

Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois

Jean-Pierre Haluk* et Cécile Roussel

Laboratoire d'Études et de Recherches sur le Matériau Bois (LERMAB), Équipe de Chimie organique, Biochimie-Microbiologie, Université Henri Poincaré Nancy 1, ENSAIA-INPL, 2, avenue de la forêt de Haye, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

(Reçu le 28 mai 1999 ; accepté le 26 janvier 2000)

Résumé – L'objectif de cette revue est de présenter la nature chimique d'une famille de composés extractibles appelée tropolones, répertoriée dans l'ordre des Cupressales et considérée comme étant responsable de la durabilité naturelle des essences contenant ces métabolites secondaires. Des tropolones, en particulier les α , β et γ -thujaplicines, ont souvent été isolées à partir de Cupressacées (*Cupressus*, *Chamaecyparis*, *Juniperus*, *Thuja*, ...) qui possèdent en effet un bois très résistant à la biodégradation. Des études déjà anciennes ont montré la toxicité importante des tropolones vis-à-vis des champignons de la pourriture du bois et des insectes. Il serait donc intéressant de pouvoir exploiter cette propriété au niveau industriel en substituant les agents chimiques de préservation du bois (CCA, etc.) par des molécules naturelles biocides. Ce concept peut donc constituer un enjeu prometteur pour le respect de l'environnement. Comme l'extraction de ces substances par des méthodes habituelles (solvant, CO₂ supercritique) ou leur synthèse chimique, onéreuse et peu rentable, ne sont pas envisageables au niveau industriel, l'exploitation des biotechnologies végétales (cals, suspensions cellulaires) peut constituer une démarche judicieuse pour l'obtention rapide de ces molécules biocides. En effet, la biosynthèse des tropolones a été obtenue par culture cellulaire de *Thuja plicata* et des premiers essais d'imprégnation d'éprouvettes de bois avec un extrait brut obtenu à partir des cellules végétales tendent à confirmer l'efficacité antifongique de ce nouveau type de traitement de préservation du bois.

tropolones / Cupressacées / durabilité naturelle / préservation du bois / biotechnologies végétales

Abstract – **Characterization and origin of tropolones responsible for the cupressales natural durability. Potential application to wood preservation.** The aim of this review is to present the chemical structure of a group of compounds naturally found in the trees belonging to the Order of the Cupressales, and being considered responsible for this wood species natural durability: namely tropolones. These compounds, and particularly the α , β and γ -thujaplicin, have often been isolated from Cupressaceae (*Cupressus*, *Chamaecyparis*, *Juniperus*, *Thuja*, ...), which timber is extremely resistant to biodegradation. Previous studies have shown the important inhibition properties of the tropolones towards wood-destroying fungi and insects. Then, it would be an environmental and safety challenge to use these properties at an industrial scale, as a substitution to the toxic wood preservatives (such as CCA). However, either the extraction of these molecules (solvent extraction, CO₂ supercritical fluid, ...) or their synthesis are far too expensive for such an application. The use of biotechnologies (cals, cell suspensions, ...) could be judicious solution to get a cost-effective production of tropolones. Biosynthesis of tropolones from cell cultures of *Thuja plicata* has already been assessed, and first wood impregnation trials with crude extracts have been performed. The experiments have proved fungicidal efficiency from tropolones when used as wood preservatives.

tropolones / Cupressaceae / natural durability / wood preservatives / cell biotechnologies

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. (33) 03 83 59 58 66; Fax. (33) 03 83 59 59 15; e-mail : sebioch@ensaia.inpl-nancy.fr

1. INTRODUCTION

Le rôle des extractibles dans la protection naturelle du bois vis-à-vis de l'attaque fongique et de celle des insectes et des termites est d'une importance considérable aussi bien au niveau de l'arbre sur pied que pour les produits dérivés du bois ou de la pâte à papier. Face aux problèmes aigus de l'attaque des agents pathogènes, on observe que certaines essences ligneuses développent une excellente résistance à la biodégradation, grâce à leurs mécanismes de défense actifs ou passifs impliquant la formation de barrières physiques ou chimiques [54]. À cet égard, les substances naturelles biosynthétisées activement ou passivement à l'intérieur des tissus exposés peuvent être inhibitrices, voir toxiques pour le pathogène. Ces substances peuvent être des polymères (tanins) ou des molécules de faible poids moléculaire (flavonoïdes, stilbènes, lignanes, terpénoïdes). Le spectre d'action de ces dernières est plus large et elles sont potentiellement plus toxiques que les précédentes [85].

Les propriétés résultant de la présence d'extractibles dans le bois sont connues depuis longtemps. Ainsi, le teck (*Tectona grandis*, Verbénacées) a été valorisé grâce à sa résistance à la biodégradation et à sa stabilité dimensionnelle après séchage [40]. Le cèdre du Liban (*Cedrus libani*, Pinacées) est connu pour sa durabilité naturelle [18]. L'ébène (*Diospyros* sp., Ebénacées) a été largement utilisé par les dynasties égyptiennes [53].

D'autres bois d'œuvre durables, en particulier ceux de la famille des Cupressacées, ont été utilisés pour la construction dans de nombreux pays, et aussi pour d'autres applications (bateaux, cercueils). On a pu observer une excellente résistance des essences de cette famille face à l'attaque microbienne et à celle des insectes et des termites [41]. Les molécules responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées sont constituées par les tropolones et connues pour être très fongitoxiques [2, 3, 51, 82]. Les structures chimiques des principales tropolones des Cupressacées sont représentées sur la *figure 1*.

Par ailleurs, des investigations déjà anciennes ont montré que les thujaplicines de *Thuja plicata* constituent des substances fortement fongicides vis-à-vis des champignons Basidiomycètes : *Coniophora puteana*, *Fomes pinicola*, *Lentinus lepideus*, *Merulius lacrymans*, *Polyporus balsameus* et *Poria vaporaria*. Les champignons du bléissement sont aussi entièrement inhibés pour des concentrations en γ -thujaplicine de 0,01 % [67].

2. ASPECTS BOTANIQUES ET BIOSYNTHÉTIQUES DE LA PRÉSENCE DES TROPOLONES CHEZ LES CUPRESSALES

2.1. Aspects botaniques

Une étude détaillée de la structure des constituants chimiques de l'ordre des Cupressales a été publiée par Erdtman et Norin en 1966 [40]. Les principales molécules sont les suivantes : cyclitols et composés phénoliques simples, lignanes, flavonoïdes et bi-flavonoïdes, cires (dans les feuilles surtout), terpènes (mono-, sesqui-, di- et triterpènes) et tropolones. Toutes les tropolones isolées de l'ordre des Cupressales (qui comprend deux familles : Taxodiacées et Cupressacées) montrent des structures distinctes de celles des terpènes ; elles diffèrent à cet égard des tropolones produites par certaines moisissures et des espèces de colchiques (*Colchicum autumnale*, Safran des prés).

Le Séquoïa est le représentant le plus connu des Taxodiacées, tandis que la famille importante des Cupressacées comprend deux sous-familles, les Cupressoïdées et les Callitroïdées (*figure 2*).

Les Cupressoïdées, essentiellement présents dans l'hémisphère nord, sont divisés en trois tribus : les Cupressées, les Junipérées et les Thujopsidées (ou Thujoidées). Les Callitroïdées, essentiellement de l'hémisphère Sud, sont également divisés en trois tribus : les Actinostrobées (*Callitris*), les Libocédrées et les Tétracelinées (avec le monotype *Tetraclinis articulata*). *Cupressus sempervirens* est le représentant le plus connu des Cupressées, souvent désigné sous le vocable cyprès des « cimetières ». Le « Red Cedar » (*Thuja plicata*) et *Thuja occidentalis* sont les espèces les plus connues de la tribu des Thujopsidées.

Les tropolones, absentes chez les Taxodiacées, sont par contre largement représentées chez les Cupressacées, en particulier dans la sous-famille des Cupressoïdées (*figure 2*). Les deux tribus Cupressées et Thujopsidées sont les plus riches en tropolones, en particulier pour les espèces de *Cupressus* et de *Thuja*. Il semblerait que les Junipérées soient plus faiblement fournies en tropolones, malgré le nombre important d'espèces. La tribu des Tétracelinées est représentée par une seule espèce, *Tetraclinis articulata* Vahl. Masters, qui croît en Espagne du Sud et en Afrique du Nord ; on l'appelle encore Thuja de Berbérie. Il semble que cette espèce soit identique au *Callitris* australien (*Callitris quadrivalvis* Ventenat) qui contient des tropolones. Parmi les autres espèces de l'hémisphère sud, *Austrocedrus chilensis* est riche en β -thujaplicine et l'une des trois espèces de *Papuacedrus* (Nouvelle-Guinée) contient des tropolones [29, 30].

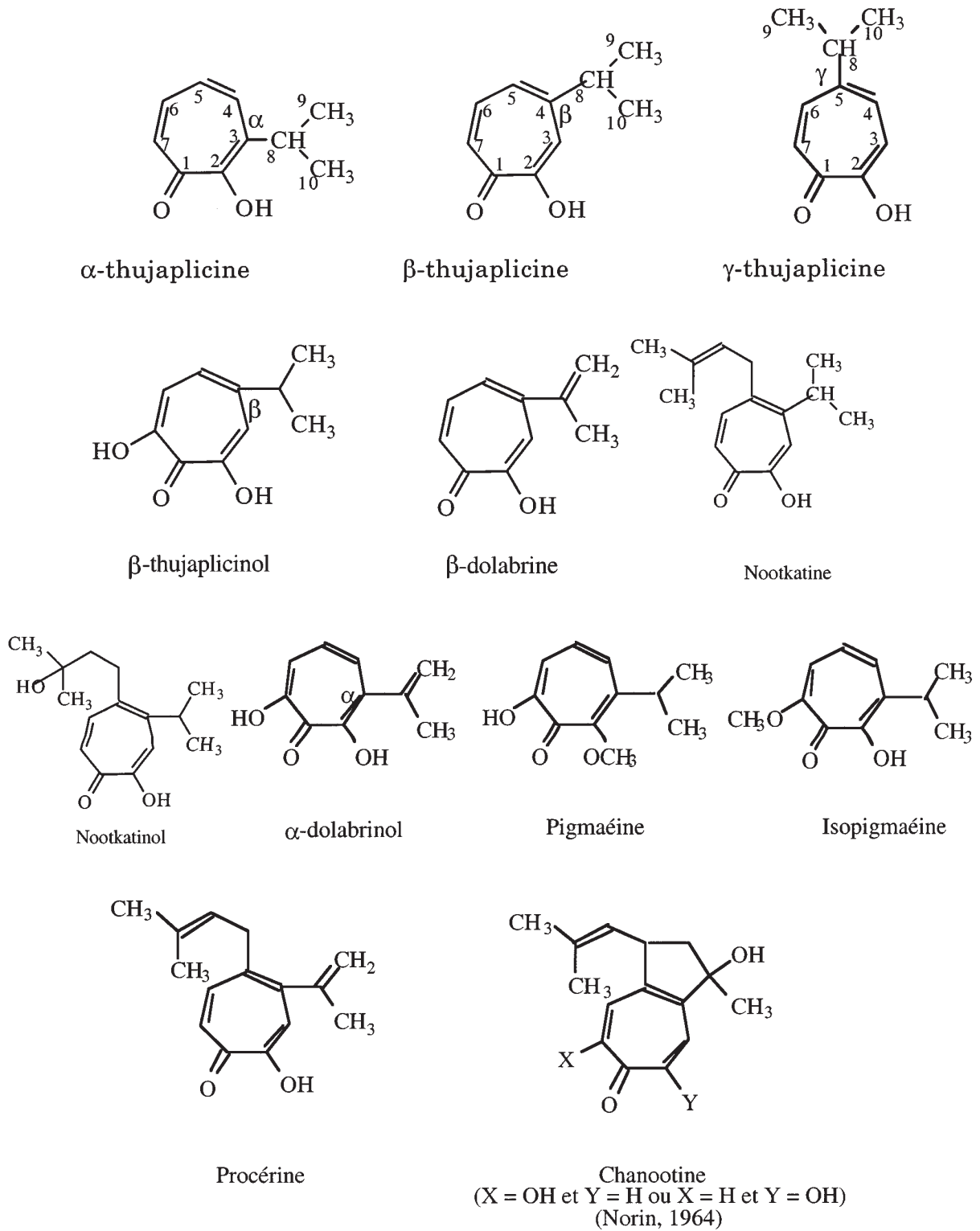


Figure 1. Structure chimique des principales tropolones chez les Cupressacées.

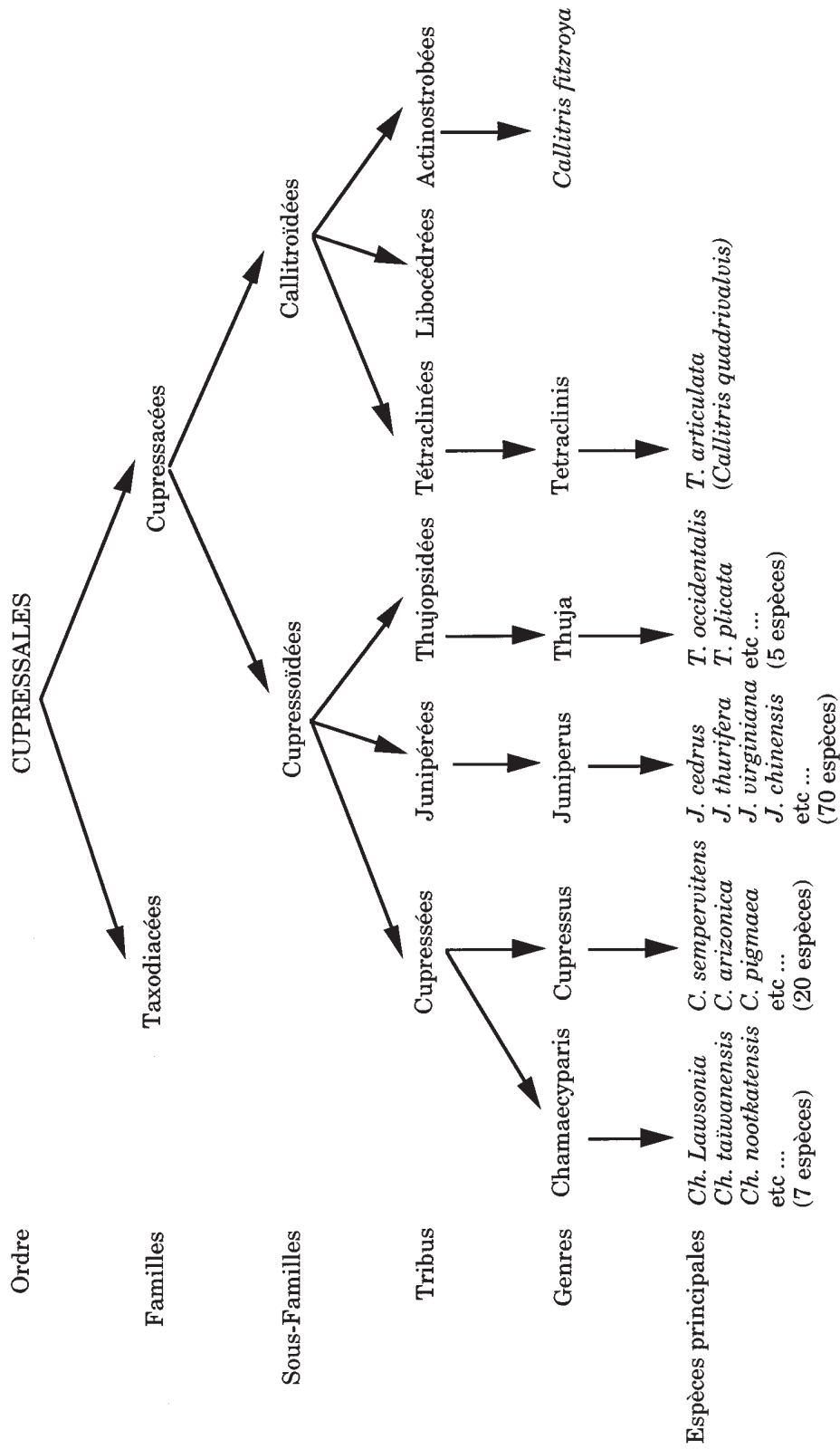


Figure 2. Classification détaillée de l'ordre des Cupressales.

À l'inverse, aucune des cinq espèces de Libocédrées de Nouvelle Zélande ne contient des tropolones. Mais les Libocédrées incluent aussi les genres *Austrocedrus*, *Calocedrus* dans l'Hémisphère Nord, *Papuacedrus* et *Pilgedendron* au Chili. On peut par conséquent s'apercevoir que la composition chimique de cette tribu est très hétérogène (tableau I).

Presque toutes les sept espèces de *Chamaecyparis* (tribu des Cupressées) ont été étudiées et presque toutes contiennent des tropolones (tableau I). Les doutes se situent au niveau de *Ch. obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl. du Japon (Hinoki), de *Ch. formosensis* Mats. de Formose (Beniki) et de *Ch. pisifera* (Sieb. et Zucc.) Endl. du Japon (Sawara). *Ch. taiwanensis* Mas et Suzuki de Formose (Arisan Hinoki), considéré comme une variété de *Ch. obtusa* (Sieb. et Zucc., variété *formosana* Hayata), est chimiquement tout à fait différent de « l'Hinoki » et du « Béniki » et contient des tropolones. *Ch. lawsoniana* de l'Oregon (USA) est très pauvre en tropolones. Le bois de *Ch. thuyoides* (L) (B.S.P.) a été étudié en détail par Enzell [20] qui ne mentionne pas de tropolones, tandis que d'autres auteurs rapportent la présence des trois thujaplicines [87, 88, 91, 92]. Cette espèce a été divisée par Li [50] en deux sous-espèces, l'une située dans l'hémisphère sud (*Ch. henryae* Li) et l'autre *Ch. thuyoides*, dans l'hémisphère nord (Nord-Est des USA). Il est aussi possible que le bois de Floride étudié par Enzell relève de *Ch. henryae*. Li pense que les caractéristiques générales de *Ch. henryae* sont en assez bonne corrélation avec *Ch. nootkatensis* de l'ouest, mais il y a une grande différence au niveau de leur chimie.

Ch. nootkatensis est la seule espèce de *Chamaecyparis* qui contienne de la nootkatine (tableau I) [6]. Environ la moitié des 20 espèces du genre *Cupressus* ont été étudiées et presque toutes les espèces contiennent les tropolones en C₁₀ (thujaplicines, β -dolabrine) et en C₁₅ (nootkatine).

Enfin, le genre *Juniperus* est très vaste (70 espèces) et on a observé que les tropolones sont très voisines de celles du genre *Cupressus* (surtout β -thujaplicine).

2.2. Aspects biosynthétiques

On a souvent admis que les tropolones de Cupressacées sont des terpènes modifiés formés par extension du cycle aromatique [24, 31, 44, 68]. Cependant, il n'y a aucune preuve biosynthétique de cette hypothèse. La co-existence des α , β et γ -thujaplicines chez *Thuja plicata* et d'autres Cupressacées semblerait indiquer qu'il y aurait un précurseur commun.

Une voie possible de la biosynthèse de la β -thujaplicine, via le Δ (+)-3-carène (monoterpène bicyclique) a été

proposée par Erdtman et approuvée par Charlwood et Banthorpe [13].

Une voie alternative pourrait être la voie polyacétylique par laquelle trois molécules de malonyl-CoA se condensent avec le 3,3-diméthylacryl-CoA pour former un polycétide en C₁₁ à chaîne ramifiée qui peut se cycliser, être décarboxylé puis fonctionnalisé [13]. D'autre part, des développements récents dans le domaine de la biochimie des isoprénoides de végétaux suggèrent que la biosynthèse de nombreux isoprénoides ne se déroule pas via le schéma classique acétate/mévalonate, mais via une voie récemment découverte appelée glyceraldéhyde-pyruvate [19]. Cependant, aucune étude avec traceur n'a été effectuée sur la biosynthèse des thujaplicines, car elles sont formées naturellement à l'intérieur du bois mature dans lequel les expériences biochimiques sont très difficiles à réaliser. Par conséquent, des auteurs ont employé les calcs et les cultures de suspensions cellulaires dérivés de *Cupressus lusitanica* Miller [78], afin d'obtenir des connaissances fondamentales sur la voie biosynthétique de la β -thujaplicine ; en effet, les cultures amorcent la synthèse de novo de la β -thujaplicine lorsqu'elles sont activées par des éliciteurs à base d'extraits de levure [78]. De récentes expériences avec des substrats marqués ont montré que la β -thujaplicine est d'origine mévalonique, et elle n'est pas formée à partir d'un polycétide, via le mécanisme du polyacétate [79].

L'enzyme HMG-CoA réductase constitue une des enzymes de régulation de la voie du mévalonate [34]. Par conséquent, on peut penser que les inhibiteurs de la HMG-CoA réductase doivent supprimer la production de β -thujaplicine si cette dernière est biosynthétisée par la voie du mévalonate. Ainsi, Sakai et al. [79] ont montré que l'addition de compactine, un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, à une suspension cellulaire de *Cupressus lusitanica* traitée avec un éliciteur, conduit à une inhibition significative de la biosynthèse de β -thujaplicine. Ce résultat tend donc à confirmer que ce constituant est formé via la voie du mévalonate.

3. MÉTHODES D'EXTRACTION DES TROPOLONES

Dans quelques cas, les tropolones ont été obtenues à partir de bois broyé par simple entraînement à la vapeur et isolement de la fraction « phénolique ». Plus fréquemment, le bois est extrait avec de l'éther éthylique ou de l'acétone ; les tropolones peuvent être purifiées par leur transformation en complexes cuivriques qui se décomposent à leur tour en présence de H₂S. Les sels avec la dicyclohexylamine, la cyclohexylamine ou la benzylamine [91, 92], les échangeurs d'ions [59] ont été aussi

utilisés pour l'extraction des tropolones. Ces dernières sont stables à l'obscurité, tandis que les complexes cuivriques des hydroxytropolones semblent être plus instables [91, 92].

Les méthodes habituelles d'isolement, telles que l'extraction liquide-liquide, l'entraînement à la vapeur et l'extraction au Soxhlet sont onéreuses ; elles nécessitent des températures élevées et sont souvent effectuées à la lumière, si bien qu'elles peuvent conduire à la décomposition de tropolones [62]. Par contre, les fluides supercritiques sont des solvants très intéressants en raison de leur très grand pouvoir de solubilité qui permet ainsi un meilleur transfert de masse que de liquide [62]. L'extraction en phase supercritique présente de nombreux avantages par comparaison avec les méthodes classiques : gain de temps, souplesse, sélectivité, absence de dégradation des extraits, automatisation facile. Le dioxyde de carbone (CO₂) est probablement le fluide supercritique le plus utilisé car il est ininflammable, non corrosif, non toxique et peu coûteux. La pression critique du CO₂ est de 72,8 bars et sa température critique est de 31°C [10, 12]. Cette technique a été récemment appliquée à l'extraction des tropolones du Red Cedar (*Thuja plicata* Don.) ; le rendement d'extraction en tropolones (en particulier les thujaplicines) est de 7 à 8 fois supérieur par extraction avec le CO₂ supercritique que par entraînement à la vapeur [63]. Ce résultat a été confirmé par Moret [57] sur *Thuja plicata* et *Thuja occidentalis*, qui a mis en évidence dans notre laboratoire une activité antifongique de l'extrait brut obtenu surtout à partir de poudre de Red Cedar par extraction au CO₂ supercritique. Cependant, ce type d'extraction est actuellement très coûteux pour une installation industrielle.

Enfin, la technique ASE (extraction accélérée par solvant) avec un extracteur type « Dionex ASE 200 » permet de réaliser des extractions rapides à moindre coût sous pression. Ainsi, le solvant est maintenu liquide en appliquant une pression pouvant atteindre 20 MPa dans la cellule d'extraction. Grâce à l'action combinée température-pression, l'extraction est fortement accélérée et s'effectue en 15 minutes. Cette technique a été appliquée au laboratoire et nous avons pu montrer une plus forte teneur en thujaplicines extraites dans ces conditions [69].

La synthèse chimique de la β-thujaplicine a pu être réalisée à partir du 2-isopropylphénol selon un processus en 5 étapes [55] ; elle reste toutefois fastidieuse, compliquée, coûteuse, et de faible rendement (2 à 3 %).

La synthèse enzymatique n'a jamais été envisagée ; cependant, il serait peut être intéressant de vérifier si les polyphénoloxydases, telles que les laccases, réagissent sur des précurseurs phénoliques possédant un noyau catéchol ou pyrogallol pour former la structure particulière de la tropolone.

Actuellement, on préfère utiliser l'outil biotechnologique ; en effet, l'exploitation des cultures de tissus végétaux constitue une démarche judicieuse puisqu'elle revient à créer une forme nouvelle de matériel végétal pour synthétiser des métabolites secondaires utiles et en quantité supérieure au végétal lui-même [7]. La culture de cals *in vitro* à partir de plantules de *Cupressus lusitana* a été récemment réalisée pour l'obtention de β-thujaplicine [78]. Le gros avantage de cette méthodologie est l'amélioration du rendement en métabolites secondaires (thujaplicines) et la rapidité d'obtention (8 jours). Le rendement en biomolécules est encore amélioré en plaçant des cals au contact d'activateurs de biosynthèse appelés éliciteurs. Ces derniers sont souvent constitués par des extraits de levure ou de champignons (*Coriolus versicolor*). Cette technique d'obtention de cellules végétales est actuellement appliquée dans notre laboratoire avec *Thuja plicata* Don. [69].

4. IMPORTANCE D'UNE UTILISATION POTENTIELLE DES TROPOLONES

La méthode la plus classique de protection du bois contre les dégradations biologiques est le traitement par les produits chimiques (ex. : mélange de trois sels à base de cuivre, de chrome et d'arsenic [CCA]) ; ceux-ci s'avèrent efficaces, mais bien trop souvent nocifs pour les écosystèmes. Le secteur de la préservation du bois souffre de cette image, et afin de promouvoir l'emploi du matériau bois dans les situations les plus diversifiées possibles, il est nécessaire d'envisager le développement de formulations efficaces et faiblement toxiques pour l'environnement.

Au regard de la toxicité associée aux agents chimiques de préservation du bois largement employés par tous les imprégneurs industriels, le développement de nouveaux produits de préservation ayant pour principes actifs des biomolécules naturellement présentes dans les essences durables constitue une approche prometteuse [39]. C'est pourquoi l'étude de la chimie des composés extractibles, et en particulier celle des tropolones possédant de nombreuses propriétés (antifongiques, antitermites, inhibitrices de métalloenzymes) mérite d'être approfondie.

Beaucoup de travaux ont été effectués sur les nombreuses propriétés des tropolones naturelles extraites par le CO₂ supercritique ou par entraînement à la vapeur, en relation avec leur structure chimique. On pourrait les résumer de la manière suivante :

- Chélation et inhibition des enzymes à cuivre et d'autres métalloenzymes (ex. : inhibition de la dopamine β-hydroxylase [35], inhibition de la tyrosinase de

champignons [48, 83], inhibition de la polyphénoloxydase de raisin [84] et inhibition de la glyoxylase I de *Saccharomyces cerevisiae* [8].

- Activité antibactérienne de la β -thujaplicine [80] : sous cette rubrique, des travaux récents ont montré que la β -thujaplicine a une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* qui est la cause principale des infections dans les hôpitaux [64].

- Activité antifongique : les tropolones sont connues pour être très fongitoxiques vis-à-vis des champignons de la pourriture du bois. Néanmoins, cette propriété n'a pas fait l'objet d'études approfondies ; en fait, on a constaté que les essences possédant une teneur relativement importante en tropolones résistaient à l'attaque fongique. Même l'industrie alimentaire est intéressée par cette propriété ; récemment, la β -thujaplicine (encore appelée au Japon hinokitiol) a été utilisée pour protéger les pêches des champignons pathogènes responsables de leur décomposition post-récolte (*Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* et *Rhizopus oryzae*). La décomposition des pêches récoltées commercialement est inhibée par la β -thujaplicine, alors que près de 42 % des fruits non traités développent la pourriture brune [81].

- Activité antitumorale de dérivés de la β -thujaplicine : grâce à la modification de la structure de la β -thujaplicine par un dérivé du benzaldéhyde, on a pu obtenir de nouveaux agents antitumoraux qui se révèlent très efficaces et qui prolongent la vie des cellules testées [86].

- Activité inhibitrice ou activatrice de la croissance végétale : à des concentrations relativement élevées, de l'ordre de 50 ppm, la tropolone et la β -thujaplicine inhibent la croissance de toutes les plantes traitées (*Lactuca sativa* L., *Brassica rapa* L., *Brassica chinensis*, *Brassica campestris* L., etc ...). Cependant, d'autres travaux ont montré qu'à de plus faibles concentrations (environ 10 ppm), ces tropolones stimulent la croissance de ces mêmes végétaux. Des expérimentations visent à montrer que le premier site d'action de ces composés est l'inhibition de la synthèse chlorophyllienne qui conduit à l'inhibition de la croissance des végétaux ainsi traités [46].

- Substrat donneur d'hydrogène pour l'activité peroxydasique de raifort : la peroxydase (POD) catalyse l'oxydation de divers donneurs d'hydrogène (AH_2) en présence de H_2O_2 .

En présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , la tropolone peut servir de donneur d'hydrogène pour la réaction catalysée par la peroxydase du raifort. L'oxydation de la tropolone par cette enzyme conduit à la formation d'un composé jaune caractérisé par un maximum d'absorption dans le visible à 418 nm [49].

Toutes les propriétés particulières des tropolones sont en corrélation avec leurs structures chimiques qui jouent

en rôle prépondérant dans leur activité biocide. En effet, leurs propriétés inhibitrices d'enzymes sont la conséquence de leur capacité à chélater les métaux (cuivre, fer, cobalt, magnésium, ...) grâce aux groupements fonctionnels carbonyle et hydroxyle adjacents. Les enzymes possédant des sites actifs constitués par des ions métalliques perdent leur activité catalytique en présence des tropolones, ce qui entraîne la destruction des organismes traités (bactéries, champignons, ...). En outre, de par leurs propriétés, les tropolones peuvent avoir un impact dans le domaine de la pharmacologie : l'hinokitiol (β -thujaplicine) est à la base de nouveaux composés antitumoraux qui sont actifs sur des cellules cancéreuses in vitro mais leur activité in vivo est encore mal connue. Les tropolones sont déjà utilisées en cosmétique au Japon comme agents antibactériens et antifongiques ; elles sont aussi présentes dans certains dentifrices ou toniques pour cheveux.

5. CONCLUSION

Dans le domaine de la préservation du bois, l'utilisation des tropolones peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de préservation actuels. En effet, ces molécules issues d'essences durables comme le Red Cedar (*Thuja plicata*), sont faiblement toxiques pour l'environnement et possèdent une activité biocide élevée. Comme la synthèse chimique est peu rentable et coûteuse, et que l'extraction conduit à des rendements en tropolones relativement faibles, même avec des techniques sophistiquées (CO_2 supercritique, extraction accélérée par solvant (ASE) sous pression élevée), on peut penser que l'exploitation des cultures cellulaires végétales à partir de Red Cedar peut constituer une démarche judicieuse pour obtenir à moindre coût des tropolones naturelles en réacteur à l'échelle industrielle, surtout en présence d'activateurs de la biosynthèse de ces métabolites secondaires appelés éliciteurs.

RÉFÉRENCES

- [1] Ahluwalia V.K., Seshadri T.R., Nootkatin from *Cupressus torulosa*, Current Sci. 23 (1954) 154.
- [2] Anderson A.B., Scheffer T.C., Duncan C.G., On the decay retardant properties of some tropolones, Science 137 (1962) 859-860.
- [3] Anderson A.B., Scheffer T.C., Duncan C.G., The chemistry of decay resistance and its decrease with heartwood aging in incense cedar, Holzforschung 17 (1963) 1-5.
- [4] Barnard J.F., Ven der Jagt D.L., Honek J.F., Small molecules probes of glyoxylase I and glyoxylase II, Bioch. Biophys. Acta. 1208 (1994) 127-135.

- [5] Barreto H.S., Enzell C., The chemistry of the Order Cupressales. 39. Heartwood constituents of *Cupressus torulosa* Don., Acta Chem. Acta. 15 (1961) 1313–1318.
- [6] Barton G.M., A review of yellow cedar (*Chamaecyparis nootkatensis* D. Don.) extractives and their importance to utilization, Wood Fiber 8 (1976) 172–176.
- [7] Berlin J., Witte L., Formation of mono and diterpenoids by cultured cells of *Thuja occidentalis*, Phytochemistry 27 (1988) 127–132.
- [8] Bicho J.G., Zavarin E., Bhacca N.S., On the occurrence of hydronootkatinol in the heartwood of *Cupressus lindleyi* Klotsch., J. Organ. Chem. 28 (1963) 2927–2929.
- [9] Bredenberg J.B., The chemistry of the order Cupressales 36. The ethereal oil of the wood of *Juniperus communis* L., Acta Chem. Scand. 15 (1961) 961–966.
- [10] Camel V., Tambute A., Claude M., L'extraction en phase supercritique à l'échelle analytique : principe, mise en œuvre et applications, Analisis 20 (1992) 503–528.
- [11] Carlsson B., Erdtmann H., Frank A., Harvey W.E., The chemistry of the Order Cupressales - 8. Heartwood constituents of *Chamaecyparis nootkatensis*. Carvacrol, nootkatin and chamic acid, Acta Chem. Scand. 6 (1952) 690–696.
- [12] Castioni P., Christen P., Venthey J.L., L'extraction en phase supercritique des substances d'origine végétale, Analisis 23 (1995) 95–106.
- [13] Charlwood B.V., Banthorpe D.V., Progress in Phytochemistry, Vol. 5, Reinhold L., Harborne J.B., Swain T. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1978, pp. 65–125.
- [14] Chow Y.L., Erdtman H., The chemistry of the Order Cupressales. 42. Heartwood constituents of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, Acta Chem. Scand. 16 (1962) 1291–1295.
- [15] Corbett R.E., Wright D.E., The extractives of *Libocedrus bidwillii* and *Cupressus macrocarpa*, Chem. and Ind. (1953) 1258–1259.
- [16] Dadswell I.W., Dadswell H.E., The relation between durability and the extractives of the Cypress pines (*Callitris* spp), J. Council Sci. Ind. Res. 4 (1931) 208–216.
- [17] Duff S.R., Erdtmann H., Harvey W.E., The chemistry of the Order Cupressales. II. Heartwood constituents of *Chamaecyparis nootkatensis* (Lamb.) Spach. Nootkatine, Acta Chem. Scand. 8 (1954) 1073–1082.
- [18] Edlin H.L., A modern sylva or a discourse of forest trees. 7-Cedars (*Cedrus species*), Quart. J. For. 57 (1963) 302–310.
- [19] Eisenreich W., Menhard B., Hyland P.J., Zenk M.H., Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin, Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996) 6431–6436.
- [20] Enzell C., The chemistry of the Order Cupressales. 24. Heartwood constituents of *Chamaecyparis thuyoides* (L) Britt., Acta Chem. Scand. 14 (1960) 81–85.
- [21] Enzell C., Studies on Conifer terpenes, Svensk. Kem Tidskr. 74 (1962) 559–574.
- [22] Enzell C., Erdtman H., The chemistry of the Order Cupressales. 19. The occurrence of manool in *Cupressus sempervirens* L., Acta Chem. Scand. 11 (1957) 902–903.
- [23] Enzell C., Krolikowska M., The chemistry of the Order Cupressales 48. Heartwood constituents of *Cupressus arizonica*, Ark. Chem. 20 (1962) 157–162.
- [24] Erdtman H., Heartwood extractives of Conifers. Their fungicidal and insect-repellent properties and taxonomic interest, Tappi 32 (1949) 305–310.
- [25] Erdtman H. Organic chemistry and Conifer taxonomy. In: Todd A. (Ed.), Perspectives in organic chemistry, Interscience, New York and London, 1956, p. 453.
- [26] Erdtman H., Gripenberg J., Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* Don., Nature 161 (1948) 719.
- [27] Erdtman H., Gripenberg J., Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* Don. II. The constitution of γ -thujaplicin, Acta Chem. Scand. 2 (1948) 625–638.
- [28] Erdtman H., Norin T., The chemistry of the Order Cupressales, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 24 (1966) 206–287.
- [29] Erdtman H., Pelchowicz Z., The chemistry of the Order Cupressales. 15. Heartwood constituents of *Austrocedrus chilensis* (D. Don.) Florin et Boutelje (*Libocedrus chilensis* (D. Don.) Endl.), Acta Chem. Scand. 9 (1955) 1728–1729.
- [30] Florin R., The distribution of Conifer and Taxad Genera in time and space, Acta Horti. Bergiani 20 (1963) 121–312.
- [31] Fujita Y., A consideration of the mode of formation of thujaplicins and allied tropolones in Plants, Bull. Osaka Ind. Res. Inst. 6 (1955) 199.
- [32] Gardner J.A.F., Barton G.M., Occurrence of β -dolabrin (4-isopropenyltropolone) in Western Red Cedar (*Thuja plicata* Don.), Can. J. Chem. 36 (1958) 1612–1615.
- [33] Gardner J.A.F., Barton G.M., Maclean H., Occurrence of 2,7-dihydroxy-4-isopropyl-2, 4, 6-cyclo heptatrien-1-one (7-hydroxy-4-isopropyl tropolone) in Western Red Cedar (*Thuja plicata* Don.), Can. J. Chem. 35 (1957) 1039–1048.
- [34] Goldstein J.L., Brown M.S., Regulation of the mevalonate pathway, Nature 343 (1990) 425–430.
- [35] Goldstein M., Lauber E., McKeerghan., The inhibition of dopamine β -hydroxylase by tropolone and other chelating agents, Biochem. Pharmacol. 13 (1964) 1103–1106.
- [36] Gripenberg J., Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* Don. III. The constitution of α -thujaplicin, Acta Chem. Scand. 2 (1948) 639–643.
- [37] Gripenberg J., The constituents of the wood of *Thuja occidentalis*, Acta Chem. Scand. 3 (1949) 782.
- [38] Gripenberg J., The chemistry of the order Cupressales. 9. The synthesis of hexahydrothujic acid, Acta Chem. Scand. 6 (1952) 854–858.
- [39] Haluk J.P., Roussel C., Durabilité naturelle du Red cedar et application des biotechnologies végétales dans le domaine de la préservation du bois. Communication 2^e Journées Scientifiques Bois-Forêt, 1998, Épinal, France.
- [40] Hermann P., Quoted by Sandermann W. and Simatupang M.H., 1966. Zur chemie und Biochemie des Teakholzes (*Tectona grandis*), Holz Roh-Werkst. 24 (1952) 190–204.
- [41] Hillis W.E., Heartwood and tree exsudates, Timell T.E. (Ed.), Springer Verlag, Berlin, 1987, 268 p.

- [42] Hirose Y., Terpenoids VII. The structure of a new tropolone, nootkatinol., *Agric. Biol. Chem.* 27 (1963) 795-797.
- [43] Hirose Y., Terpenoids VIII. On the occurrence of nootkatinol (hydronootkatinol) in the wood of *Juniperus rigida* Sieb et Zucc., *J. Japan Wood Res. Soc.* 10 (1964) 251-252.
- [44] Hirose Y., Nakatsuka T., Terpenoids III. Composition of the essential oil from the wood of *Biota orientalis* Endl. (*Thuja orientalis* L.), *J. Japan Wood Res. Soc.* 4 (1958) 26-29.
- [45] Hirose Y., Nakatsuka T., Terpenoids IX. Composition of the wood of *Thuja standishii* Carr., *J. Japan Wood Res. Soc.* 10 (1964) 253-255.
- [46] Inamori Y., Nishigushi K., Matsuo N., Tsujibo H., Baba K., Ishida N. Phyto-growth-inhibitory activities of tropolone and hinokitiol., *Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991) 2378-2381.
- [47] Inone H., Noguchi T., Treatment of *Thuja* oil by ion exchange resin. (*Chem. Abstr.*, 59, 2706), *Yukagaku* 11 (1963) 523-526.
- [48] Kahn V., Andrawis A., Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone, *Phytochemistry* 24 (1985) 905-908.
- [49] Kahn V., Andrawis A., Tropolone as a substrate for horseradish peroxidase, *Phytochemistry* 24 (1985) 909-913.
- [50] Li H.L., A new species of *Chamaecyparis*, *Morris Arboretum Bull.* 13 (1962) 43.
- [51] Lin Y.T., Liu K.T., Study of the extractive constituents from the wood of *Libocedrus formosana*. Florin VI. Thin layer chromatography of tropolones, *J. Chin. Chem. Soc.* 10 (1963) 156.
- [52] Lin Y.T., Wang K.T., Chen C.L., The essential oil of *Chamaecyparis taiwanensis*, Masamune et Suzuki. II Chamaecin, a new natural tropolonoid, *J. Chin. Chem. Soc.* 2 (1955) 126-128.
- [53] Lucas A., Ancient Egyptian materials and industries. 4th edn., Rev. by Harris J.R., Arnold London, 1962, pp. 323-324.
- [54] Merrill W., Mechanisms of resistance to fungi in woody plants: a historical perspective, in: Blanchette R.A., Biggs A.R. (Eds.), *Defense mechanisms of woody plants against fungi*, Springer Verlag, Berlin, 1992, pp. 1-12.
- [55] Miyashita M., Hara S., Yoshikoshi A., Regiospecific synthesis of β -thujaplicin (kinokitiol) from 2-isopropylphenol, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 2602-2604.
- [56] Modica G., Rossi P.F., Su sostanze estratte del durame di *Cupressus sempervirens* L. Nota II. Isolemento di nootkatina, *Ann. Chim.* 46 (1956) 842-846.
- [57] Moret D., Utilisation de biomolécules d'origine végétale à activité biocide élevée comme agents de substitution des produits chimiques toxiques de préservation du bois. Application aux tropolones, D.E.A. Sciences du Bois, Université Henri Poincaré Nancy I, 1997.
- [58] Norin T., Chanootin, a bicyclic C15-tropolone from the heartwood of *Chamaecyparis nootkatensis* (Lamb.) Spach., *Ark Kemi* 22 (1964) 129-135.
- [59] Nozoé T., Studies on hinokitiol. Part V. On the revision of the hinokitiol structure, *Sci. Repts. Tôhoku Univ. (I)* 36 (1952) 82-98.
- [60] Nozoé T., Takase K., Ogata M., β -dolabrin : a new natural tropolone, *Chem. and Ind.* 2 (1957) 1070.
- [61] Nozoé T., Yasue A., Yamane K., On the acidic constituents of the essential oil of *Thujopsis dolabrata*. Occurrence of α -thujaplicin, *Proc. Jpn Acad.* 27 (1951) 15-17.
- [62] Ohira T., Teranchi F., Yatagai M., Troplones extracted from the wood of Western Red Cedar by supercritical carbon dioxide, *Holzforchung* 48 (1994) 308-312.
- [63] Ohira T., Teranchi F., Yatagai M., Efficient extraction of hinokitiol from the wood of *Hiba* with supercritical carbon dioxide, *Mokuzai Gakkaishi* 42 (1996) 1006-1012.
- [64] Okabe T., Saito K., Fukui T., Inuma K., Antibacterial activity of hinokitiol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Mokuzai Gakkaishi* 40 (1994) 1233-1238.
- [65] Pettersson E., Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 34. Heartwood constituents of *Juniperus procera*. Hochst. and *Juniperus californica* Carr., *Acta Chem. Scand.* 15 (1961) 713-720.
- [66] Pilo C., Runeberg J., The chemistry of the order Cupressales. 25. Heartwood constituents of *Juniperus chinensis* L., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 353-358.
- [67] Rennerfelt E., Investigations of Thujaplicine, a fungicidal substance in the heartwood of *Thuja plicata* D. Don., *Physiol. Plantarum* 1 (1948) 245-254.
- [68] Robinson R., The structural relations of natural products, Clarendon Press, Oxford, 1955.
- [69] Roussel C., Utilisation de biocides naturels comme agents de substitution des produits chimiques toxiques de préservation du bois. Application à la rosine de tall-oil et à la β -thujaplicine. Rapport scientifique d'avancement, Convention ADEME n° 9701029, Paris, 1999.
- [70] Rudman P., Gay F.J., The causes of natural durability in timber. XIV. Intraspecific variations in termite resistance of Cypress Pine (*Callitris columellaris* F. Muell.) *Holzforchung.* 18 (1964) 113-116.
- [71] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 31. Heartwood constituents of *Juniperus phoenicea* L., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1995-1998.
- [72] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 29. Heartwood constituents of *Juniperus thurifera* L., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1985-1990.
- [73] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 27. Heartwood constituents of *Juniperus utahensis* Lemm., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 797-804.
- [74] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 28. Constituents of *Juniperus virginiana* L., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1288-1294.
- [75] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 30. Heartwood constituents of *Juniperus cedrus* Webb. and Berth., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1991-1994.
- [76] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 35. Heartwood constituents of *Juniperus foetidissima* Willd., *Acta Chem. Scand.* 15 (1961) 721-726.

- [77] Runeberg J., The chemistry of the Order Cupressales. 33. The structure of Procerin, *Acta Chem. Scand.* 15 (1961) 645–647.
- [78] Sakai K., Kusuba K., Tsutsumi Y., Shiraishi T., Secondary metabolites in cell culture of woody plants. III Formation of β -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* callus cultures treated with fungal elicitors, *Mokuzai Gakkaishi* 40 (1994) 1–5.
- [79] Sakai K., Yamaguchi T., Itose R., Biosynthese of a heartwood tropolone, β -thujaplicin, *Mokuzai Gakkaishi* 43 (1997) 696–698.
- [80] Saleh N.A., Zwiefak A., Mordarski M., Pulverer G., Antibacterial activity of selected tropones and tropolones, *Zbl. Bakt. Hyg. A* 270 (1988) 160–170.
- [81] Sholberg P.L., Shimizu B.N., Use of natural plant products, hinokotiol to extend shelf-life of peaches, *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24 (1991) 273–277.
- [82] Southam C.M., Ehrlich J., Effects of extracts of western Red Cedar heartwood on certain wood-decayed fungi in culture, *Phytopathology* 33 (1943) 517–524.
- [83] Tanaka T., Takenchi M., Chishima E., Inhibition study of tyrosinase from *Aspergillus oryzae*, *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 557–558.
- [84] Valero E., Garcia-Moreno M., Varon R., Garcia-Carmona F., Time-dependant inhibition of grape polyphenoloxidase by tropolone, *J. Agr. Food Chem.* 39 (1991) 1043–1046.
- [85] Woodward S., Responses of gymnosperm bark tissues to fungal infection, in: Blanchette R.A., Biggs A.R. (Eds.), *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Springer Verlag, Berlin, 1992, pp. 62–75.
- [86] Yamamoto M., Hashigaki K., Sakai J., Kawasaki Y., Tsukagoshi S., Synthesis and antitumor activity of tropolones derivatives -4-, *J. Med. Chem.* 30 (1987) 117–120.
- [87] Zavarin E. and Anderson A.B., Paper chromatography of the tropolones of *Cupressaceae*, *J. Organ. Chem.* 21 (1956) 332–335.
- [88] Zavarin E., Anderson A.B., Extrahierbare Bestandteile des Kernholzes der Kalifornischen Flubzeder (Incense Cedar, *Libocedrus decurrens*) Torrey. IV. Vorkommer und Chromatographie von Thujaplicinen, *Chem. Ber.* 89 (1956) 545–549.
- [89] Zavarin E., Anderson A.B., On the structure of pigmaein, a new tropolone from *Cupressus pygmaea* Heartwood, *J. Organ. Chem.* 26 (1961) 1679–1680.
- [90] Zavarin E., Anderson A.B., Smith R.M., On the occurrence of α -thujaplicinol in the heartwood of *Cupressus pygmaea* (Lemm.) Sarg., *J. Organ. Chem.* 26 (1961) 173–176.
- [91] Zavarin E., Smith R.M., Anderson A.B., Characterization of *Cupressaceae* tropolones as dicyclohexylamine salts, *J. Organ. Chem.* 24 (1959) 1584–1585.
- [92] Zavarin E., Smith R.M., Anderson A.B., Paper chromatography of the tropolones of *Cupressaceae* II, *J. Organ. Chem.* 24 (1959) 1318–1321.