall layer, accounting for quantitative differences in lignin contents, this chapter throws light on both the complexity of the physiological regulation of the lignification pattern of wood fibres and the potential interest of producing trees specifically deficient in lignin in some cell wall layers and thus, as discussed in section 13.2.1, more easily amenable to pulping.

13.5 SUMMARY AND CONCLUSIONS

Both structure and reactivity of cell wall-linked phenolics, such as lignin, and related phenolic acids in the case of grasses, have been related to efficiency of isolation of cellulosic fibres from plant material, to digestibility by animals and to mechanical properties of plant organs such as stems and leaves. These technical properties, however, also depend strongly on fibre morphology and on tissue architecture in the plant organs. Natural and induced variations in both lignification pattern (lignin content and composition) and fibre morphology have been reported and may have a great technical significance for both production and transformation of plant material. Due to selectivity of the genotypic and phenotypic changes reported in plant cell wall lignification pattern, it is suggested that production and utilization of cellulosic fibres can be improved by manipulating cell wall-linked phenolics. Comparing the recent advances in processing and production of plant material, one can reasonably expect that the most innovative breakthrough will be the result of biological manipulation of the plant cell wall material.

REFERENCES

Abbott, T. P., Touzinsky, G. F., Kwolek, W. F. and Bagby, M. O. (1988) The effect of gibberellic acid on the growth and pulp properties of kenaf. *Non-Wood Fiber Pulping, TAPPI spec. pub.*, 18, 75–80.

Albrecht, K. A., Martin, W. A., Russell, W. F. and Buxton, D. R. (1986) Chemical and *in vitro* digestibility of maize stalks after selection for stalk strength and stalk-rot resistance. *Crop Science*, 26, 1051–5.

Aloni, R. (1985) Plant growth method and composition. U.S. Patent no. 4, 507, 144 (26 March) 4 pp.

Aloni, R., Tollier, M. T. and Monties, B. (1990) The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. *Plant Physiology*, 94, 1743–7.

Chang, H. M. and Sarkanen, K. V. (1973) Species variation in lignin: effect of species on the rate of kraft delignification. *TAPPI*, 56, 132–4.

Donaldson, L. A. (1991) Seasonal changes in lignin distribution during tracheid development in *Pinus radiata* D. Don. *Wood Science and Technology*, 25, 15–24.

Digby, J. and Wareing, P. F. (1966) The effect of applied growth hormones on cambial division and differentiation of the cambial derivatives. *Annals of Botany*, 30, 539–49.

Fahn, A. (1982) *Plant Anatomy*, 3rd edn, Pergamon Press, London.

Fujita, M. and Harada, H. (1991) Ultrastructure and formation of wood cell wall, in *Wood and Cellulosic Chemistry* (eds D. N. S. Hon and N. Shiraishi), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 3–57.

Gaudillère, M. and Monties, B. (1989) Biochemical and biosynthetic studies on lignification of Gramineae. *American Chemical Society Symposium Series*, 399, 182–92.

Goto, M., Gordon, A. H. and Chesson, A. (1991) Changes in cell wall composition and degradability of sorghum during growth and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 47–60.

Hoffmann, Sr A., Miller, R. A. and Pengelly, W. L. (1985) Characterization of polyphenols in cell walls of cultured *Populus trichorcarpa* tissues. *Phytochemistry*, 24, 2685–7.

Ishii, T., Hiroi, T. and Thomas, J. R. (1990) Feruloylated xyloglucan and *p*-coumaroyl arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. *Phytochemistry*, 29, 1999–2003.

Jin, B., Hasuike, M. and Murakami, K. (1988) Differences in paper making properties between rice and wheat straw fibres. *Mokuzai Gakkaishi*, 34, 923–8.

Jin, B., Hasuike, M. and Murakami, K. (1990) Elastic properties of rice- and wheat-straw pulp sheets. *Mokuzai Gakkaishi*, 36, 732–7.

Lapierre, C., Jouin, D. and Monties, B. (1989) On the molecular origins of the alkali solubility of gramineae lignins. *Phytochemistry*, 28, 1401–3.

Lapierre, C., Tollier, M. T. and Monties, B. (1988) Mise en évidence d'un nouveau type d'unité constitutive dans les lignines d'un mutant de Maïs. *Compe Rendus de l'Acadamie des Sciences, Paris, 307 série III*, 723–8.

Lee, J. A. and Pearce, G. R. (1984) The effectiveness of chewing during eating on particle size reduction. *Australian Journal of Agricultural Research*, 35, 609–18.

Lees, G. L., Howarth, R. E. and Goplen, B. P. (1982) Morphological characteristics of leaves of forage legumes: relation to digestibility and mechanical strength. *Canadian Journal of Botany*, 60, 2126–32.

Monties, B. (1989a) Molecular structure and biochemical properties of lignins in

relation to possible self-organization of lignin networks. *Annales des Sciences Forestières*, 46 (Suppl.), 848s–855s.

Monties, B. (1989b) Lignins, in *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 1, *Plant Phenolics* (eds P. M. Dey and J. B. Harborne), Academic Press, London, pp. 113–57.

Monties, B. (1991a) Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Animal Feed Science and Technology*, 32, 159–75.

Monties, B. (1991b) Recent advances in structural and biosynthetic variability of lignins, in *Proceedings of the 6th International Symposium on Wood Pulping Chemistry (ISWPC)*, Melbourne, 1, APPITA pub., pp. 113–23.

Monties, B. and Calet, C. (1992) Variability in lignification and utilization of grasses, in *Proceedings of the 14th General Meeting of the European Grassland Federation* (Lahti, Finland) Agricultural Research Centre, Finland pub., pp. 111–29.

Paszner, L. and Behera, N. C. (1989) Topochemistry of softwood delignification by alkali earth metal salt catalysed organosolve pulping. *Holzforschung*, 43, 159–68.

Scalbert, A. and Monties, B. (1986) Comparison of wheat straw lignin preparations, part I and II. *Holzforschung*, 40, 119–27 and 249–54.

Sharma, U., Brillouet, J. M., Scalbert, A. and Monties, B. (1986) Studies on a brittle stem mutant of rice *Oryza sativa* L.: characterization of lignin and associated phenolic acids. *Agronomie*, 6, 265–71.

Schertz, K. F. and Rosenow, D. T. (1977) Anatomical variations in stalk internode of sorghum. *Crop Science*, 17, 628–31.

Southgate, D. A. T., Waldron, K., Johnson, I. T. and Fenwick, G. R. (eds) (1989) *Dietary fibre; chemical and biological aspects*, Special publication no. 83, Royal Society of Chemistry, London.

Stant, M. Y. (1963) The effect of gibberellic acid on fibre-cell length. *Annals of Botany*, 27, 185–96.

Tollier, M. T., Chabbert, B., Aloni, R. and Monties, B. (1991) Hormonal control of lignification of the xylem and phloem of Kenaf (*Hibiscus cannabinus*), in *Proceedings of the First European Symposium on Industrial Crops and Products (Maastricht, Nov. 1991)*, pp. 4 and 25 (submitted to *Industrial Crops and Products*).

Van Soest, P. J. (1964) Symposium on nutrition and forages and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. *Journal of Animal Science*, 23, 838–45.

Venverloo, C. (1969) The lignin of *Populus nigra* L.: comparative study of the lignified structure in tissue cultures and tissues of the tree. *Acta Botanica Neerlandica*, 18, 241–314.

Vincent, J. F. V. (1982) The mechanical design of grasses. *Journal of Materials Science*, 17, 856–60.

Vincent, J. F. V. (1991) Strength and fracture of grasses. *Journal of Material Science*, 26, 1947–50.

Wai, N. W. and Murakami, K. (1984) Relationship between fiber morphology and sheet properties of Burmese Bamboo. *Moluzai Gakkaishi*, 30, 156–65.

Wilson, J. R., Brown, R. H. and Windham, W. R. (1983) Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C_3, C_4 and C_3/C_4 intermediate types of *Panicum* species. *Crop Science*, 23, 141–6.

Yanchuk, A. D., Dancik, B. P. and Micko, M. M. (1984) Variation and heritability of wood density and fiber length of trembling Aspen in Alberta, Canada. *Silvae Genetica*, 33, 11–16.

LIBRARY SOCIETY METALS SCIENCE, JAPAN Vol. 2 - part 1
476528

the biodegradability of industrial lignins (prepared from [^{14}C]lignin-labeled lignocelluloses),[44] comparisons of the biodegradabilities of different species of wood lignins,[3] and biodegradation of lignin within the guts of invertebrates.[45]

[44] D. L. Crawford, S. Floyd, A. L. Pometto III, and R. L. Crawford, *Can. J. Microbiol.* 23, 434 (1977).
[45] J. H. A. Butler and J. C. Buckerfield, *Soil Biol. Biochem.* 11, 507 (1979).

[4] Preparation of Dioxane Lignin Fractions by Acidolysis

By BERNARD MONTIES

General Principles

A convenient method for the preparation of lignin fractions from biomass is provided by the combination of mild solvolytic conditions with a good lignin solvent.

Arylalkyl ether bonds, the most frequent intermonomeric linkage occurring in lignins, are cleaved under acid conditions[1] with the formation of low-molecular-weight phenols and depolymerization of the lignin network and/or the lignin–carbohydrate complexes. The term acidolysis has been coined[1] for designating the solvolysis of lignin by refluxing with 0.2 *M* hydrogen chloride in a dioxane–water mixture (9:1, v:v). Dioxane is a particularly interesting isolating agent of lignin fractions because of its solubility parameter, which is very close to the optimum value for isolated lignin preparations.[2] Systematic studies have been thus carried out using a 9:1 mixture of dioxane–water and dilute hydrochloric acid for isolation of lignin both at ambient[3] and high temperature.[4] Preparation of dioxane acidolysis lignins has the main advantage of providing, in the shortest time, lignin fractions in high yields and in a form suitable for further chemical and biotechnological investigations. These lignins generally contain only a very low percentage of associated polysaccharides. However, the procedure suffers from the disadvantage that condensation reactions occur inside the

[1] E. Adler, J. M. Pepper, and E. Erikson, *Ind. Eng. Chem.* 49, 1391 (1957).
[2] C. Schuerch, *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5061 (1952).
[3] K. Freudenberg, *in* "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse," Vol. 3, p. 509. Springer-Verlag, Berlin, Federal Republic of Germany, 1955.
[4] J. M. Pepper and M. Siddiqueullah, *Can. J. Chem.* 39, 390 (1961); and J. M. Pepper, P.E.T. Baylis, and E. Adler, *Can. J. Chem.* 37, 1241 (1959).

Copyright © 1988 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

lignin network during its solvolysis and increase to a significant extent with increasing temperature and acidity. Another disadvantage may be the addition of chlorine to dioxane lignin fraction[3] reported approximately 1.5–2%.

Two procedures for preparation of dioxane lignins are reported with their quantitative and qualitative comparisons.

Method

Principle

Two procedures for isolation have been adapted: the first one is carried out at ambient temperature according to Freudenberg,[3] and the second is performed at reflux temperature, approximating the procedure of Pepper *et al.*[4] Acidolysis conditions are, however, similar to those chosen by Lapierre *et al.*[5] for characterization of lignins by analysis of acidolysis products.

Reagent and Materials

1,4-Dioxane. This is a commercial product (RP Normapur grade, PROLABO) stabilized against peroxidation by addition of about 0.03% of di-*tert*-butyl-2,6-*p*-cresol and used without further purification.[6]

Hydrochloric Acid. This is a commercial product (PROLABO M Normadose) titrated to 2 *N* in water.

Biomass (Wood or Straw) Samples. Samples of air-dried xylem (wood without bark) or culm (stems from straw without leaves) were ground with a rotating knife mill until the entire sample was able to pass through a 0.5-mm screen. The powder was extracted exhaustively with toluene–ethanol (2:1, v:v), then with ethanol, and finally with water until the extracts were colorless. The solvent-free sample, parietal residue (PR), was then freeze-dried.

Procedure

The procedure followed in this laboratory for isolation of dioxane lignin preparation on a gram scale uses 0.2 *N* HCl in dioxane, freshly prepared before use.

[5] C. Lapierre, C. Rolando, and B. Monties, *Holzforschung* 37, 189 (1983).

[6] Comparative acidolysis experiments have been done with RP grade (PROLABO) dioxane and with dioxane purified according to A. I. Vogel, *in* "Practical Organic Chemistry," 3rd Ed., p. 177. Longmans, London, 1964. Under these conditions, no qualitative changes were observed among monomeric acidolysis products. When using purified dioxane, the total yield in acidolysis monomers was, however, increased by about 10%. Lignin preparations were performed with commercial dioxane only.

Acidolysis Procedure for Reflux Dioxane Lignin (RDL). Twenty grams of PR is stirred with 250 ml of reagent in a 1-liter, two-necked flask fitted with a reflux condenser and a nitrogen bubbler. After permeation, an additional 250 ml of reagent is added and a slow stream of nitrogen is bubbled through the suspension for 10 min before heating. Reflux is maintained for 30 min under nitrogen without bubbling. The reaction mixture is allowed to cool under nitrogen and is then rapidly filtered through a large 13-cm diameter, sintered glass funnel (coarse number 3 porosity). The residual pulp is washed twice with 100 ml of reagent.

The filtrate is neutralized with an excess of sodium bicarbonate;[7] the excess is removed by filtration. The dioxane–water filtrate is concentrated under reduced pressure at 40° until precipitation commences. Because the gummy mass of lignin tends to precipitate, just enough dioxane–water mixture (9:1, v:v) is added to obtain a clear solution. The final volume obtained ranges between 20 and 25 ml.

Acidolysis Procedure for Ambient Temperature Dioxane Lignin (ADL). A 50-g sample of PR is suspended in 1 liter of reagent in a 2-liter glass-stoppered flask, under nitrogen with mild magnetic stirring. Acidolysis is allowed to proceed for 20 days at 20°,[3] or at room temperature in the dark. Isolation and concentration of acidolysis lignin are performed as for RDL.

Purification of Dioxane Lignins. Solutions of dioxane lignin, RDL or ADL, are precipitated by injection, through an hypodermic syringe as a fine stream, into 2 liters of water very vigorously stirred with a magnetic stirrer (1000 rpm) in a large beaker (diameter, 15 cm). When the solution is injected in the direction of flow along the beaker wall, a very fine haze (precipitate) is obtained which sediments quickly, leaving a clear solution.[8] Precipitated dioxane lignin is recovered by centrifugation (1 hr, 2500 *g*, ambient temperature). Pellets are dissolved in dioxane (50 ml) and lignin is again precipitated by injection into diethyl ether (2 liters). Precipitated lignin is recovered, after decantation of the clear mother solution, by centrifugation in closed tubes at low temperature between −10 and −15°.[9] The resulting lignin preparations are freeze-dried and stored in the dark at a temperature of about −18°.

Discussion

The preparation procedure for dioxane lignin by acidolysis under reflux allows for the isolation of RDL from gymnosperm (*Abies* sp.) wood, from

[7] About 20 g of $NaHCO_3$ (RP, Normapur, PROLABO) is sufficient for neutralization which can be controlled by pH measurement after dilution of the filtrate with water (1:4, v:v).

[8] A rapid coagulation of lignin flocs is obtained regularly only if the volume of injected dioxane is significantly lower than 5% of the volume of precipitating water.

[9] For safety reasons, purification in diethyl ether may be replaced by thorough washing with water and repeated centrifugations.

angiosperm (*Populus* sp.) wood, and from gramineae (*Triticum* sp.) straw; the total yields are about 15, 30, and 65% Klason lignin, respectively. These data are in complete agreement with the results of Pepper and Wood.[10]

Yields for ADL isolated from the same sample as RDL were found to be significantly lower: the ADL yield was about 15% of Klason lignin for poplar and only 3% in the case of fir. The same differences have been reported for another angiosperm, *Betula* sp., and gymnosperm, *Picea* sp., by Desmet.[11]

Qualitative differences previously reported by UV[12] and IR[13] spectroscopy between RDL lignins of these three types of plants were also observed.

Comparison of poplar ADL and RDL has been done in this laboratory. IR spectra analysis failed to show very clear differences between 1800 and 1000 cm^{-1}, particularly for the monomeric composition at 1330, 1270, 1120, and 1030 cm^{-1} and total carbonyl groups at 1710 and 1660 cm^{-1}. However, significant differences were recorded between UV spectra of ADL and RDL, when lignins were reduced with $NaBH_4$. The occurrence of nonreducible carbonyls in RDL was suggested by the presence of a shoulder between 320 and 400 nm, this shoulder being absent for ADL.

These latter data are indicative of the occurrence of discrete differences, at least in the case of poplar, between the two types of preparations; they confirm the "heterogeneity represented in the group of dioxane acidolysis lignins."[14]

Recent data from gel permeation over μBondagel E 125 and E 500 columns, using pure tetrahydrofuran as solvent, have given very clear evidence of the same type of heterogeneity inside these corresponding RDL and ADL poplar lignin preparations. The use of a high-speed diode array ultraviolet detector, according to Nicholson *et al.*,[15] allows one to assess the variations in the UV spectra (220–400 nm) of the eluted dioxane lignin fractions in relation to their elution volume. Very significant differences were noted between the shape of the ultraviolet spectra of the fractions eluted before and after the maximum of the elution curve, even when a standard unimodal distribution was obtained by size-exclusion chromatography of RDL and ADL preparations. Fractions eluting after the maximum showed significantly different absorbancy shoulders between 300 and

[10] J. M. Pepper and P. D. S. Wood, *Can. J. Chem.* **40**, 1026 (1962).
[11] J. Desmet, Ph.D. thesis. Université Scientifique et Médicale, Grenoble, France, 1971.
[12] D. F. Arseneau and J. M. Pepper, *Pulp Pap. Mag. Can.* **66**, T-415 (1965).
[13] H. L. Hergert, *J. Org. Chem.* **25**, 405 (1960).
[14] K. V. Sarkanen, *in* "Lignins: Occurrence, Formation, Structure, and Reactions" (K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig, eds.), p. 187. Wiley (Interscience), New York, 1971.
[15] J. C. Nicholson, J. J. Meister, D. R. Patil, and L. R. Field, *Anal. Chem.* **56**, 2447 (1984).

360 nm; such changes were not found for fractions eluted before the peak maximum (B. Monties, unpublished results). These results emphasize the necessity to consider carefully the isolation procedure of dioxane lignin fractions in relation to qualitative differences in their molecular and macromolecular properties.

[5] Acid-Precipitable Polymeric Lignin: Production and Analysis

By DON L. CRAWFORD and ANTHONY L. POMETTO III

The initial product of lignin degradation by *Streptomyces viridosporus* is a water-soluble polymeric intermediate, acid-precipitable polymeric lignin (APPL).[1] *Streptomyces viridosporus* T7A (ATCC No. 39115) degrades lignin by an oxidative depolymerization mechanism involving the cleavage of intermonomeric β-ether linkages and the introduction of phenolic hydroxyl, α-carbonyl, and carboxylic acid groups into the lignin polymer.[2,3] APPLs also contain some nonlignin components including organic nitrogen (2–3%), carbohydrate (2–3%), and ash (4–5%).

The net result of enzymatic attack on lignin by *S. viridosporus,* when the culture is growing in solid-state fermentations on lignocelluloses such as those derived from grasses, is the generation of water-soluble polymeric lignin fragments (APPLs) of high molecular weight (> 80,000) which can accumulate to levels approaching 30% or more of the initial lignin present in the lignocellulosic substrate.[1,4] It appears that *S. viridosporus* produces APPL primarily as a mechanism for gaining access to polysaccharides in the lignocellulose.[4,5] These polysaccharides are degraded with active polysaccharidases.[6] While the APPLs are further metabolized after their release, they are degraded very slowly by the *Streptomyces* that produce them.[5]

[1] D. L. Crawford, A. L. Pometto III, and R. L. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 898 (1983).

[2] D. L. Crawford, M. J. Barder, A. L. Pometto III, and R. L. Crawford, *Arch. Microbiol.* 131, 140 (1982).

[3] D. L. Crawford, A. L. Pometto III, and L. A. Deobald, "Recent Advances in Lignin Biodegradation Research" (T. Higuchi, H.-M. Chang, and T. K. Kirk, eds.), pp. 78–95. Uni, Tokyo, 1983.

[4] J. R. Borgmeyer and D. L. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 273 (1985).

[5] A. L. Pometto III and D. L. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 171 (1986).

[6] D. L. Crawford, T. M. Pettey, B. M. Thede, and L. A. Deobald, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 14, 214 (1984).

Copyright © 1988 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

‘Recueil documentaire: ReDoc’,
as electronic base of knowledge and data.

a ‘ReDoc’ review on the macromolecular structure, formation and properties of lignins,

Exemplary of current electronic edition facilities, this ‘.pdf file’ combines recent selected related reviews,
(copies from scientific publications from Cellullose Chemistry and Technology, Advances in phytochemistry, European society of wood mechanics),

It allows a ‘non linear lecture’ on such a ‘network’, based on combined automatic research of citations, key-words.

Responding to the use and organization of ‘ReDoc files’, these papers are associated to the lists of about 7.000 standard references selected in an indexed collection of an ‘INRA-Grignon- documentary fund focussed on:
‘Lignins and lignification of plant cell walls and derived products’

Assembling only a limited number papers, ‘microReDoc’, this file however allows automated researches extended on the whole classified fund of reference-lists ‘macroReDoc’.
(*classified hierarchically according to 4 domains, 60 themes, 260 sub themes, these lists also include selected tables of content of books).*

Cascades of hyperlinks have been drawn to make clearer the inbreeding the micro- and macro- files, start by clic a here.

- a ReDoc review-5 Draft.pdf

This file of recent reviews, in mainly English, focusses on,
' **Lignin macromolecular biochemistry**',
with the aim to also introduce to:
the principles of ReDoc organization,
use of hyperlinks shown by 'arrows' and active bookmarks
from table of content' directly to topics with short cyclic surveys

Recueil documentaire : 'ReDoc' :

***a Compendium from the INRA-Grignon documentary fund* :**

'Lignins and lignification of plant cell walls and derived products'

' Macromolecular lignins, a 'ReDoc' review ' :

<u>an 'hypertext' combination of selected reviews ,</u>

from

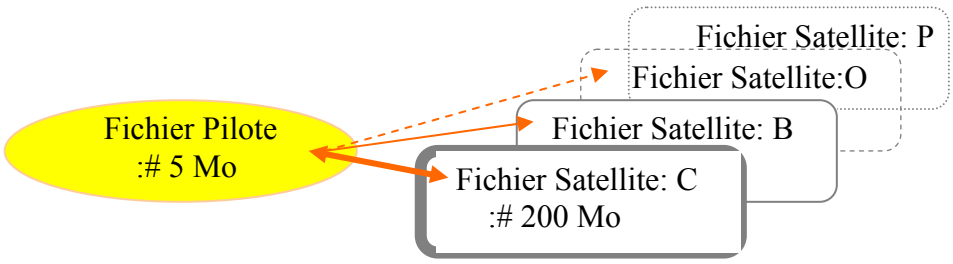
'*Cellullose Chemistry and Technology,*
Advances in phytochemistry,
European society of wood mechanics'

as

<u>illustration of the use and organization of 'ReDoc files</u>

based on

an indexed set of ReDoc-Pil.- and Sat.-files:



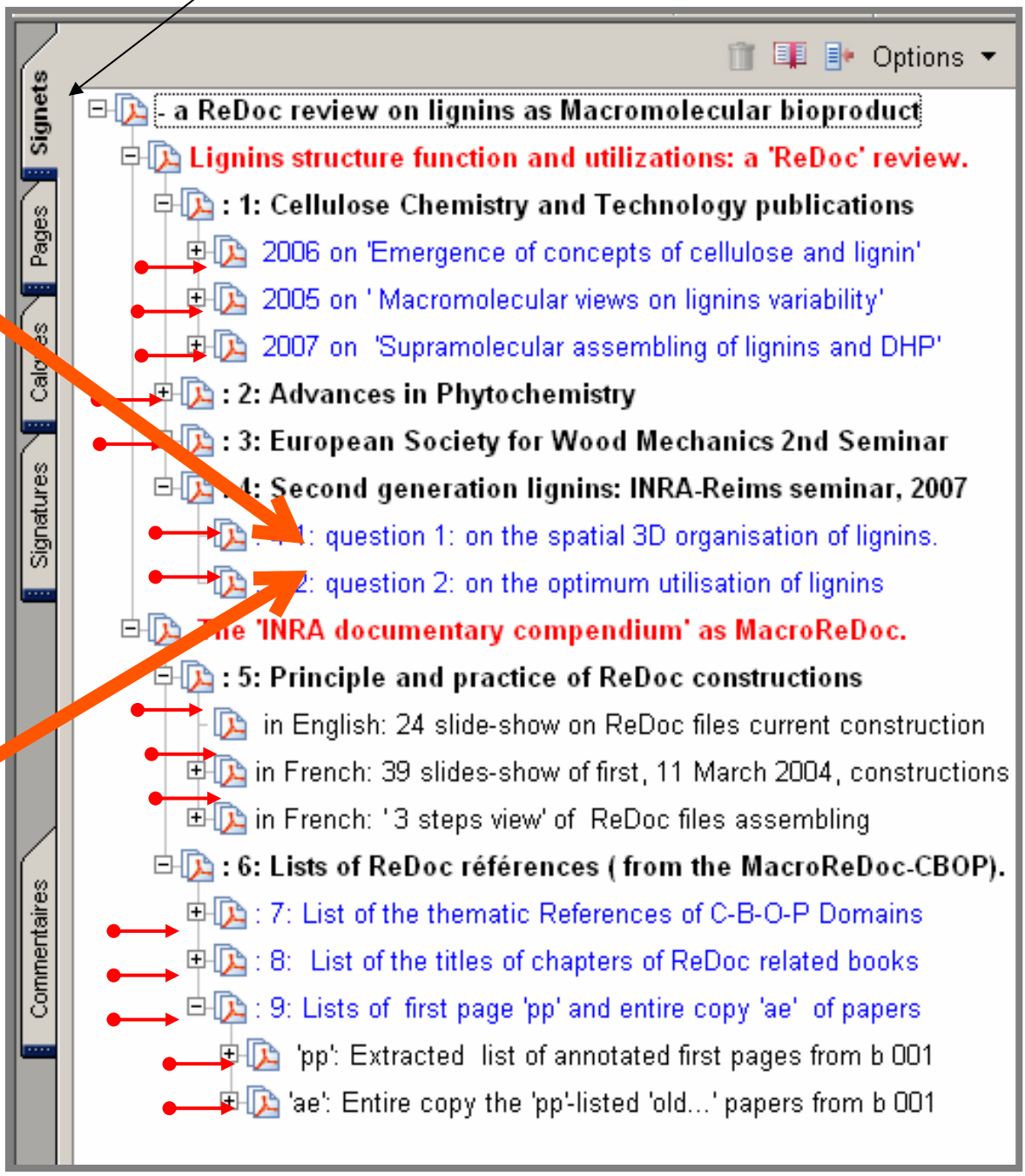
'*Lists of ReDoc domains, themes, sub themes,*
lists of the related bibliographic references'

<u>with hyperlinks between the C.B.O.P-Macro-ReDoc files</u>.

Survey of a copy of the Table of content (*):

from this page, a 'clic' on the 'active red' harrow, ⟶, lead to each chapter.

(*) : the corresponding 'on screen-electronic-active- table' can be open by a clic on the left vertical 'bookmark'



NB : any part of this file, image and/or text, can be copied, modified and re-assembled as new and original file as '.pdf- formatted' file according to the suggested procedure of 'Revision'

clic here for the next

L-2-G INRA-Reims seminar (Nov. 2007)

Presentation of question 1: ' what factors determine the spatial '3D' organization of lignins ? '

This first question deals with the spatial arrangement of lignin in the ligno-cellulosic plant cell walls and related industrial products looking peculiarly at their macro- and supra-molecular levels which remain now seldom studied with regard to monomer- and concatenation- levels. Contributing at least as much as these two last one to the macroscopic properties of these lignocellulosic products, the macro- and supra-(molecular)organisation are tentatively viewed here from a point of view of 'pure polymers' science, neglecting some 'fine' monomer- or linkage-structural and -functional effects.

Depicted in next slides, also discussed in Cell. Chem. Technol.2005, **39**, 341-367, a spatial-temporal organization model by activation- inhibition effects could suffice to account the formation of lignin network of clusters observed during in situ lignification and in vitro synthesis of lignin polymers (DHP). Including, autocatalytic initiation of lignin polymerisation by peroxidases, physical solvatation by water with chemical intermolecular (re)- arrangement observed, or supposed to occur, during chemical pulping and/or mechanical deformations of wood for examples. Accounting cooperative interactions between cell wall components including water, this model is based on the theory of the self-organization of dissipative structures postulated by Prigogine according to him 'principe de modération' in open chemical systems far from equilibrium (1945, Bul.Acad.Roy.Belg.**31**, 600-608) later applied to "Exploring complexity" of chemical systems (see référence p: 356 in 2005's paper cited) but also human society-systems, according to the title of him 1989 book, with Nicolis, chap. 3 and 6 for examples, cited here also in 'question 2'.

Based on published experimental data of in vitro simulation of peroxydasic polymerisation of DHP, this structural model of 'in vitro *versus* in situ (bio)synthetic organisation' is recalled in terms of 'lignin morphogenesis' complexity, with regards first to both its 'chemical organisation' (some morphological data, and interpretations on hypothetical simulations) presented then to experimental evidences based on isolated fractions, enlightening the macromolecular complexity of native and industrial lignin fractions

question:

‘ *What factors determine the ‘3D organization’ of lignins ?* ’

:**1**: hypothesis from theoretical simulations of organisation

- CHEMICAL ORGANISATION -

morphological interpretations

:**2**: experimental evidences based on isolated fractions :

- MACROMOLECULAR VARIABILITY -

macromolecular hypothesis and data

3: in vitro simulation of peroxydasic polymerisation :

- LIGNIN MORPHOGENESIS -

structural model of in situ biosynthesis

question:

‘ What factors determine the ‘3D organization’ of lignins ? ’

:**1**: hypothesis from theoretical simulations of organisation

- CHEMICAL ORGANISATION -

morphological interpretations

:**2**: experimental evidences based on isolated fractions :

- MACROMOLECULAR VARIABILITY -

macromolecular hypothesis and data

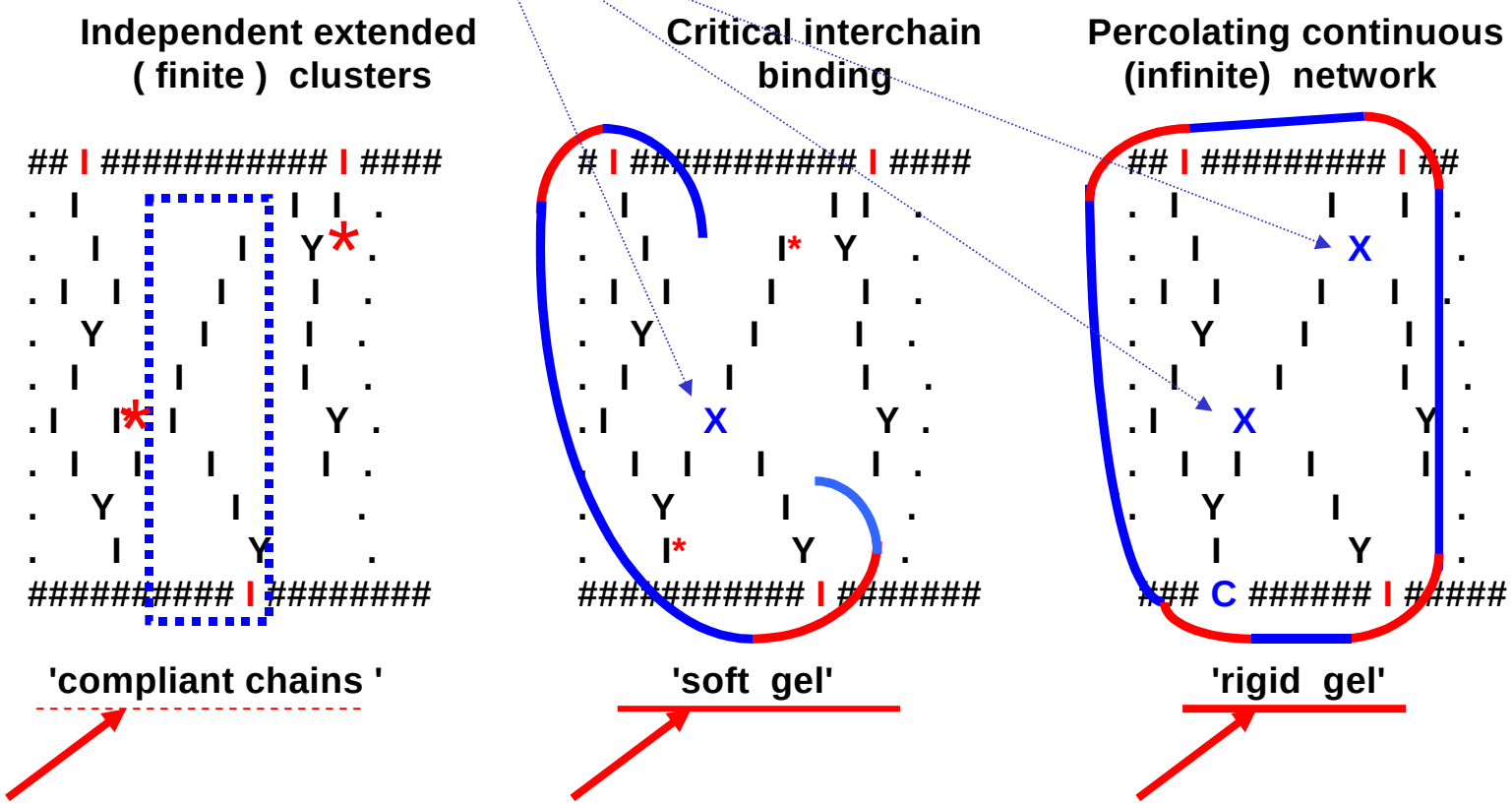
3: in vitro simulation of peroxydasic polymerisation :

- LIGNIN MORPHOGENESIS -

structural model of in situ biosynthesis

CHEMICAL ORGANISATION: *morphological interpretations*:

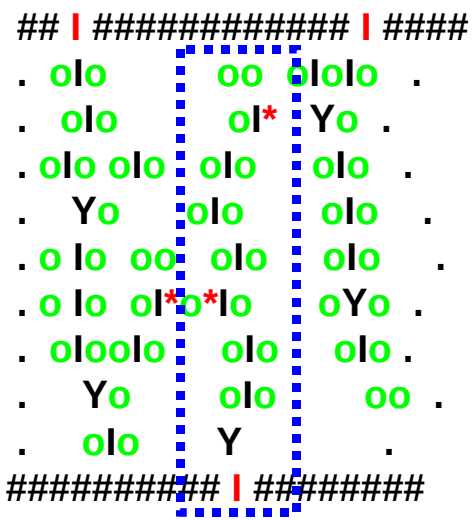
. **local interchain crosslinking into « finite » lignin-polysaccharide clusters**



CHEMICAL ORGANISATION: *morphological interpretations*

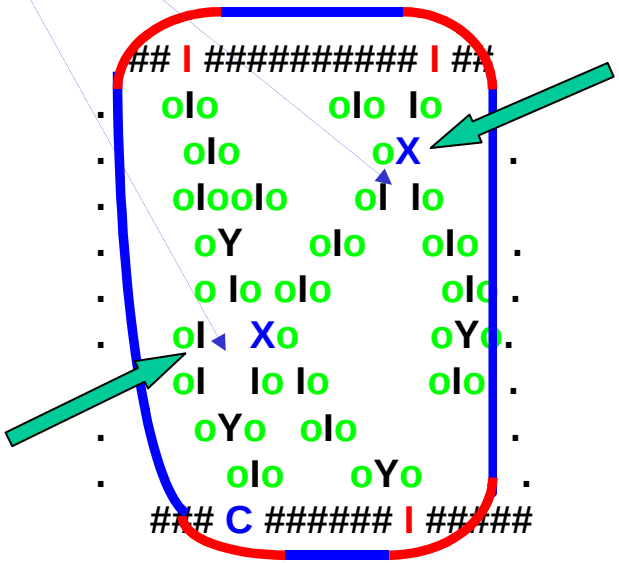
interchain crosslinking and ‘ water desoption’ in lignin-polysaccharide clusters

Independent extended (finite) clusters



'solvated chains '

Percolating continuous (infinite) network

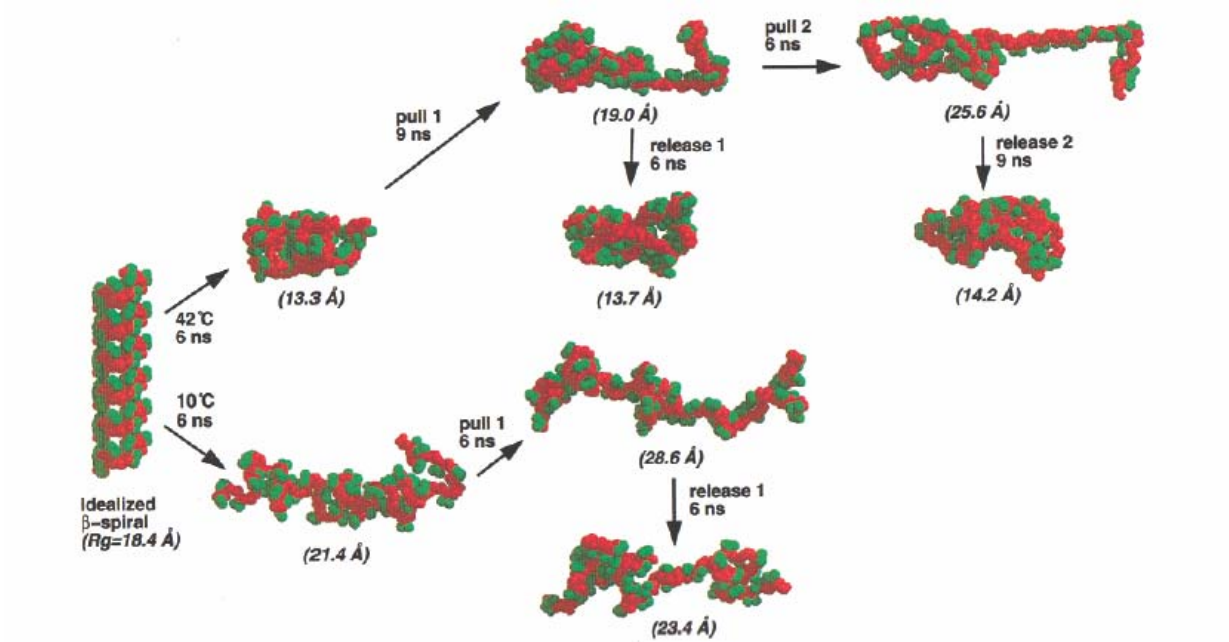


'rigid gel'

CHEMICAL ORGANISATION: *morphological interpretations*

in vitro model simulation of self-organisation in polypeptide hydrogel structures

Chain deformations and transition states of 'fibrous' peptides, (elastin: Urry et al. 1988), .simulated by molecular dynamics including water mobility (Bin et al. 2001, Miao etal. 2003) suggest 'water organisation' as 'entropic motor' of 'hydrophobic agregates'.



Hydrophobic hydratation is an important source of elasticity in elastin based biopolymers ,

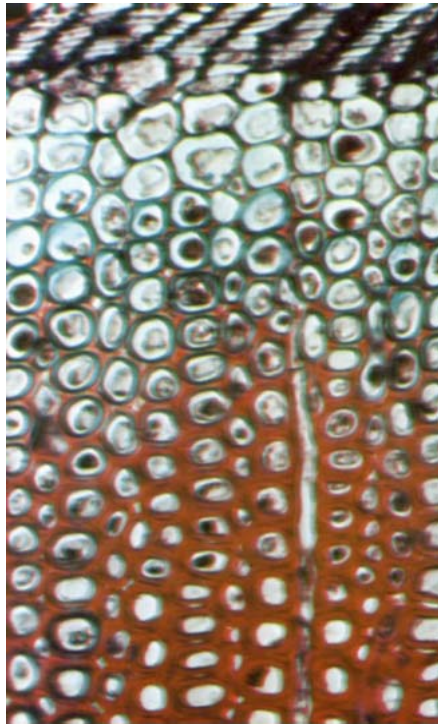
Li B. et al. J. Am. Chem. Soc. ***123*** *,11991.*

CHEMICAL ORGANISATION: *morphological interpretations*

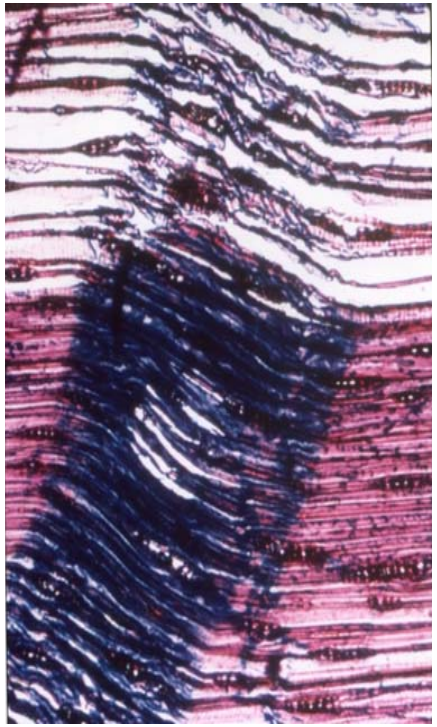
POLYCHROMATIC DYES AND CHROMOPHORIC REAGENTS:

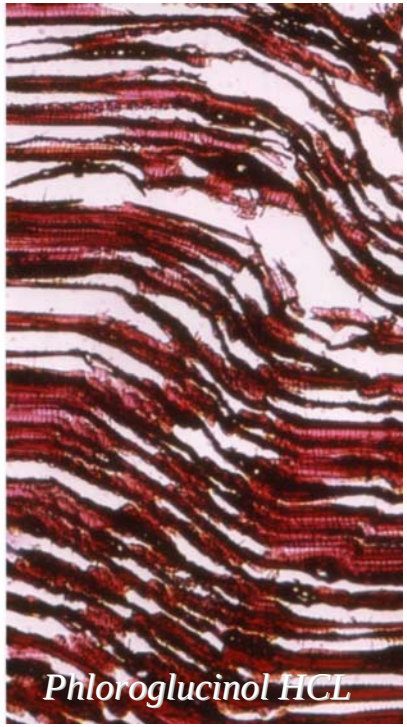
'safranin – anilin blue' contrast between cellulose and lignin

cambium % lignified cells
(Kutscha, 1972)



compression crease
(Bamber,2001)





question:

‘ *What factors determine the ‘3D organization’ of lignins ? ’*

:**1**: hypothesis from theoretical simulations of organisation

- CHEMICAL ORGANISATION -

morphological interpretations

:**2**: experimental evidences based on isolated fractions :

- MACROMOLECULAR VARIABILITY -

macromolecular hypothesis and data

3: in vitro simulation of peroxydasic polymerisation :

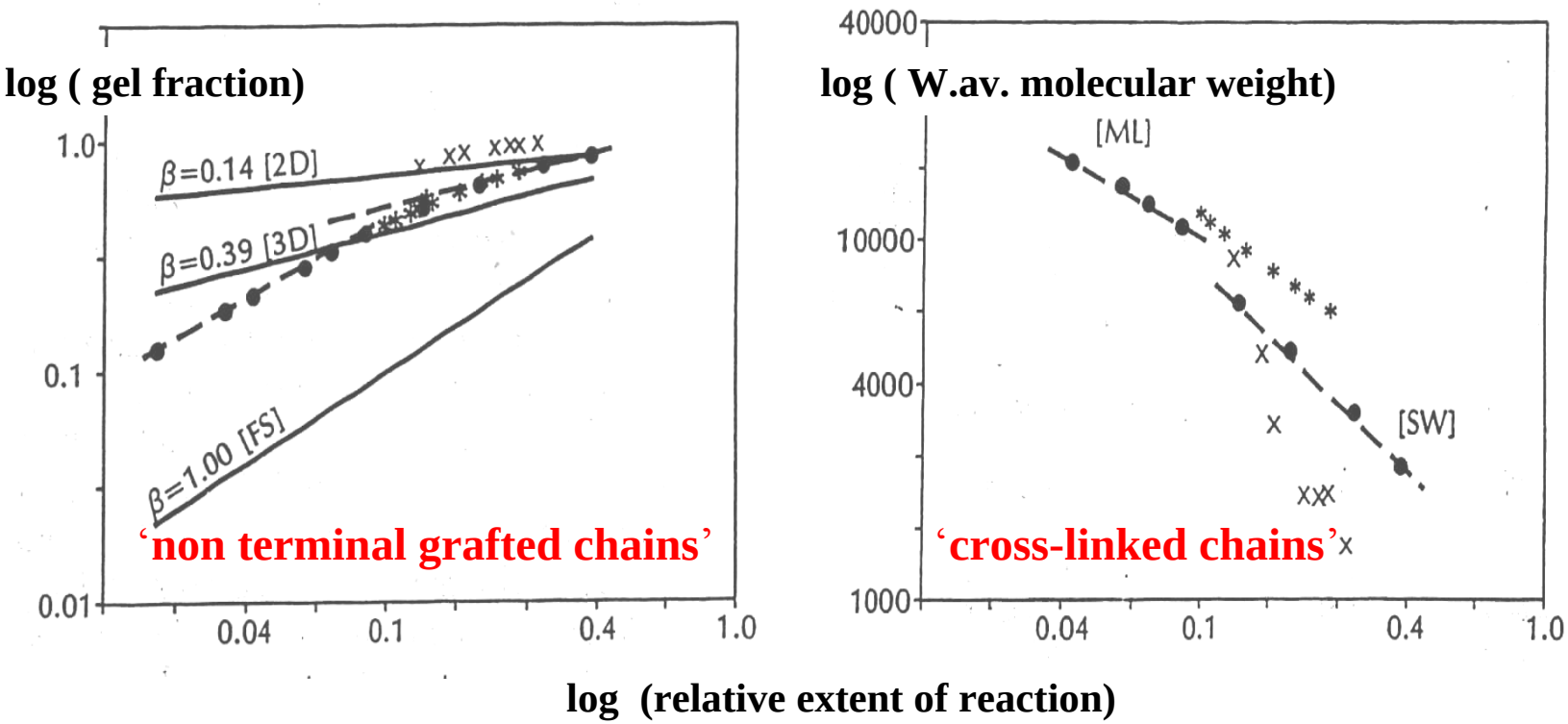
- LIGNIN MORPHOGENESIS -

structural model of in situ biosynthesis

MACROMOLECULAR VARIABILITY: *data and models*

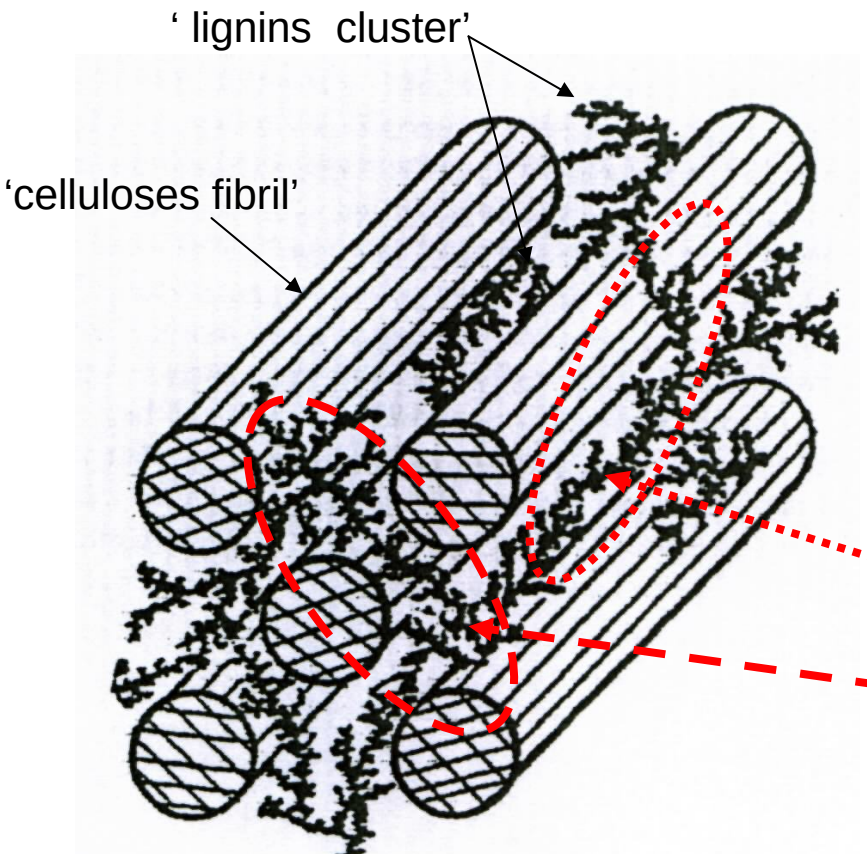
kinetic of delignification: changes in 'lignin cluster' dimensions

(*according to* Leclerc and Olson, **1992**)



MACROMOLECULAR VARIABILITY: *data and models*

'fractal' dimension of lignin networks : 'experimental data'
(*according to* J. Gravitis, **1992**)



Lignin fractal dimension: **Df**

Lignin type (in solution)	**Df**
Spruce: milled wood	2.70
Pine : dioxane	2.44
Pine : kraft	2.56
Kraft : acetylated	3.33
: ' end-wise DHP '	**1.66**
: ' bulk DHP '	**2.62**

MACROMOLECULAR VARIABILITY: *data and models*

hypothetical views on lignin 'macromolecular organisation'

(according to F. Brauns, **1952***)*

« birch lignin does not posses a 'mixed syringyl-guaiacyl lignin structure',

but consists

either of ... **a mixture of two lignins: type I and II** :

type I : **G-G-G-G-G-G-G-G-G-** ; type II : **G-S-G-G-S-G-S-G-G-S-G**

or of .... **a molecule , typeIII**, containing both types I and II:

type III : **G-G-G-G-G-G-G-G-G-↕-G-S-G-G-S-G-S-G-G-S-G**

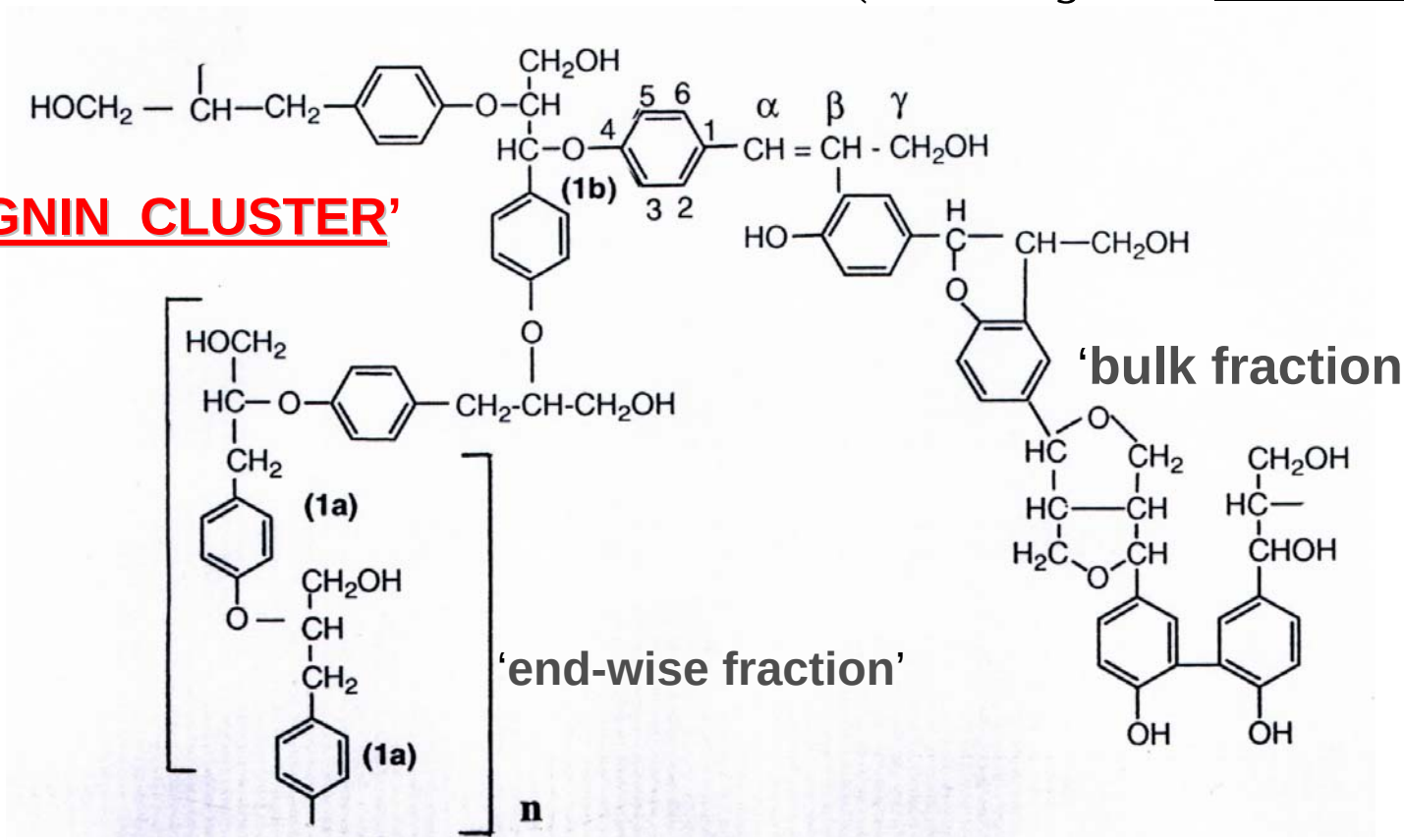
combined in a such way that it is already cleaved at dotted line (↕).'

MACROMOLECULAR VARIABILITY: *data and models*

'hypothetical views on lignin 'macromolecular organisation'

(according to K. Sarkanen, **1971**)

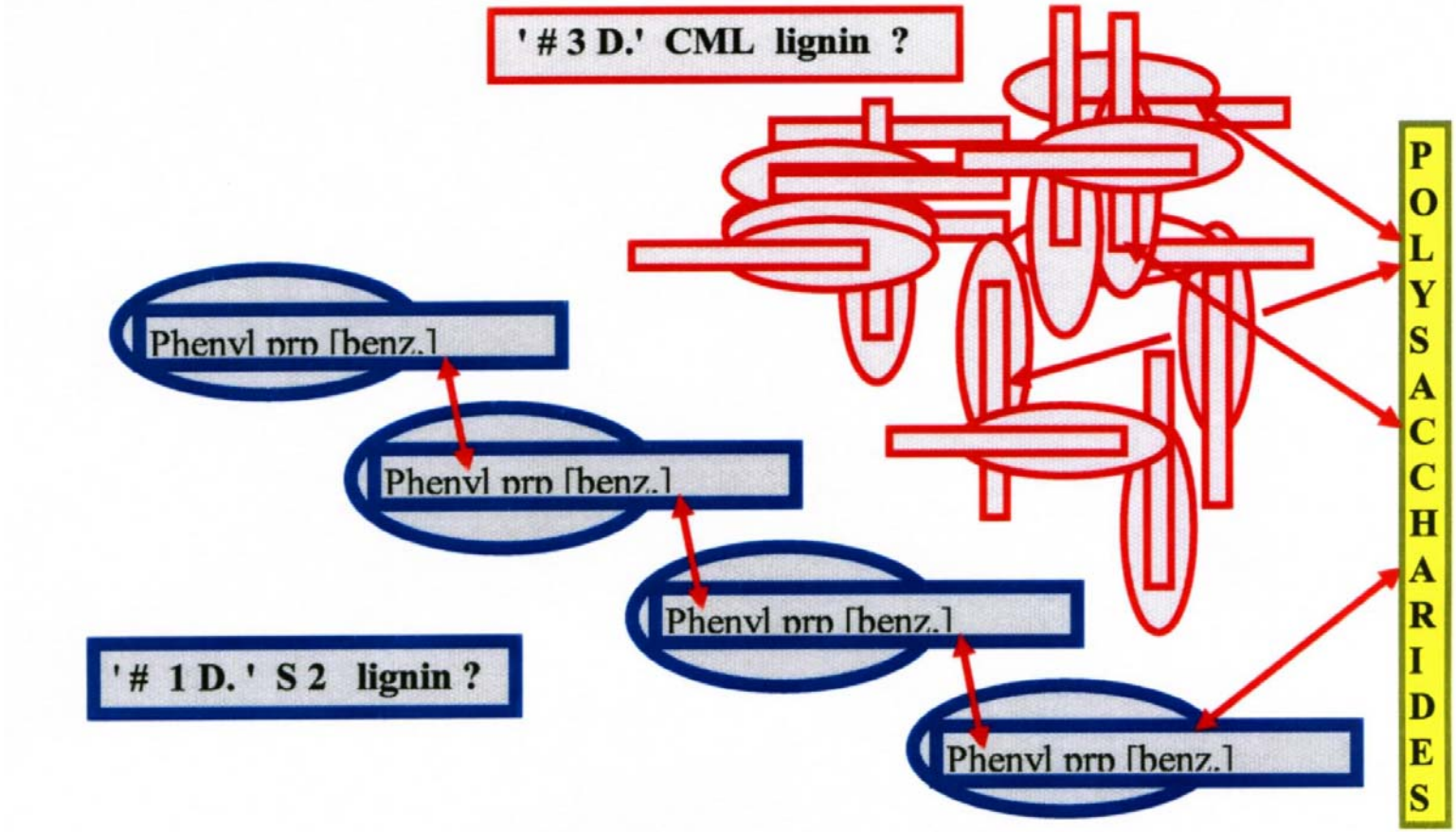
A 'LIGNIN CLUSTER'



BIOLOGICAL VARIABILITY :

hypothetical views on lignin 'macromolecular organisation'

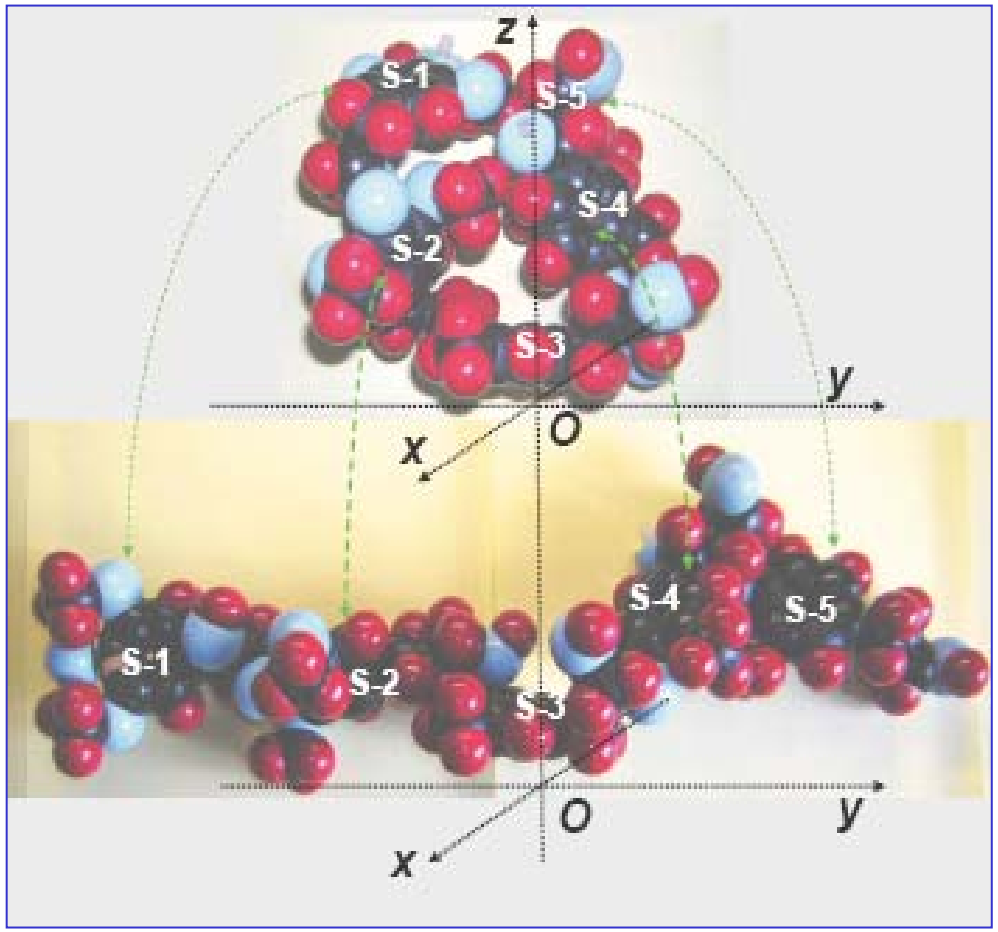
SPATIAL RELATIONS BETWEEN LIGNIN CLUSTERS AND POLYSACCHARIDES



MACROMOLECULAR VARIABILITY: *data and models*

hypothetical views on lignin macromolecular 'transconformations'

*acd. Monties B. 2005, Cellulose Chem. Technol, **39**, 341-367'.*



question:

‘ *What factors determine the ‘3D organization’ of lignins ? ’*

:**1**: hypothesis from theoretical simulations of organisation

- CHEMICAL ORGANISATION -

morphological interpretations

:**2**: experimental evidences based on isolated fractions :

- MACROMOLECULAR VARIABILITY -

macromolecular hypothesis and data

3: in vitro simulation of peroxydasic polymerisation :

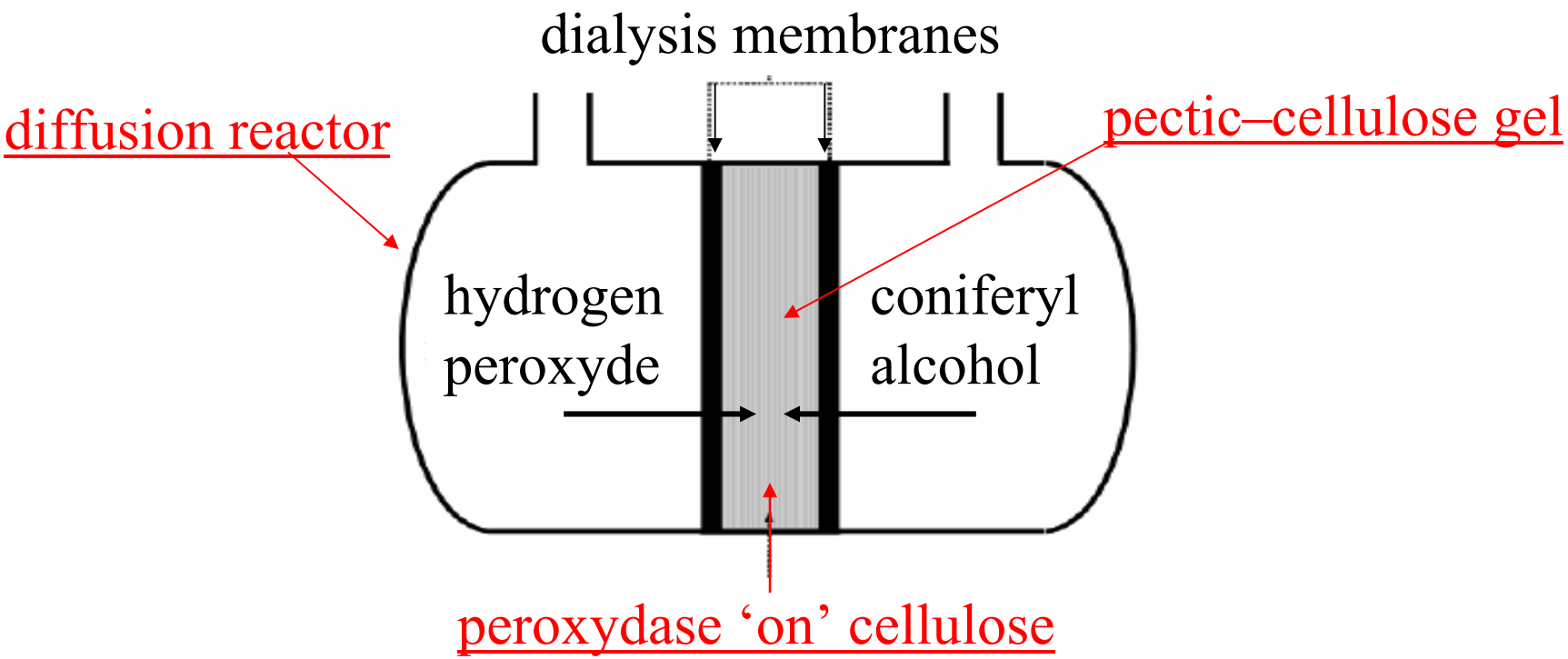
- LIGNIN MORPHOGENESIS -

structural model of in situ biosynthesis

Lignin morphogenesis: model study

in vitro **synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

(according to Touzel et al. 2003*)*



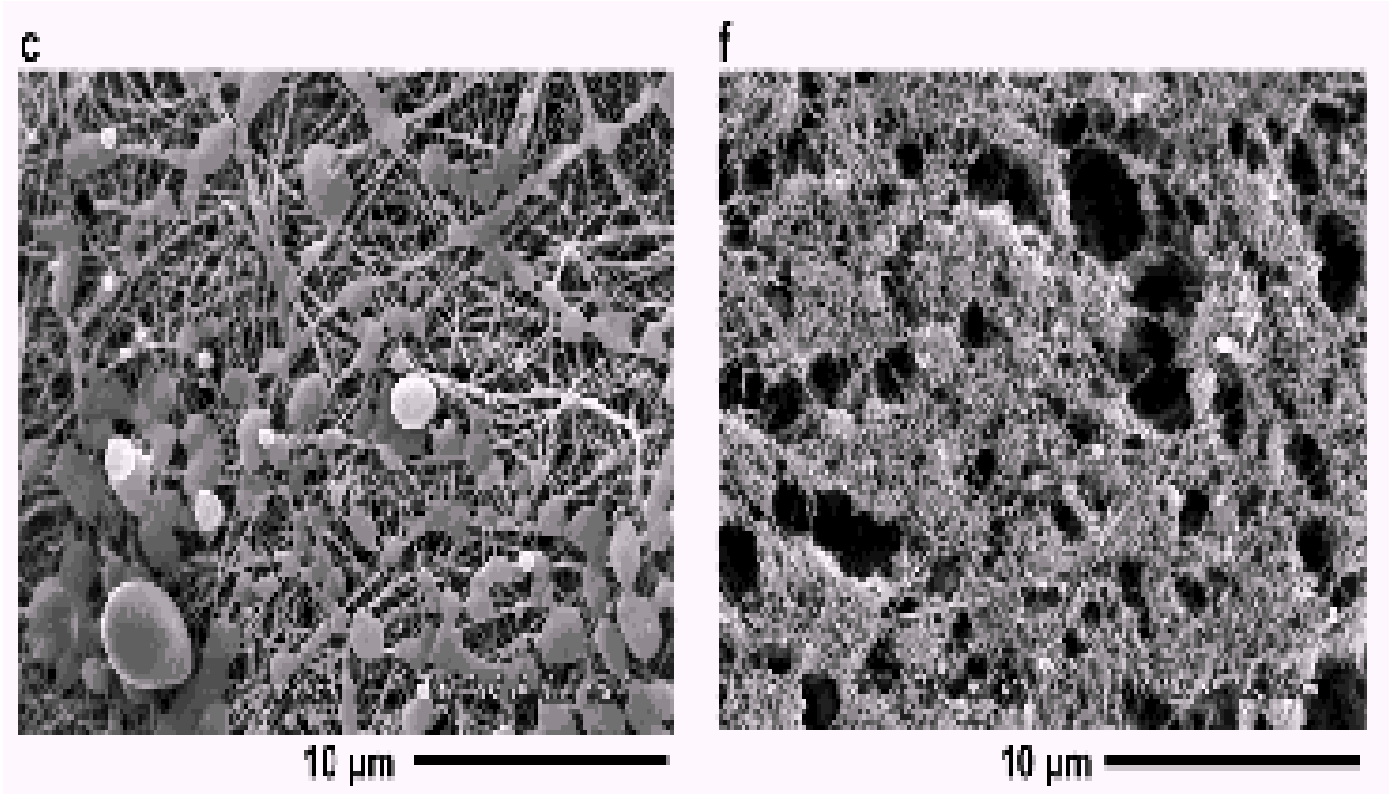
Lignin morphogenesis: model study

in vitro **synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

(according to Touzel et al. 2003*)*

on 'cellulose gel' alone

on pectic 'cellulose gel'



Lignin morphogenesis: model study

***in vitro* synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

(according to Touzel et al. 2003*)*

formation of non condensed β-O-4 linkages during DHP polymerisation

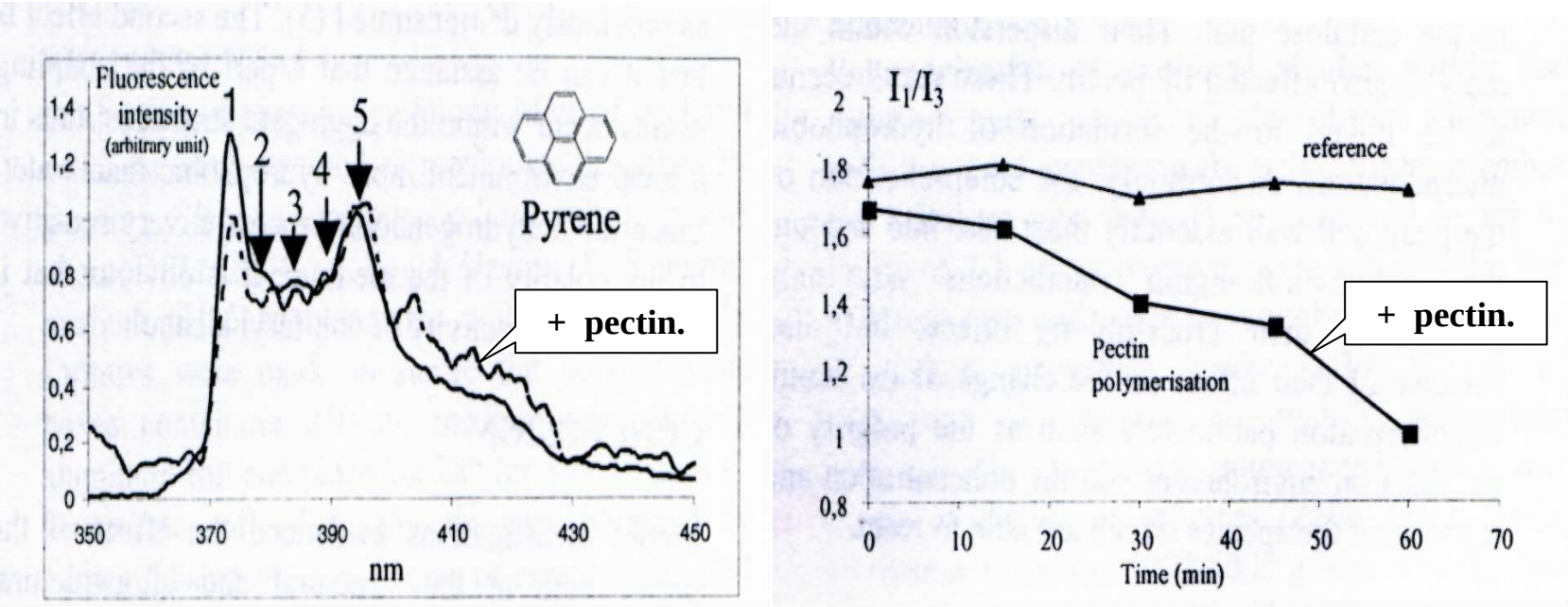
	cellulose/DHPs composite	cellulose/pectin/DHPs composite
pectin content (% of dry weight)	0	8
DHPs content (% of dry weight)	27	26
thioacidolysis yield (μmol/g of DHP)	860 ± 30	1180 ± 80

Lignin morphogenesis: model study

in vitro **synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

(according to Lairez et al. 2005*)*

Pectin effects on the formation of hydrophobic microdomains during poymerisation:

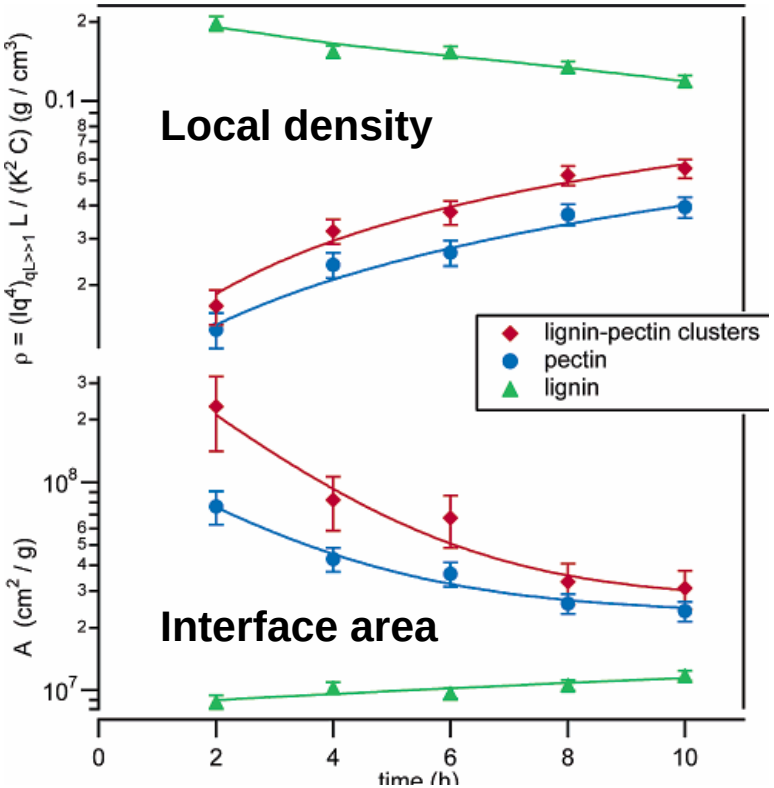


Lignin morphogenesis: model study

in vitro **synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

. *(according to* Lairez et al. 2005 *Biomacromolecules)*

Pectin effects on 'local density' and 'volume fraction' of the lignin-pectin clusters

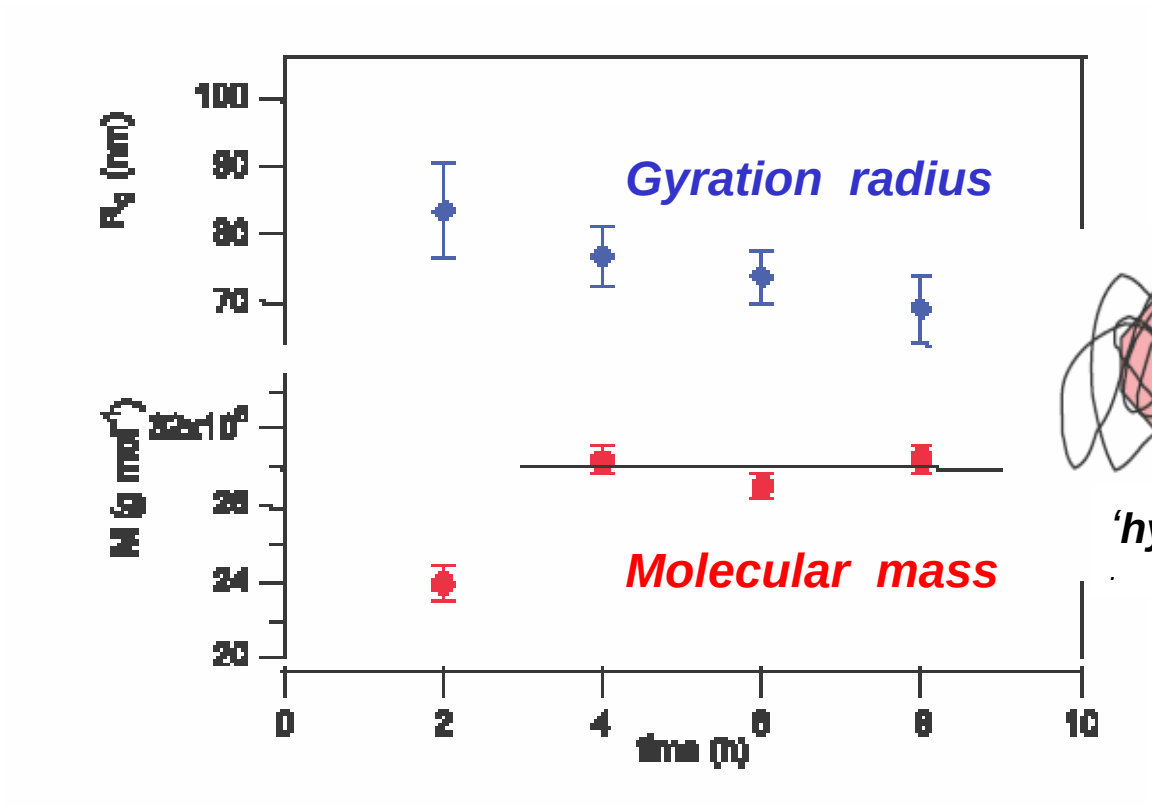


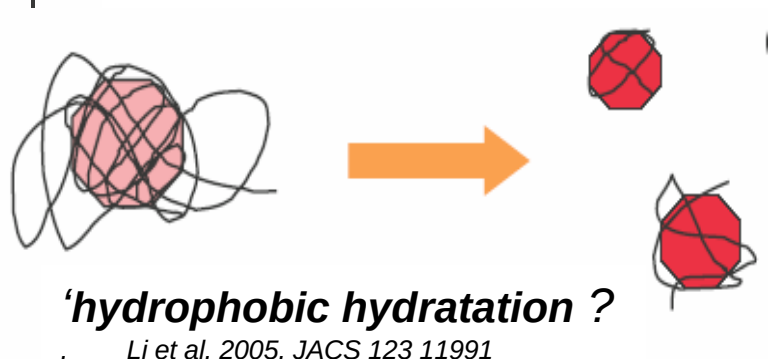
Lignin morphogenesis: model study

***in vitro* synthesis of dehydropolymers in 'hydrogel' phase**

(according to Cathala et al. IWPC-2006*)*

Pectin effects on gyration radius and molecular mass of the lignin-pectin clusters





'hydrophobic hydratation ?

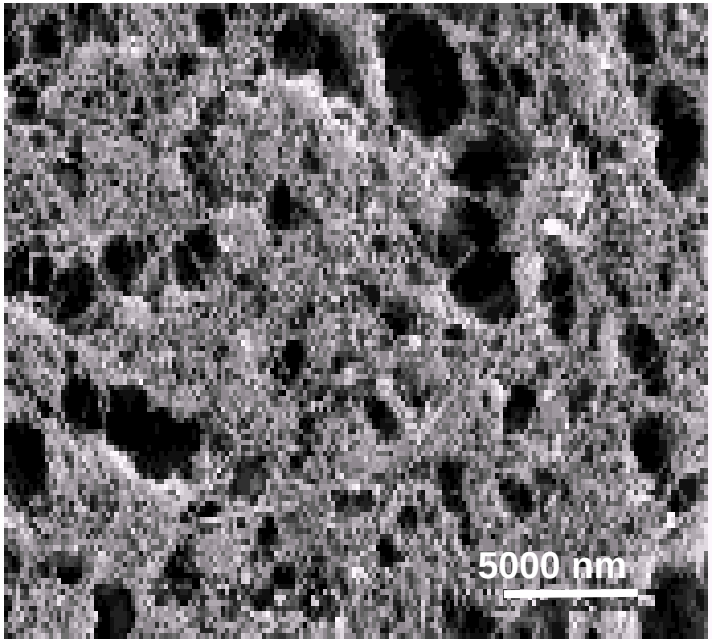
Li et al. 2005, JACS 123 11991

Chemical morphogenesis of lignins ?

in vitro simulation and in vivo observation of lignin 'clusters' self-organisation

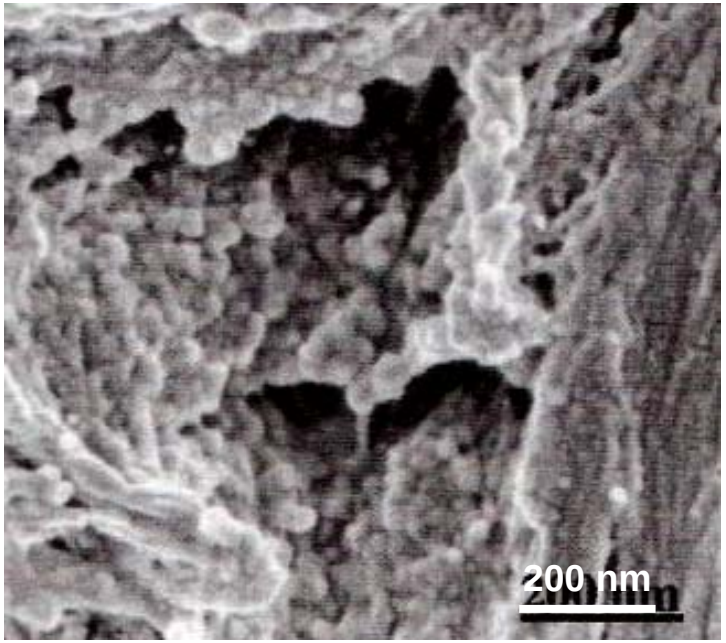
'agregates' on cellulose-pectin mat

(Touzel et al. 2003 J. Agric. Biol. Chem.51, 981- 986)



'modules' in Gingko xylem cell corner region

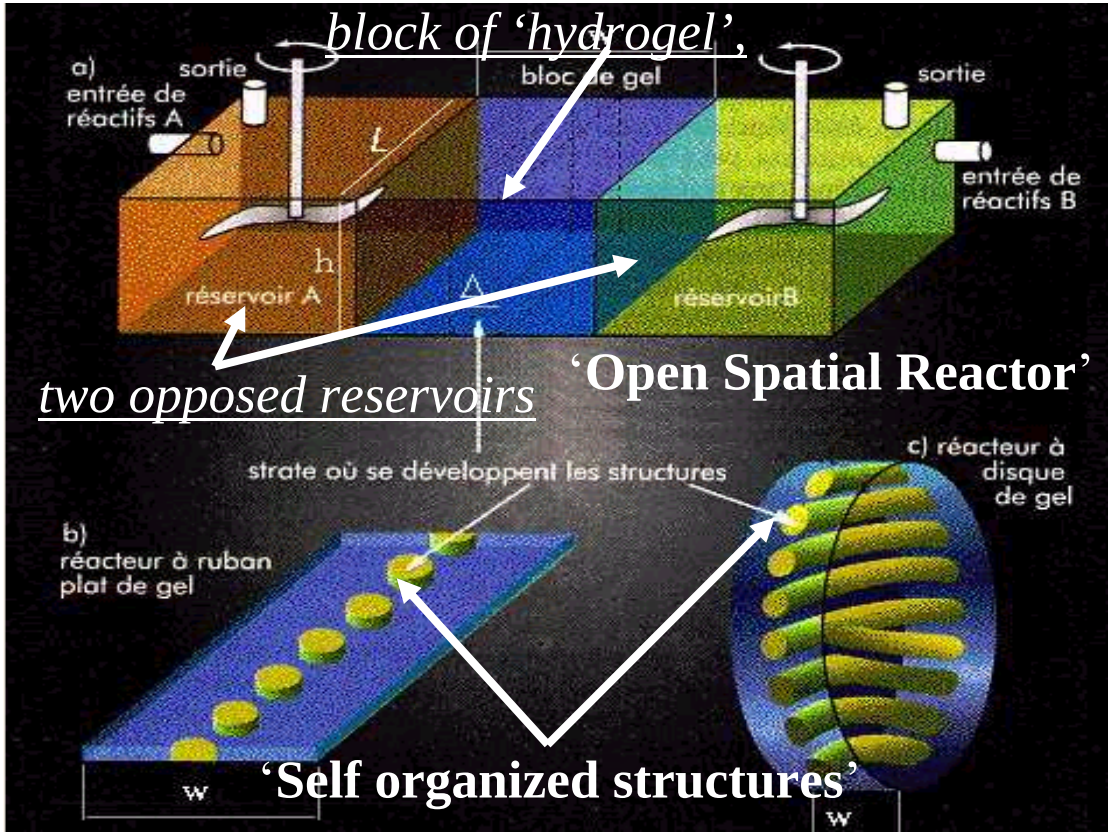
(Terashima et al. 2004,C. R. Biologies, 327, 903-910)



Chemical morphogenesis of lignins ?

***in vitro* synthesis of self-organized polymer spacial structures**

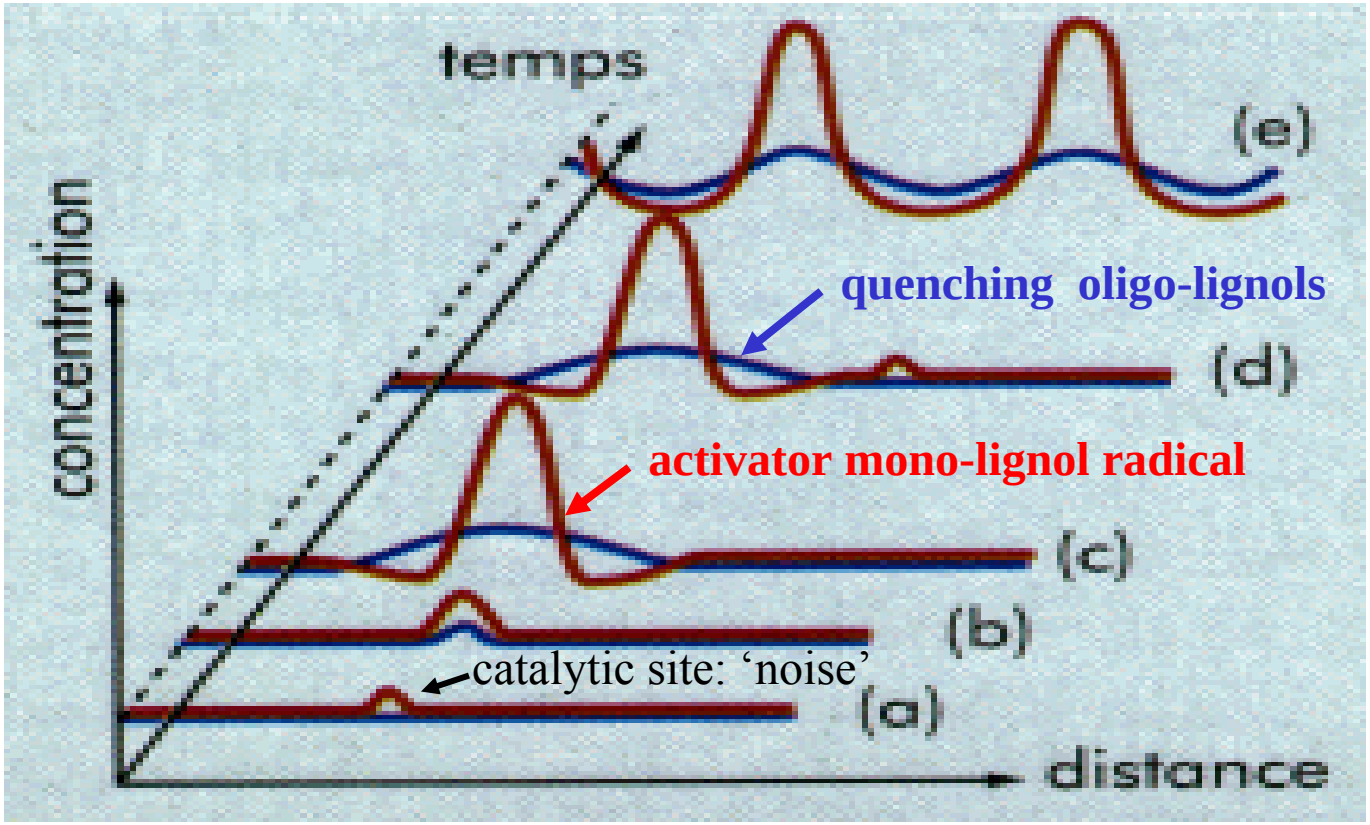
. *(figure adapted from* .de Kepper et al. *2000* , www. *crpp.u-bordeaux.fr)*



Chemical morphogenesis of lignins ?

local auto-catalytic accumulation of lignin by peroxidatic reactions of lignol radicals?

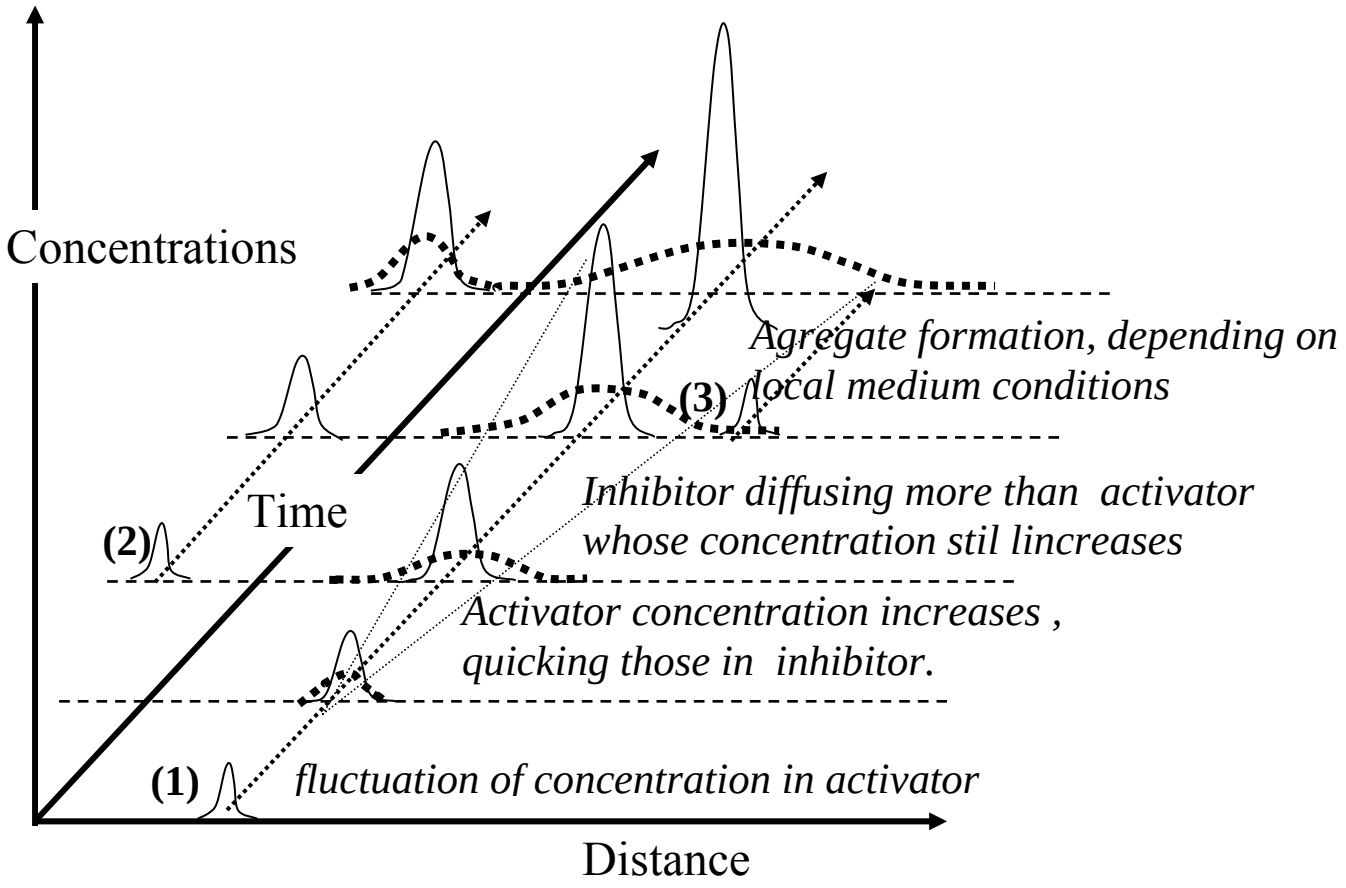
*(figure adapted from.*de Kepper *and* J. Boisonnades:*www. crpp.u-bordeaux.fr)*



Chemical morphogenesis of lignins ?

local auto-catalytic accumulation of lignin by peroxidatic reactions of lignol radicals and by cooperative binding of (mono)lignols on soon aggregates lignin fractions

(adapted from B. Monties 2005 Cell. Chem. Technol. 39, 341- 367 and 2003 Adv.Phytochem, 1, 1-48)



Conclusions :

the possibility of formation of only one 'dominant' type of hetero-coplymers was described in 'La nouvelle alliance' (chapVI, § 3) by Prigogine and Stengers due to thermodynamic fluctuations during auto-catalized polymrr self organisaion !

- **BIOLOGICAL VARIABILITY** :
  Sequential isolations and comparative analysis of lignin provide unambiguous evidences of the large biological variability of the ***mononomeric composition*** *of these lignin fractions. More exhaustive determinations of the related* ***'macromolecular dimensions'*** *are thus required.*
- **LIGNIN MORPHOGENESIS** :
  In vitro *synthesis of model lignin networks successfully simulates the complex granular structure of* in situ *lignin.*
- *The occurrence of various* ***self-organisation processes*** *suggest a* ***' (bio-) chemical morphogenesis'*** *of lignins. Such phenomenon could significantly contribute to the variability of the structure and the reactivity of both the 'native lignins' and related 'industrial woody products'.*

BIOLOGICAL VARIABILITY :

Data not shown at Reims, previously rewieved in 'Botanical variability and mechanical function of lignins...', 2003, Adv.Phytochemistry, 1, 1-48, Resarch Signpost pub.

:1: monomeric composition:

Sequential isolation of lignin fractions:

. ('typical' xylem from normal wood samples)

Comparison of selected woody samples :

. ('atypical' xylem from reaction woods, variants, ...)

:2: macromolecular structure:

Pulping experiments (delignification kinetic):

. (molecular size of collected fractions)

BIOLOGICAL VARIABILITY :

:1: monomeric composition:

Sequential isolation of lignin fractions:

. ('typical' xylem from normal wood samples)

BIOLOGICAL VARIABILITY :

SEQUENTIAL ISOLATION OF LIGNIN FRACTIONS FROM WOOD

EXTRACTIVE FREE (WOOD) SAMPLE

↓

FIRST VIBRATORY BALL MILLING

RESIDUE ← → fraction 1: « **MILLED WOOD LIGNIN** »

MIXED 'CELLULASES' HYDROLYSIS

RESIDUE ← → fraction 2: « **ENZYME LIGNIN** »

SECOND VIBRATORY BALL MILLING

RESIDUE ← → fraction 3: « **RESIDUAL LIGNIN** »

BIOLOGICAL VARIABILITY :

COMPARATIVE DEPOLYMERISATION OF ISOLATED FRACTIONS

Monom.rec µmol./g KL	MWL fract. *ratio*	MWL fract. **yield**	Enz. fract. *ratio*	Enz. fract. **yield**	*Reference* **method**
Populus	*1.20*	**1020**	*1.67*	**1240**	*Lapierre (1986)*
Cerasus	*1.37*	**1122**	*2.51*	**1532**	*Tollier (1986)* *Gaudillere (1990)* **thioacidolysis**
Alnus	*1.40*	**993**	*1.95*	**1344**	
Quercus	*1.14*	**807**	*2.47*	**1388**	
Acer	*1.27*	**1116**	*2.45*	**1710**	
Triticum	*1.39*	**1080**	*1.14*	**1530**	
Zea	*1.19*	**370**	*1.53*	**360**	
Pinus	*ns.*	**51.1%**	*ns.*	**56.9%**	*Ikeda(2001)* **dfrc**

BIOLOGICAL VARIABILITY :

:1: monomeric composition:

Comparison of atypical woody samples :

Reaction wood	: Buxus	(*atypical Angiosperm)*
.	: Eucalyptus	(*atypical Angiosperm*),
. Lignified organ	: Rose	*(flower pedoncule),*
.	: Fescue	*(herbaceous stem),*
Manipulated plant	: Kenaf	(growth factors)

BIOLOGICAL VARIABILITY :

chemical changes induced in 'woody' stem lignin : 'reaction wood'

Buxus (*) wood	Growth str. (µm. m $^{-1}$)	Kl. Lignin % c.w.r.	Monomeric units Yield	H/G/S %
1 (upper)	**- 741**	*27.8*	**1491**	tr / ***66*** /34
2	**- 159**	*27.0*	**1484**	tr / ***65*** /36
4	**+ 616**	*27.3*	**1398**	tr / ***67*** / 33
6	**+ 2018**	*29.0*	**1226**	3 / **71** / 26
7(lower)	**+ 2782**	*31.0*	**947**	3 / ***71*** / 26

(*) Bailléres et al. 1991*: similar results obtained with* **Eucalyptus** *(*Bailléres et al,1990*)*

BIOLOGICAL VARIABILITY :

chemical changes induced in 'herbaceous' stem lignin: 'growth factors'

Kenaf (*) stem	Tissue sample	Treatment		
		none	IAA+GA	ethrel
K. Lignin (% c.w.)	**bark**	**6.8**	**8.4**	**18.9**
	wood	*14.0*	*19.2*	*14.9*
Alc.extract. (% c.w.)	**bark**	**69**	**56**	**78**
	wood	*50*	*34*	*42*
S / G (µmol.g KL)	**bark**	**8.10**	**4.84**	**3.11**
	wood	*1.33*	*1.52*	*1.38*
S + G (µmol.g KL)	**bark**	**1766**	**1163**	**415**
	wood	*2270*	*1717*	*1776*

(*) Tollier et al. 1991*: similar results obtained with* **Coleus** *stems (* Aloni et al,1990*)*

BIOLOGICAL VARIABILITY :

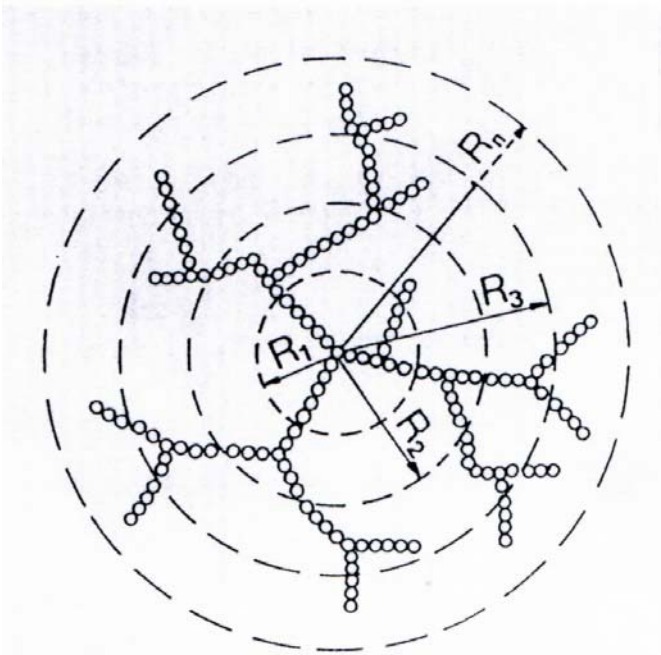
effect of the polymerisation conditions on DHP composition

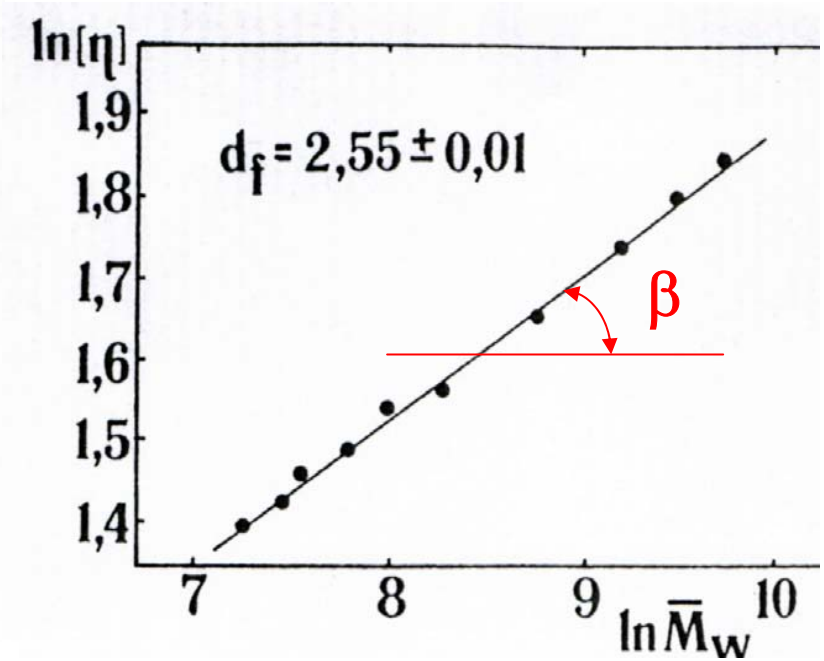
Monom.units (µmol / g KL)	medium , oxidant , support	*n.cd.-ether*	*terminal.*
	Spruce wood (reference)	**1260**	**90**
Tollier et al.. (1991)	water , H_2O_2 , no water , Gluc.-oxid., no	740 700	300 200
Terashima et al. (1996)	water , Gluc.-oxid., no water , Gluc.-oxid., **pectin**	810 1050	400 435
Cathala et al. (1998)	water , fast - H_2O_2, no water , slow - H_2O_2 , no	$540^{5\%}$ $620^{5\%}$	n.a. n.a.
Cathala et al. (2003)	cellulose, slow - H_2O_2 , no cellulose, slow - H_2O_2 , **pectin**	860 118O	n.a. n.a.

BIOLOGICAL VARIABILITY :

'fractal' dimension of lignin networks : 'principles of determination'

(*according to* J. Gravitis, 1992)





clic here for the next and end of visit

L-2-G INRA-Reims seminar (Nov. 2007)

presentation of question 2: ‘ how optimise the current utilisations of lignins ? ’:

This second question deals with the related recurrent concerns :1: *improvement of the technical utilizations of industrial lignins* and of :2: *optimization of their societal added value*. Inevitably ‘related’, as any widespread optimization requires a strait fitting of the specific utilizations, these two questions of ‘upgrading’, ‘valorisation’ in French, are thus also ‘recurrent’ as illustrated by a ‘2’ in the ‘LIG2G’ title of the seminar echoing to a current ‘third-?-oil-shock’ with reference to ‘the’ first one, around the 1975-85..

Following the possibilities shown by Prigogine and coworkers (see question) and also by others scientists, to simulate the ‘dynamic behaviour and the optimization of the organization of human societal activities’, a possibility of modelling is here suggested in the case of upgrading of competitive utilizations of industrial lignins. Following the principles and suggestion by Nicolis and Prigogine in their chapter 6 of ‘Exploring complexity: ...’, as shown in next slides, there is obviously here a draft only to invite to applied here their ‘dissipative structure theory’, recalling further that the author himself underlined that “reader may... work out the theory using other forms of relations laws” when he introduced this methodology for analysing urban vehicular traffic! Such a possibility is thus qualitatively illustrated using the metaphoric image, where dynamic systems are trapped in rough landscape of connected valleys as outlined by these authors and more generally also by others P. Bak et al. in 1997 Physica D 107,143, for example.

Accounting the INRA-technical and societal ReDoc-documentation focussed on the ‘potential and current utilisations of lignins’ collected at Grignon lab. during the 1980 decade of ‘ rise and fall of the societal concern to the oil-shock-1’, a two facet exploration of a such optimization seems possible based on :**1**: a retrospective evaluation of data (know-how), by ‘analysis’of data bases (data = objective indexed printed documents) and :**2**: prospective use of knowledges (know-why),by ‘synthesis’ from knowledge bases (knowledge = subjective classified annotated data).

Even of limited in size, the abridged ‘ValoLign’- ReDoc shown as part 3, allows to explore such type of ‘ societal recueil’ and thus prompt anyone who would... to check the relevance of its of analysis!

Question:

‘ how optimise the current utilisations of lignins ? ’:

:**1**: **retrospective evaluation of data :** (know-how),

- ‘analysis’ of data bases **-**

(*data = objective indexed printed documents*)

:**2**: **prospective use of knowledges :** (know-why)

- ‘synthesis’ from knowledge bases **-**

(*knowledge = subjective classified annotated data*)

Analysis of data on lignins: 'the ValoLign data base':

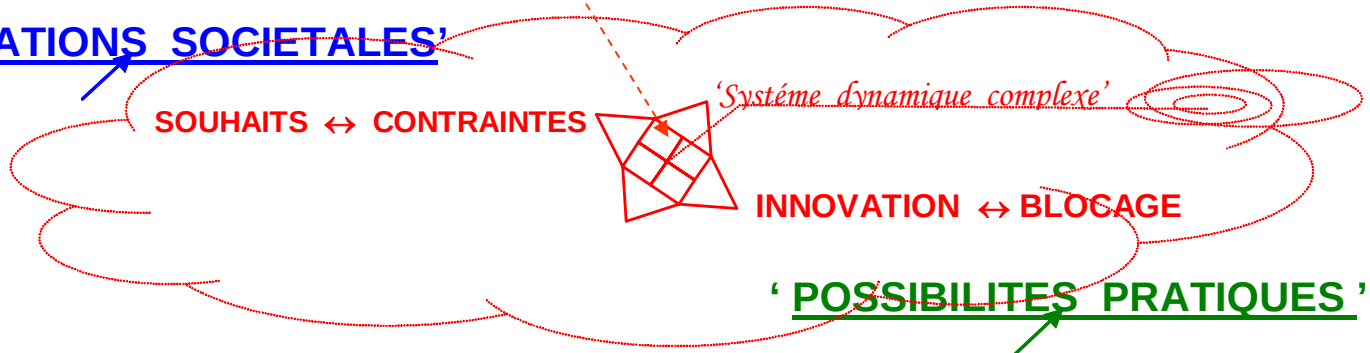
. 'ValoLign' combination of technical and societal data for the 1975 -1985 decade

DOCUMENTS D'EXPERTS ET DE SYNTHESE :

b 251 : Valorisation coproduit s lignocell. pailles : rapports expert généraux .
251Valo; pailles: papier, aliment bétail, composés chimiques, combustibles
Ref. Aut.:rpt expert: APRIA, Min. Agri.(Fr)., AFRC(UK), , Chemrawn (US),
Ref. Aut.:rpt indust: Unilever, Cofna, Comes, Fredericia, Danstraw, ICI,
b 253 : Valorisation coproduit s lignocell. pailles : procédés papetiers, fibres pailles.
253 Principe transfo.cuissons oxygène: NACO, CTP, ...
253 Compétition usages et techno :rapports PIRA, (UK, DK, CEE...),
Ref. Aut.: Sinner, Lachenal, Magdelun,.Rexen, .. .

' MOTIVATIONS SOCIETALES'

.



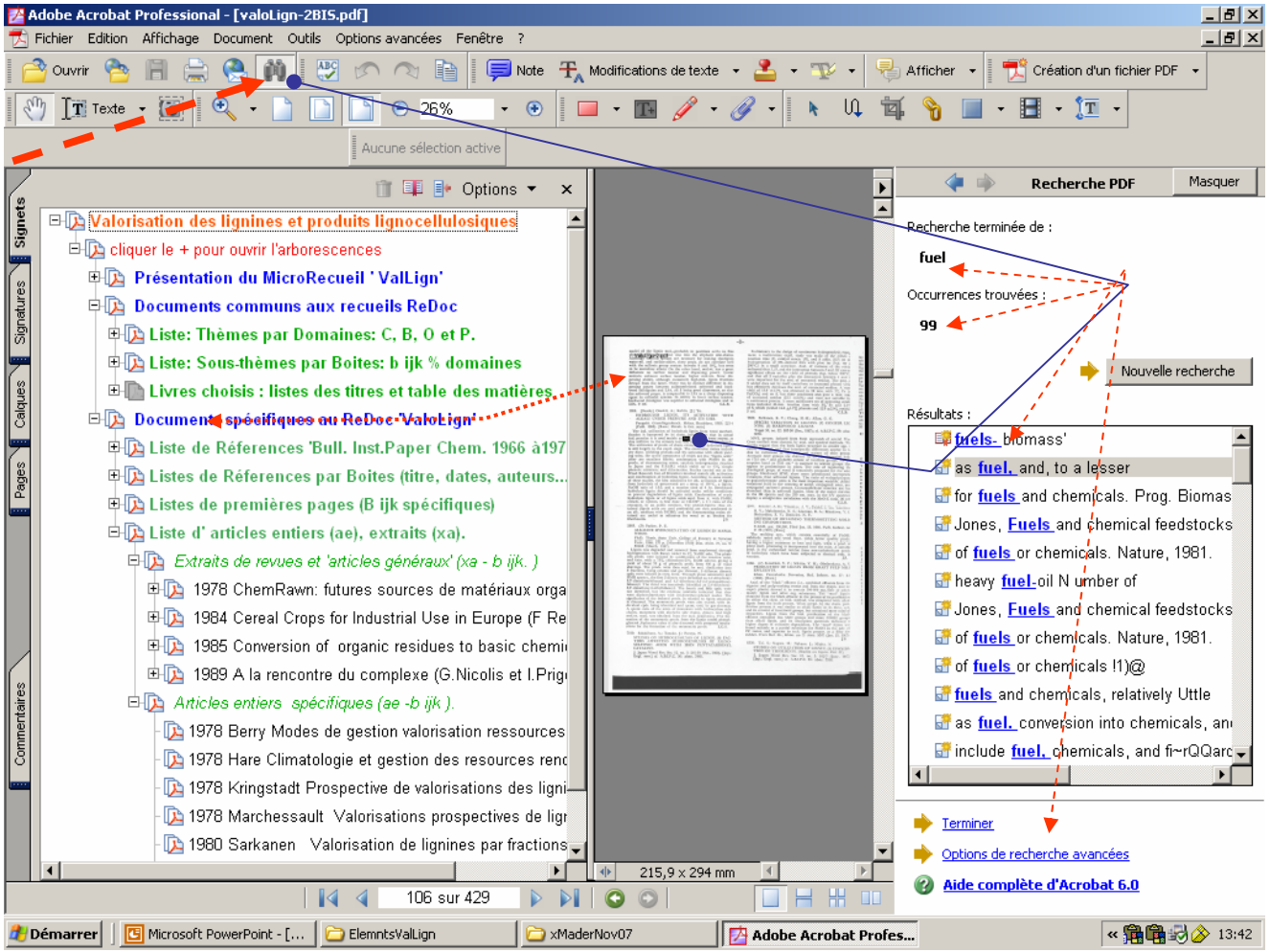
' POSSIBILITES PRATIQUES '

DOCUMENTS TECHNIQUES SPECIALISES :

b 254 :Valorisation coproduit lignocell. pailles : rapports CEE généraux
254Modéles multi- valo (matériaux, énergie, chimie, résidus orga; sols,
Ref. Aut.: Rexen, Munck, Mounier, ..
b 255 : Valorisation coproduit s lignocell. pailles : aspects agronomique
255RValorisation des sous produits / protection sols ;
Ref. Aut. Regnault, Devienne,
b 256 : Valorisation coproduit lignocell. lignines: types de valorisation
256Principe, priorités chimie fine, pharmaco.: Batelle, I.P. / Hoechst.
Ref. Aut.: Lindberg, Kringstadt, Schweers, Goldstein, Glasser, Pizzi,
b 257 : Valorisation coproduits lignocell. : polymères dérivés lignines ..
257produits mono-, macro- et poly-mères ex fract. lignine papet.
Ref. Aut.: Sarkanen, Meister, Forss, Lindberg, Chum, ..

Analysis of data on lignins: 'the ValoLign data base':

systematic research of technical and societal data in the Valolign 'ReDoc' file



Analysis of data on lignins: 'the ValoLign data base':

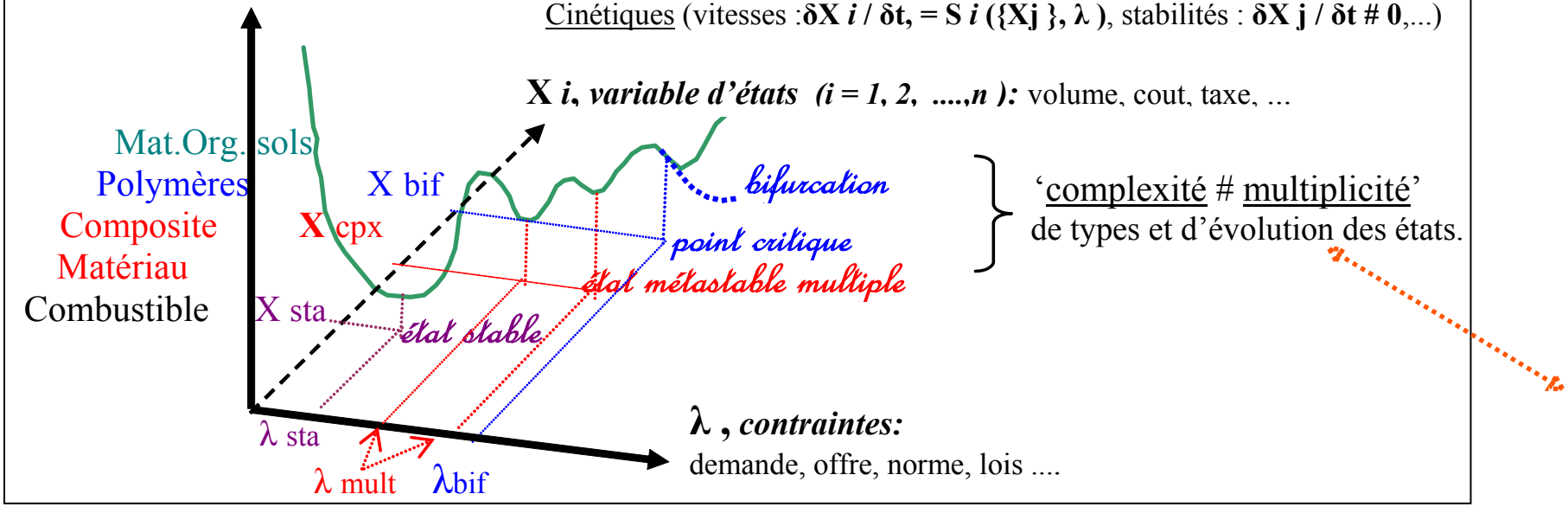
identification of technical variables and societal parameters of the Valolign 'system'

S,t (λ, X) : valeur d'état instantanée du système: fonction du temps et des variables: λ , X,

λ : contraintes, souhaits : paramètres de contrôle d'état du système

X : blocages, innovations : variable de décision de l'état du système

S,t (λ, X) , *caractéristique d'états* : Energie (totale, interne,..), Matière (recyclé, substitué, ...), Cinétiques (vitesses :**δX *i* / δt, = S *i* ({Xj }, λ)**, stabilités : **δX j / δt # 0**,...)

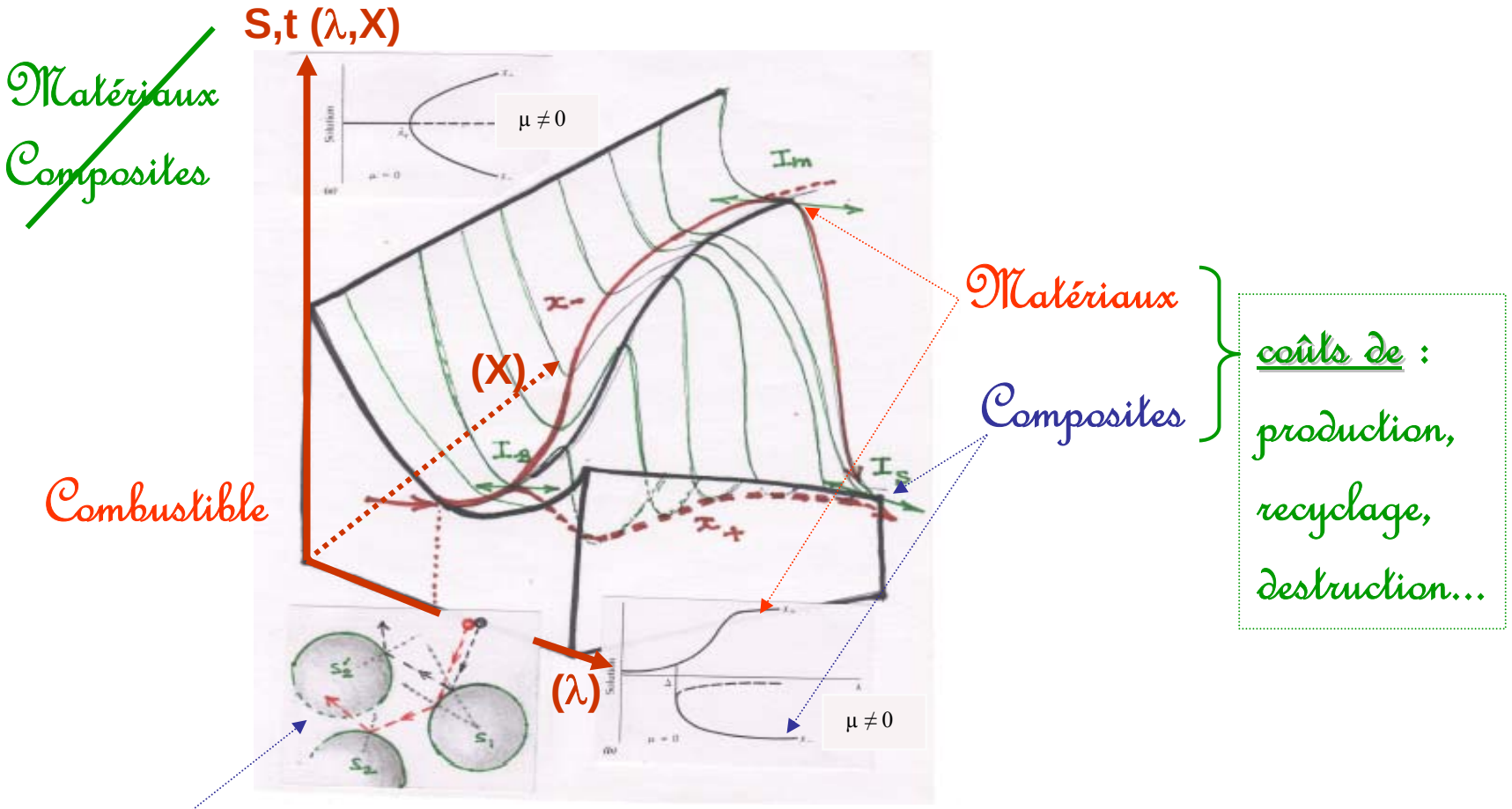


'complexité # multiplicité' de types et d'évolution des états.

Synthesis of data on lignins: ‘the ValoLign knowledge base’.

retroaction loop between sociétal parameters as ‘dynamic’ factor of Valolign as ‘complex system’

(*symétrie de bifurcation, μ =0, disparaissant aussi petite que soit μ ≠ 0 : seconde contrainte*)



(*Image de ‘grande’ instabilité de trajectoires, divergence, résultant de ‘petite’ perturbation*)

GRÉGOIRE NICOLIS
ILYA PRIGOGINE

A la rencontre du complexe

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION
Château de Grignon
78850 Thiverval-Grignon
Institut national agronomique Paris-Grignon
Tel : 01 30 81 54 13
Fax : 01 30 81 54 32

TRADUIT DE L'ANGLAIS
SOUS LA DIRECTION
DE JACQUES CHANU

accéssibles via 'Signets':
numérisés sous.pdf, suivent à la suite, des extraits, 'ae', de la table des chapitres et introduction puis des exemples et des applications à divers systèmes ouverts thermodynamiques 1:physiques, 2 auto catalytiques chimies, 3: auto organisation humains et..4: quelque rappels mathemaisés de l'analyse de ces faits 'complexes't*

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
G 2002/704
le 10.12.2002
SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION - GRIGNON

PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

SOMMAIRE

Introduction, 1

1 - LA COMPLEXITÉ DANS LA NATURE, 9

1.1. Qu'est-ce que la complexité ?, 9
1.2. Auto-organisation dans les systèmes physicochimiques : naissance de la complexité, 12
1.3. Convection thermique, prototype de phénomènes d'auto-organisation en physique, 13
1.4. Auto-organisation en chimie, 21
1.5. Complexité physicochimique et complexité algorithmique, 34
1.6. Autres exemples de comportements complexes observables à notre échelle, 37
1.7. Retour aux systèmes biologiques, 41
1.8. La complexité à l'échelle planétaire et cosmique, 48
1.9. Les forces face aux corrélations. Un sommaire, 54

2 - LE VOCABULAIRE DE LA COMPLEXITÉ, 61

2.1. Les systèmes conservatifs, 61
2.2. Les systèmes dissipatifs, 67
2.3. Equilibre mécanique et équilibre thermodynamique. Contraintes de non-équilibre, 72
2.4. Non-linéarités et rétroactions, 75
2.5. Les multiples facettes du Second Principe, 82
2.6. La stabilité, 87
2.7. Bifurcation et rupture de symétrie, 95
2.8. Ordre et corrélations, 99

3 - SYSTÈMES DYNAMIQUES ET COMPLEXITÉ, 105

3.1. La géométrie de l'espace des phases, 105
3.2. Mesures dans l'espace des phases, 109
3.3. Les systèmes conservatifs intégrables, 116
3.4. Bifurcation dans un système dissipatif simple : la recherche d'archétypes de la complexité, 123
3.5. Les systèmes dissipatifs dans l'espace des phases à deux dimensions. Les cycles limites, 129
3.6. Réduction à des systèmes de basse dimensionnalité : paramètres d'ordre et formes normales, 135
3.7. Espace des phases revisité : variétés topologiques et fractals, 143
3.8. Systèmes conservatifs non intégrables. La nouvelle mécanique, 150
3.9. Un modèle de mouvement instable : le fer à cheval, 157
3.10. Les systèmes dissipatifs dans les espaces de phases multi-dimensionnels. Chaos et attracteurs étranges, 160
3.11. Les systèmes distribués spatialement. Bifurcations à symétrie brisée et morphogénèse, 172
3.12. Les systèmes à dynamique discrète. Les automates cellulaires, 180
3.13. Asymétrie, sélection et information, 184

4 - LA COMPLEXITÉ ET LE HASARD, 191

4.1. Les fluctuations et la description probabiliste, 191
4.2. Processus markoviens et équation maîtresse, 198
4.3. Processus markoviens et irréversibilité. Entropie de l'information et entropie physique, 206
4.4. Corrélations spatiales et comportement critique, 212
4.5. Le comportement des fluctuations dépendant du temps : la cinétique et les échelles de temps de l'auto-organisation, 220
4.6. Sensibilité et sélection, 229
4.7. Dynamique symbolique et information, 235
4.8. Création de structures asymétriques, riches d'information, 239
4.9. Derechef, la complexité algorithmique, 247

5 - LES BASES MICROSCOPIQUES DE LA COMPLEXITÉ, 249

5.1. Propriétés générales des systèmes dynamiques conservatifs, 250
5.2. Propriétés générales des systèmes dynamiques dissipatifs, 254
5.3. En quête d'unification, 255
5.4. Probabilité et dynamique, 257

5.5. La transformation du boulanger, 259
5.6. Variétés à symétrie temporelle brisée, 263
5.7. La transformation à symétrie brisée Λ, 265
5.8. Ensembles de Gibbs et ensembles de Boltzmann, 270
5.9. Théorie cinétique, 271
5.10. Résonance et interaction rayonnement-matière, 274
5.11. Conclusion, 277

6 - COMPLEXITÉ ET TRANSFERT DES CONNAISSANCES, 279

6.1. Dynamique non linéaire en non-équilibre lointain et modélisation de la complexité, 280
6.2. Science des matériaux, 282
6.3. Phénomènes de seuil en dynamique cellulaire, 286
6.4. La variabilité climatique, 290
6.5. Comportement probabiliste et stratégies adaptatives chez les insectes sociaux, 297
6.6. Auto-organisation dans les systèmes humains, 305

Appendice I - ANALYSE DE LA STABILITÉ LINÉAIRE, 311

I.1. Equations fondamentales, 311
I.2. Le « Principe » de la stabilité linéaire, 315
I.3. L'équation caractéristique, 316
I.4. Exemples illustratifs, 320
I.5. Systèmes dont la dynamique est chaotique, 323

Appendice II - ANALYSE DU PROCESSUS DE BIFURCATION, 326

II.1. Propriétés générales, 326
II.2. Solutions développées en séries de perturbation, 329
II.3. Les équations de bifurcation, 331

Appendice III - PERTURBATION DE MOUVEMENTS RÉSONNANTS DANS LES SYSTÈMES CONSERVATIFS NON INTÉGRABLES, 334

III.1. L'application « twist », 334
III.2. Effet d'une perturbation dans le cas où le nombre de rotations est rationnel, 337
III.3. Points homoclines, 339

Appendice IV - RECONSTRUCTION DES SYSTÈMES DYNAMIQUES COMPLEXES À PARTIR DES VALEURS ISSUES DE SÉRIES TEMPORELLES : APPLICATION À LA VARIABILITÉ CLIMATIQUE, 344

IV.1. Commentaires introductifs, 344
IV.2. Fondements théoriques pour l'analyse des données, 347
IV.3. L'attracteur climatique, 348.
IV.4. Remarques en guise de conclusion et perspectives, 350

Appendice V - LE PROCESSUS IRRÉVERSIBLE PRIMORDIAL, 352

V.1. Introduction, 352
V.2. Modèle cosmologique standard, 354
V.3. Les trous noirs, 355
V.4. Le rôle de l'irréversibilité, 356

Bibliographie, 363

Index, 375