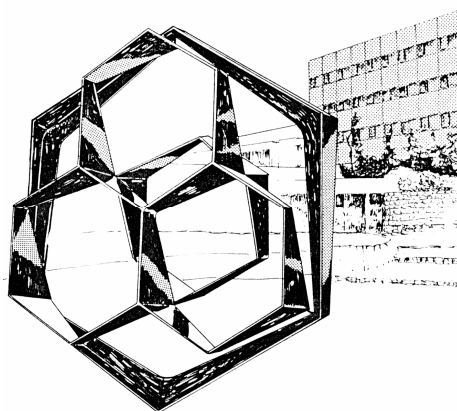


FACULTE DES SCIENCES  
Centre Wallon de Biologie Industrielle

**Etude des propriétés physicochimiques de  
celluloses fossiles non-biodégradables**



Année académique 2008-2009

Dissertation présentée par  
Valérie LECHIEN  
en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences

*Le commencement de toutes les sciences,  
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont.*

*Aristote*

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Philippe Thonart, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordée tout au long de mes recherches.*

*Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est ; aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici en particulier au Professeur Jean Grandjean (Service de Chimie Organique et Spectroscopie Multinucléaire, Ulg), qui de plus m'a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse, au Professeur André Rulmont (Service de Chimie Inorganique Structurale, Ulg), au Professeur Christian Dupuis (Service de géologie fondamentale et appliquée, FPMs) sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour, au Professeur Muriel Fairon-Demaret (Service de paléobotanique, Ulg), qui m'a guidée avec patience et indulgence lors de mon apprentissage de la paléobotanique.*

*Messieurs Philippe Gerrienne et Christian Rodriguez m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je les en remercie profondément.*

*Je remercie M. Benoit Jourez et Mme Cécile Verheyen du Centre de Recherche de la Nature, des Forêts et du Bois, direction de technologie du bois (Gembloux, Belgique) pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de leur part.*

*Mes remerciements s'adressent également au professeur Albert Bolle (Institut de Mécanique et de Génie civil, laboratoire de Géotechnologies, Ulg), au professeur Monique Carnol (Service d'Ecologie végétale et microbienne, Ulg), au professeur Bernard Gilbert et M. Stéphane Luts (Service de Chimie Analytique et Electrochimie, Ulg), Mme Monique Liégeois (Service de Chimie Inorganique Structurale, Ulg), M. Thomas Gerards et ses collègues (Service de paléobotanique, Ulg), M. Vincent Chapeau (Occhio s.a., Liège, Belgique) pour leur assistance technique et leurs conseils.*

*Je remercie de plus tous les généreux donateurs des bois fossiles de la collection constituant la base de ce travail de recherche, à savoir M. Freddy Damblon (Musée des Sciences Naturelles de Bruxelles, Belgique), Mme Isabel Figueiral (Université de Montpellier, France), M. Tom van Hoof (Université d'Utrecht, Pays-Bas), M. Marc Philippe (Université de Lyon, France) et la Société Sibelco (Maasmechelen, Belgique).*

*J'associe également à mes remerciements tous les membres du Centre Wallon de Biologie Industrielle de Liège et de Gembloux pour leur assistance technique et leur bonne humeur. C'est également l'occasion de remercier les « drôles de dame » du laboratoire (Cécile, Isabelle, Brigitte, Carine et Chi) pour leurs séances de papotage, ainsi que mon mémorant Gianni pour sa contribution à mes travaux de recherche.*

*Un merci tout particulier à Serge Hiligsmann pour son assistance sur le terrain et en laboratoire quand j'en avais besoin, ses temps « libres » et soirées consacrés à la relecture de certains de mes écrits dont cette thèse, nos séances de débriefing et sa disponibilité tout au long de ces six dernières années, ses encouragements dans les moments les plus « sombres » et ses délicieux cocktails mojito créés spécialement pour une future maman !*

*Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement mes parents, mon mari, ma famille et tous mes amis.*

## Abstract

Cellulose is the most abundant and renewable biopolymer on earth. Generally, it is well known for its structure properties or its natural and industrial derivatives due to its biodegradability or easily controlled transformation. By contrast, non-biodegradable cellulose is relatively unusual and not intensively investigated. The discovery of well preserved Miocene fossil woods during a recent excavation from the Entre-Sambre-et-Meuse (ESEM) karsts (southern Belgium) gives a rare opportunity to investigate resistant cellulose. The wood specimens were examined using physicochemical and biochemical techniques in order to correlate the exceptional preservation of these fossilized remains after 15 million years to the non-biodegradability of their lignocellulose content. Structural and chemical changes were assessed by comparing the structural features of the fossil samples with those of their modern counterpart, *Metasequoia*. Solid state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) and microscopic analysis showed good preservation of the cellulose structure in the fossil wood from the ESEM peat deposit. Moreover, there also appears to be a complete loss of hemicelluloses in the fossil wood structure maybe due to their branched structure and their lower molecular weight. According to several authors, the peatification, the initial biochemical stage of coalification, is characterized by a complete loss of hemicelluloses and a significant reduction in cellulose, which is completely degraded after a short span of geological time. However, the cellulose content, similar to that found in the living species *Metasequoia*, suggests that the ESEM fossil wood is at a very early stage of peatification. Compared to the lignin in modern *Metasequoia*, the lignin structure has undergone slight chemical alteration such as demethoxylation, cleavage of some  $\beta\text{-O-}4'$  linkages and alkylation of the resulting catechol-like structures. Furthermore, since uncondensed structures were degraded in the fossil woods, the condensed structures already present in the original lignin, became more dominant. Despite the substantial cellulose fraction available in the fossil tissue, degradation tests showed that the fossil cellulose could not be degraded by cellulases and microorganisms usually involved in the biodegradation of organic matter. This lack of bioavailability could be due to the structural features of the fossil biopolymers (cellulose, extractives and lignin) or the burial environment. In our work, we have analyzed the influence of the crystallinity, the size of crystallites, the type of crystal lattice and the ratio of two allomorphs  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  as well as the morphology of the cellulose microfibrilles on the cellulose digestibility. These cellulose

structural features seemed to have no effect on cellulose biodegradability in the Miocene woods samples. On the other hand, the wood extractives (tannins, resin acids, terpenes,...) may contribute to some resistance properties of the fossil cellulose but their action is not sufficient to explain the inhibition of the cellulose degradation. On the basis of our observations, we suggest that the presence of a modified lignin structure greatly influences cellulose biodegradability. Indeed, by altering the lignin structure with various delignification pretreatments and studying the effect of the resulting changes on enzymes efficiency, we showed that the disintegration of the condensed structures, linked to the drastic reduction of the uncondensed structures, could have significant impact on the major improvement of the cellulose bioavailability. In conclusion, the nature and/ or the proportion of intermolecular substructures could be the key of the cellulose protection.

## Résumé

La cellulose est le biopolymère le plus abondant et le plus renouvelable sur terre. Généralement, il est reconnu pour ses propriétés structurales ou ses dérivés naturels et industriels, eux-mêmes caractérisés par leur biodégradabilité ou leur mise en œuvre facilement contrôlée. Par contraste, une cellulose non-biodégradable est relativement inhabituelle et peu étudiée. La découverte de bois fossiles du Miocène extrêmement bien préservés au cours d'exploitations récentes de karsts de l'Entre-Sambre-et-Meuse (ESEM, Belgique) offre une rare opportunité d'étudier une cellulose résistante. Les spécimens de bois ont été examinés à l'aide de techniques physicochimiques et biochimiques en vue de corrélérer la préservation exceptionnelle de ces macrofossiles après 15 millions d'années à la non-biodégradabilité de leur contenu cellulosique. Les modifications structurales et chimiques ont été attribuées en comparant les caractéristiques des échantillons fossiles avec ceux de leur équivalent moderne, le *Metasequoia*. Les analyses microscopiques et par résonance magnétique nucléaire  $C^{13}$  de l'état solide ont révélé une préservation importante de la structure cellulosique dans les bois fossiles des dépôts argilo-tourbeux de l'ESEM. De plus, la concentration en cellulose est proche de celle présente dans l'espèce moderne, *Metasequoia*. Par contre, une perte complète des structures hémicellulosiques est constatée. Celle-ci pourrait être attribuée à leurs structures branchées et leurs faibles poids moléculaires. Ces observations suggèrent que les bois fossiles de l'ESEM se situent à un stade très précoce de la turbification. En effet, selon différents auteurs, la turbification, le

stade biochimique initial de la coalification, est caractérisée par une perte complète des hémicelluloses et une réduction significative de la cellulose, qui est complètement dégradée après un très court intervalle de temps géologique. Par comparaison avec la lignine de l'espèce moderne, la structure ligneuse fossile a subi de légères altérations chimiques telles que des déméthoxylations, le clivage de certains liens intermoléculaires ( $\beta$ -O-4' en majorité) et l'alkylation des structures catéchols résultantes. En outre, les structures condensées déjà présentes dans la lignine d'origine, sont devenues plus dominantes par rapport aux structures non-condensées qui ont subi de fortes dégradations dans les bois fossiles. Malgré la fraction cellulosique substantiellement accessible dans les tissus fossiles végétaux, les tests de dégradation ont montré que la cellulose fossile ne pouvait être que faiblement dégradée par des cellulases et les microorganismes impliqués habituellement dans les processus de biodégradation de la matière organique. Ce manque de réactivité pourrait être lié aux caractéristiques structurales des biopolymères fossiles (cellulose, composés extractibles et lignine) ou à la matrice d'enfouissement. L'implication de celle-ci dans le processus de préservation de la cellulose a été écarté car les conditions environnementales présentes actuellement dans les karsts auraient du favoriser la biodégradabilité de ces bois. Au cours de nos recherches, nous avons analysé l'influence de la cristallinité, la taille des cristallites, le type de réseau cristallin et le rapport entre les allomorphes  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  ainsi que la morphologie des microfibrilles de cellulose sur la digestibilité de la cellulose. Ces paramètres structuraux associés à la cellulose ne semblent pas avoir d'effet sur la biodégradabilité de la cellulose dans les échantillons de bois du Miocène. D'autre part, les composés extractibles (tannins, acides résiniques, terpènes,...) peuvent contribuer à la capacité de résistance à la décomposition de la cellulose fossile mais leur action n'est pas suffisante pour expliquer l'inhibition importante de la dégradation de la cellulose. Sur base de nos observations, nous suggérons que la présence d'une structure ligneuse modifiée influence fortement la biodégradabilité de la cellulose. En effet, en altérant la structure ligneuse avec différents prétraitements de délignification et en étudiant l'impact des transformations structurales sur l'efficacité de la dégradation enzymatique, nous avons montré que la désagrégation des structures condensées, liée à la diminution drastique des structures non-condensées, pourrait avoir un impact significatif sur l'amélioration majeure de la bioaccessibilité du substrat cellulosique. En conclusion, la nature et/ou la proportion des sous-unités intermoléculaires présentes dans la structure ligneuse pourrait être la clé de la protection exercée par la lignine.

## Liste des abréviations

∅	Diamètre
$\lambda$	Longueur d'onde
$\mu\text{m}$	Micromètres
Ac.	Acide
AN	Andenne (bois fossile)
B	Branche
BMP	<i>Biochemical methane potential assay</i>
C	Cœur
C-	Carbone
Ce	Cèdre
cfu/g	<i>Colony forming units/gram</i>
Ch	Chêne
Cha	Châtaignier
cm	Centimètres
CP-MAS	<i>Cross Polarization (polarisation croisée) - Magic Angle Spinning</i> (rotation à l'angle magique)
Crl	Indice ou degré de cristallinité
Da	Dalton
Do	Douglas
DU	Dunarobba (bois fossile)
Ep	Epicéa
ESEM	Entre-Sambre-et-Meuse
Flo	Florennes (bois fossile)
FTIR	Spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier
g	Gramme
h	Heure
HA, HB, HC	Hambach (bois fossile)
He	Hêtre
HO	Peroxyde d'hydrogène (Traitement de délignification)



HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
I	Intensité
ICP	Spectrométrie d'émission à couplage inductif
kDa	Kilo Dalton
KE	Kerguelen (bois fossile)
KHz	Kilo Hertz
kV	Kilo Volt
LA	Lampernisse (bois fossile)
LO	Longemaison (bois fossile)
m	Mètre
M	Molaire
Ma	Million d'années
mA	Milliampère
MABERG, MAOPL	Maasmechelen (bois fossile)
MEB	Microscope électronique à balayage
meq/g	Milliéquivalent/gramme
mg	Milligramme
MHz	Méga Hertz
ml	Millilitre
mm	Millimètre
ms	Milliseconde
Mt	<i>Metasequoia</i>
mUI	Milli unité internationale
mV	Milli Volt
NaCl	Chlorite de sodium (Traitement de délignification)
nd	Non déterminé
NDF	Détergent neutre
nm	Nanomètres
OCT	Temps de contact optimal
Onh	Onhaye (bois fossile)
PI	Planche photographique
ppm	Partie par million
PS	Pin sylvestre

RID	Détecteur réfractométrique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RX	Rayons X
s	Seconde
Seq	Séquoia
SN	Sulfite Neutre (Traitement de délignification)
SOA, SOB, SOC	Sint Odiliënberg (bois fossile)
sp	<i>Specie</i>
°C	Degré Celsius
VCT	Temps de contact variable
v/v	Rapport volume/volume
w/v	Rapport masse/volume

# Table des matières

## ***Chapitre I : Introduction***

<b>1. Préface</b> .....	1
<b>2. Généralités sur le bois</b> .....	3
2.1. Structure macroscopique .....	3
2.2. Structure chimique du bois .....	5
<b>3. Généralités sur les bois fossiles</b> .....	11
3.1. Les différents modes de préservation des fossiles végétaux .....	12
3.2. Evolution des biomacromolécules au cours de la fossilisation/chimie des bois fossiles .....	14
<b>4. Biochimie du processus de dégradation des composés du bois</b> .....	17
4.1. Description générale du processus biochimique de décomposition du bois .....	17
4.2. Biodégradation des composés cellulosiques .....	19
4.3. Biodégradation de la lignine .....	20
<b>5. Objectifs</b> .....	22

## ***Chapitre II : Matériels & Méthodes***

<b>1. Caractérisation paléobotanique des bois</b> .....	25
1.1. Détermination taxonomique par microscopie optique .....	25
1.2 Détermination taxonomique par microscopie électronique.....	25
<b>2. Description des différents substrats cellulosiques et lignocellulosiques étudiés</b> ....	26
<b>3. Caractérisation chimique des échantillons de sols et des substrats cellulosiques</b> .	28
3.1. Dosage de la cellulose et des hémicelluloses .....	28

3.2. Dosage de la lignine .....	28
3.3. Dosage des extraits .....	29
3.4. Dosage des cations échangeables .....	30
<b>4. Caractérisation biochimique des substrats celluloseux et des matrices</b>	
<b>d'enfouissement .....</b>	<b>30</b>
4.1. Hydrolyse enzymatique des composés celluloseux .....	30
4.2. Test BMP (Biochemical Methane Potential assay) .....	32
4.3. Tests d'inhibition de l'activité enzymatique et microbienne par des extraits de bois fossiles et un biocide .....	34
4.4. Comptage des microorganismes présents dans le sol .....	35
<b>5. Caractérisation physicochimique des substrats celluloseux .....</b>	<b>36</b>
5.1. Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	36
5.2 Résonance Magnétique Nucléaire <sup>13</sup> C de l'état solide (RMN) .....	38
5.3 Diffractométrie à rayons X .....	39
5.4 Caractérisation des produits d'oxydation de la lignine .....	40
5.5 Techniques chromatographiques .....	42
<b>6. Traitements appliqués aux substrats celluloseux .....</b>	<b>43</b>
6.1. Traitements de régénération et mercerisation de la cellulose .....	43
6.2. Traitements de délignification .....	44
<b>7. Caractérisation des matrices d'enfouissement .....</b>	<b>45</b>
7.1. Perméabilité des matrices d'enfouissement .....	45
7.2. pH et pH <sub>KCl</sub> des matrices d'enfouissement .....	46
7.3. Autres paramètres .....	46

## **Chapitre III : Résultats & Discussions**

### **1. Caractérisation paléobotanique, chimique, biochimique et structurale des bois**

<b>fossiles</b> .....	47
1.1 Caractérisation paléobotanique .....	47
1.2. Caractérisation chimique et biochimique .....	53
1.3. Caractérisation structurale .....	60
<b>2. Etude des conditions naturelles de fossilisation des bois fossiles</b> .....	<b>63</b>
2.1. Caractérisation physicochimique de la matrice d'enfouissement .....	63
2.2. Estimation de l'activité microbienne du sol .....	66
<b>3. Influence de la structure de la cellulose sur sa digestibilité</b> .....	<b>68</b>
3.1. Cristallinité, réseau cristallin, taille des cristallites et allomorphes I $\alpha$ /I $\beta$ .....	68
3.2. Morphologie des fibres .....	79
<b>4. Influence des extraits sur la bioaccessibilité de la cellulose</b> .....	<b>80</b>
4.1. Digestion enzymatiques de bois avec et sans extraits (Test 1).....	81
4.2. Inhibition de l'activité enzymatique par les extraits de bois (Test 2) .....	82
4.3. Inhibition de l'activité microbienne par les extraits de bois (Test 3) .....	84
<b>5. Influence de la lignine sur la bioaccessibilité de la cellulose</b> .....	<b>86</b>
5.1. Caractérisation de la structure de la lignine des bois fossiles de Florennes.....	87
5.2. Essais de délignification et leur impact sur la bioaccessibilité de la cellulose....	92
5.3. Tests ECD <i>in vitro</i> sur des monomères de lignine .....	100

## **Chapitre IV : Conclusions & Perspectives**.....101

## **Chapitre V : Bibliographie**.....112

<b>Annexes</b> : Annexe 1 : Lexique .....	125
Annexe 2 : Lexique des structures chimiques .....	127
Annexe 3 : Planches photographiques .....	130

# **Chapitre I : Introduction**

## **1. Préface**

Dans la plupart des écosystèmes terrestres, le bois est progressivement dégradé par des processus chimiques et biochimiques tels que l'activité bactérienne et/ou des champignons, l'hydrolyse enzymatique et l'oxydation chimique. En conséquence, les matériaux le constituant peuvent participer au cycle de la nature (Staccioli et al., 1997; Opsahl and Benner, 1999). A cela s'ajoutent des phénomènes physiques qui feront que, en fonction des conditions géologiques, les tissus cellulaires peuvent subir différents types de fossilisation. Les plus courants sont la minéralisation et la carbonification\* (Creber and Chaloner, 1984). La vitesse relative et l'ampleur de ces mécanismes de dégradation, compression et/ou minéralisation déterminent si le bois fossile potentiel sera plus ou moins conservé (Horwood, 1991).

Plusieurs études sur des bois biodégradés et carbonifiés d'origines et d'essences différentes ont montré que la transformation progressive des parois cellulaires de bois récents en matériel lignitifé est dominée par des processus similaires (Hatcher et al., 1982; Hedges et al., 1985; Stout et al., 1988). Ces processus comprennent (i) la perte relativement rapide des hémicelluloses, (ii) la dépolymérisation biochimique au début de la turbification\* et (iii) la perte progressive de tout le matériel cellulosique durant la lignitification\*. Cette dernière est vraisemblablement liée à l'action de microorganismes anaérobies et/ou de processus géochimiques. Ces transformations diagénétiques\* résultent aussi en la biotransformation progressive de la lignine, conduisant à la formation d'un réseau d'hydrocarbures aromatiques (Venkatesan et al., 1993). Des études de résonance magnétique nucléaire <sup>13</sup>C de l'état solide et de pyrolyse (Bates and Hatcher, 1989; Hatcher et al., 1989a) ont en effet démontré qu'au cours de la turbification\*, la lignine est altérée par dépolymérisation, déméthylation, déméthoxylation et autres défonctionnalisations.

---

\* Les mots surmontés d'un astérisque sont définis dans le lexique situé dans l'Annexe 1.

Dans certains cas, une partie des composés constituant la structure du bois résiste à la dégradation, et cette résistance affecte en retour le processus de vieillissement et de fossilisation (Fengel, 1991). Les biopolymères peuvent en effet résister à la dégradation microbienne toutefois, leur préservation dans des bois d'angiospermes et de gymnospermes a rarement été mentionnée (Fengel, 1991; Moers et al., 1994; Yang et al., 2005). Même si ces études ont fourni un aperçu sur la préservation des bois au sein d'environnements différents, l'explication biochimique de cette préservation exceptionnelle n'a pu être dévoilée. Dans ce sens, l'existence de bois fossiles particulièrement préservés dans des karsts de l'Entre-Sambre-et-Meuse (ESEM) en Belgique est connue (Fairon-Demaret, 1992) cependant, aucune caractérisation chimique et/ou biochimique de ces matériaux n'a été réalisée auparavant.

Au cours de ce travail de doctorat, la nature des biomolécules présentes dans ces bois fossiles de l'ESEM a été étudiée en combinant des approches chimiques, biochimiques et physicochimiques, afin d'établir un lien entre l'état de préservation extraordinaire de ces bois et la non-biodégradabilité de leur contenu lignocellulosique. En effet, n'est-il pas curieux qu'après plus de 15 millions d'années d'enfouissement dans les sols de l'ESEM, ces bois et surtout la matière organique les constituant, résistent à toute tentative de dégradation par des microorganismes et des champignons ? Quelle est ou quelles sont les raisons de cette fabuleuse préservation de la cellulose, biomacromolécule majeure composant tous les bois ? Au cours de nos recherches, nous avons essayé de répondre à ces deux questions. Plusieurs pistes de travail ont été envisagées : certaines ont été écartées et d'autres se sont révélées très prometteuses. Si la résolution de cette énigme vous intrigue autant qu'elle m'a intriguée il y a cinq ans, je vous souhaite dès à présent une bonne lecture et la bienvenue dans le monde de la chimie du bois...



## 2. Généralités sur le bois

### 2.1 Structure macroscopique

Pour réaliser les études chimiques, physicochimiques et biochimiques inhérentes à cette thèse sur les bois fossiles, il est apparu que la détermination des espèces actuelles les plus proches des espèces fossiles étudiées était indispensable afin d'établir des comparaisons. De plus, étant donné que nous cherchons à comprendre comment la structure chimique des bois a pu évoluer afin de préserver sa matière première, la cellulose, il semble dès lors logique d'utiliser un témoin qui n'a pas subi de modifications de structure au cours du temps. Cette recherche de la taxonomie ou l'appartenance botanique des bois a nécessité la maîtrise d'un vocabulaire propre à l'étude de l'anatomie des bois. Par conséquent, ce paragraphe permet de fournir aux néophytes un aperçu général de la structure macroscopique des bois de gymnosperme, les conifères représentant la majorité des bois étudiés. Il reprend en effet un lexique des termes utilisés en paléobotanique et repris dans l'analyse de la taxonomie de la xylothèque ou bibliothèque des bois étudiés.

Afin de retracer la taxonomie\* d'un bois, trois plans de coupe classiques en botanique sont réalisés dans le xylème\* secondaire du bois : une section transversale perpendiculaire au grand axe du tronc, une section longitudinale radiale parallèle aux rayons du bois et une section longitudinale tangentielle perpendiculaire aux rayons (Figure 1).

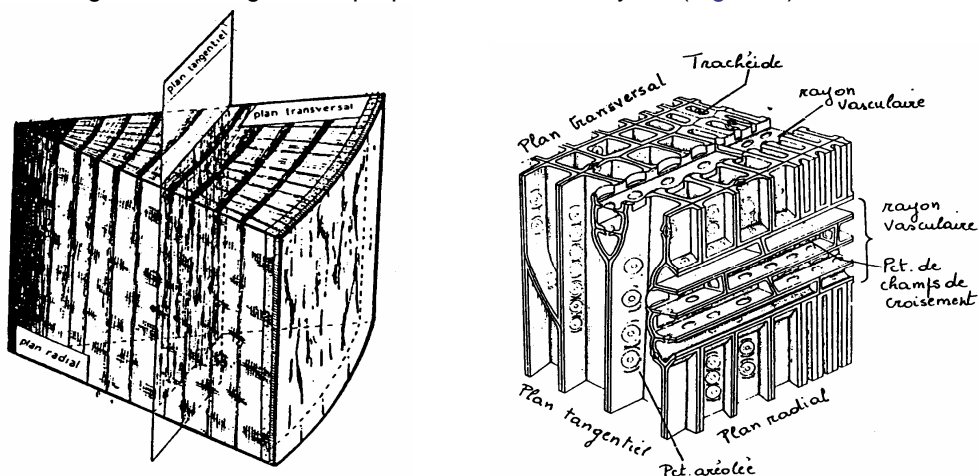
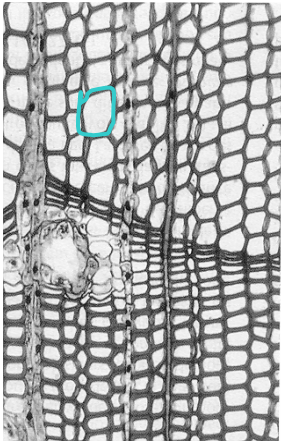
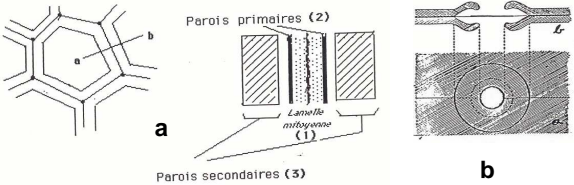
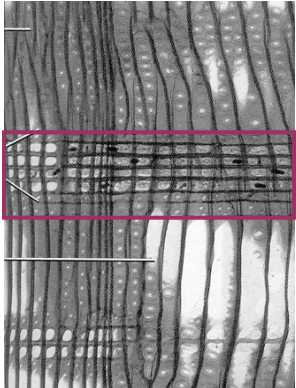
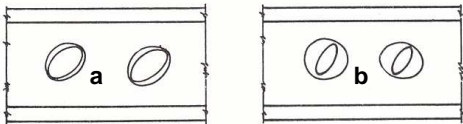


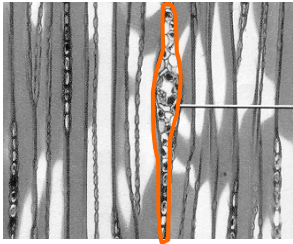
Figure 1 Représentation des trois plans de coupe classiques du xylème secondaire d'un conifère (Raven et al., 2000)

L'analyse de ces sections au microscope optique fournit différentes caractéristiques qui seront utiles pour retracer la taxonomie du bois. Le [Tableau 1](#) illustre le cas du pin (*Pinus strobus*) dont les caractéristiques présentes sur les sections transversale, radiale et tangentielle sont similaires à celles relevées sur la majorité des bois fossiles étudiés dans la thèse.

**Tableau 1 Description des différentes caractéristiques présentes sur les sections transversale, radiale et tangentielle de *Pinus strobus* (Echelle : 1 cm = 120 µm) (Raven et al., 2000)**

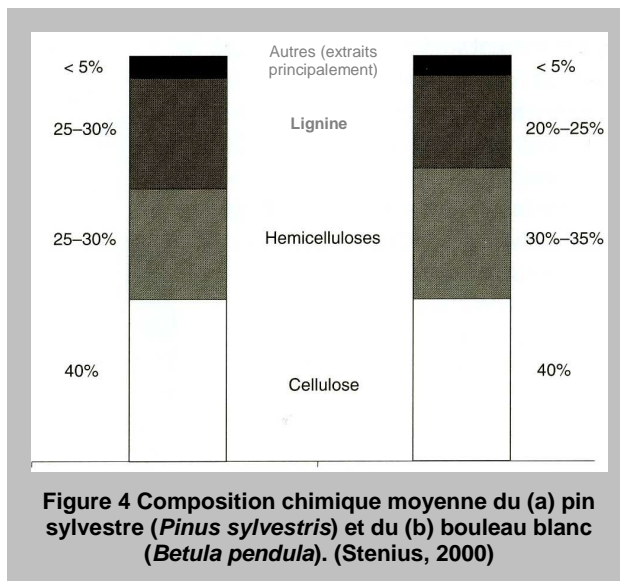
	Section	Description
Transversale		<p>La <b>trachéide</b> est une cellule polyédrique chargée de véhiculer l'eau et les sels minéraux dissous. Une section réalisée au travers de deux cellules adjacentes (<a href="#">Figure 2</a>) révèle une lamelle mitoyenne riche en composés pectiques et en lignine, une paroi primaire constituée de microfibrilles de cellulose et une paroi secondaire, présentant des paires de ponctuations<sup>1</sup>, dans laquelle les microfibrilles de cellulose sont incluses dans une matrice de lianine.</p>  <p><b>Figure 2 Détails de l'architecture des parois de deux trachéides adjacentes (a). Ponctuation aréolée (b)</b></p>
Longitudinale radiale		<p>La coupe radiale permet d'observer les caractéristiques des <b>champs de croisement</b>, c'est-à-dire des zones d'échange entre circulation verticale (trachéides) et horizontale (cellules de rayon). La forme des ponctuations, leur nombre dans chaque champ, l'aspect des parois sont des caractères utiles pour reconnaître l'espèce (<a href="#">Figure 3</a>).</p>  <p><b>Figure 3 Ponctuations taxodioides (a) et cupressoides (b)</b></p>

<sup>1</sup> Les ponctuations, simples ou aréolées, sont des interruptions de dépôt de la paroi secondaire

Longitudinale tangentielle		<p>Le <b>rayon vasculaire</b> est constitué de cellules les plus souvent allongées radialement et assurant la circulation horizontale de la sève. Pour déterminer une espèce à partir d'un fragment de xylème secondaire, il est nécessaire d'analyser les rayons et d'en relever la densité, la hauteur, la largeur, la composition (homogène ou hétérogène) et les caractéristiques des ponctuations des cellules.</p>
-------------------------------	---	--

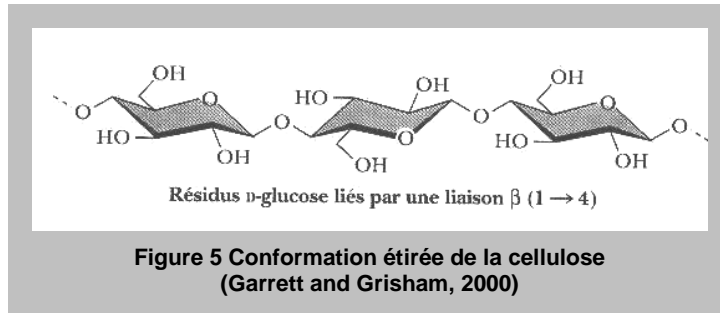
## 2.2 Structure chimique du bois

Les composés chimiques majeurs présents dans toutes les essences de bois, également appelés composés structuraux, sont la cellulose, les hémicellulose et la lignine. Les autres composés présents en moindre et souvent variable quantité sont les pectines, l'amidon et les protéines. En plus des ces macromolécules, divers composés non structuraux et généralement de faible poids moléculaire (extraits, quelques composés organiques hydrophiles et inorganiques) sont présents en petite concentration dans les angiospermes et les gymnospermes, plus familièrement appelés les feuillus et les conifères, respectivement. Le contenu cellulosique est plus au moins identique (environ 40-45 % de bois sec) entre ces deux types de bois, mais les gymnospermes contiennent habituellement moins d'hémicelluloses et plus de lignine (Figure 4).

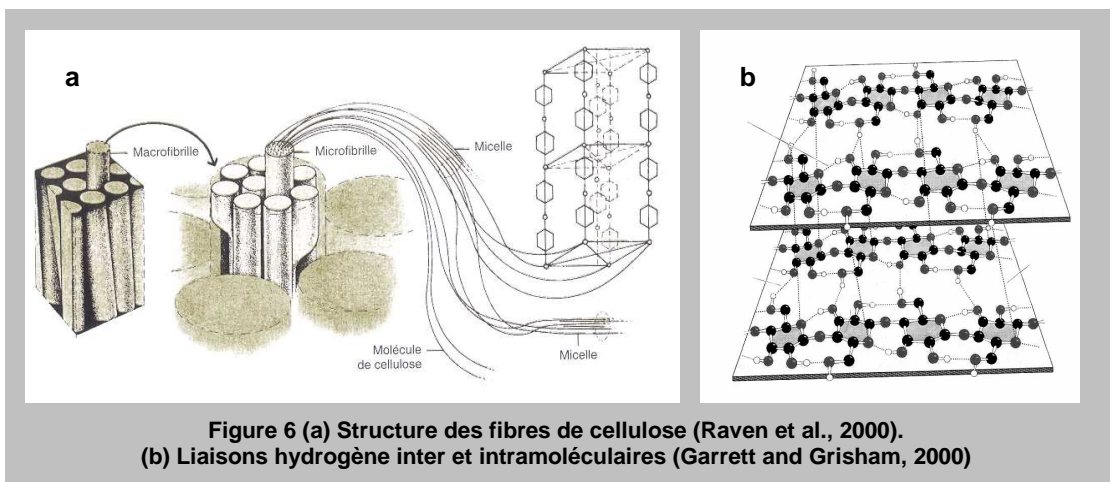


### 2.2.1 La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant de la biosphère et le composant majeur des parois des cellules végétales. Sa structure polymérique linéaire est constituée de 100 à plus de 10.000 résidus de glucose liés entre eux par des liaisons glucosidiques  $\beta$ -1,4 (Figure 5).



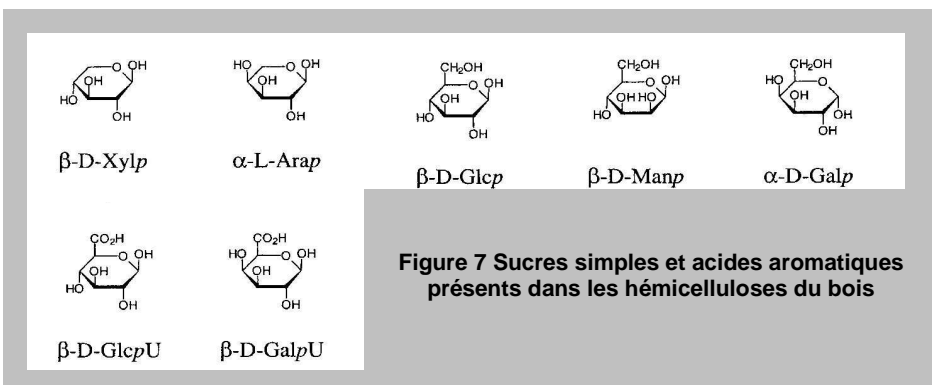
Dans les parois cellulaires du bois, les molécules de cellulose s'associent pour former des structures appelées « micelles » (Figure 6a). Ces micelles vont se grouper de façon parallèle et créer des ponts hydrogène transversalement, en plus de faibles liens de Van der Waals intermoléculaires, pour former des « microfibrilles » d'environ 10 à 25 nanomètres de diamètre. Ces microfibrilles représentent la structure caractéristique de la cellulose des parois primaires mais aussi les unités de base pour la construction des macrofibrilles. La structure tridimensionnelle de la cellulose est composée de chaînes de cellulose disposées côte à côte, liées par des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires, et formant ainsi des feuillets plats. Ces feuillets s'empilent, légèrement décalés les uns par rapport aux autres à la façon des briques dans un mur, ce qui permet d'accroître la solidité et la stabilité de la structure (Figure 6b).



Un point important à souligner, et sur lequel nous reviendrons dans les chapitres suivants, est que la disposition ordonnée des molécules de cellulose dans les micelles confère à la biomacromolécule des propriétés cristallines. La cristallinité représente la quantité relative de cellulose présente dans les régions cristallines (ordonnées) et amorphes (désordonnées). Une zone cristalline présentera des cristallites, ou micelles, sans défaut disposés selon un arrangement périodique infini tandis qu'une zone amorphe possèdera des cristallites organisés de manière aléatoire.

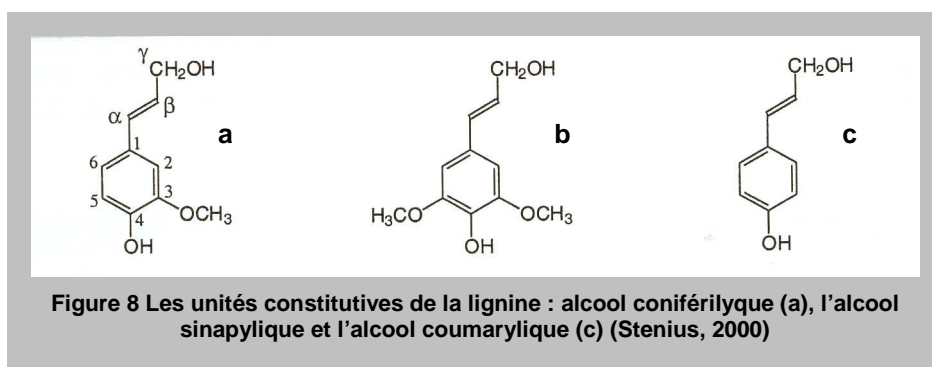
### 2.2.2 Les hémicelluloses

Dans les parois cellulaires, les microfibrilles de cellulose sont enrobées dans une matrice qui contient deux autres polysaccharides ramifiés complexes, les pectines et les hémicelluloses, ainsi que des protéines de structure, les glycoprotéines. Les hémicelluloses et les pectines sont perpendiculaires à ces microfibrilles et se disposent en formant un réseau. Les hémicelluloses sont constituées d'environ 50 unités de sucres simples, où le composant majoritaire est le xylane, c'est-à-dire des polyholosides formés d'unités D-xylose liées par des liaisons de type  $\beta$ -1,4 et  $\beta$ -1,3. L'épine dorsale des hémicelluloses est similaire à celle de la cellulose mais peut avoir des liaisons croisées d'hexoses (glucoses, mannoses, galactoses) et/ou de pentoses (xyloses et arabinoses) et également d'acides aromatiques (acide D-glucuronique et acide D-galacturonique) (Figure 7). Les hémicelluloses de résineux sont constituées principalement de galactoglucomannanes et d'arabinoglucuronoxylanes. Elles se distinguent de la cellulose par une stabilité chimique et thermique plus faible, vraisemblablement due à leur faible degré de polymérisation et leur structure amorphe.

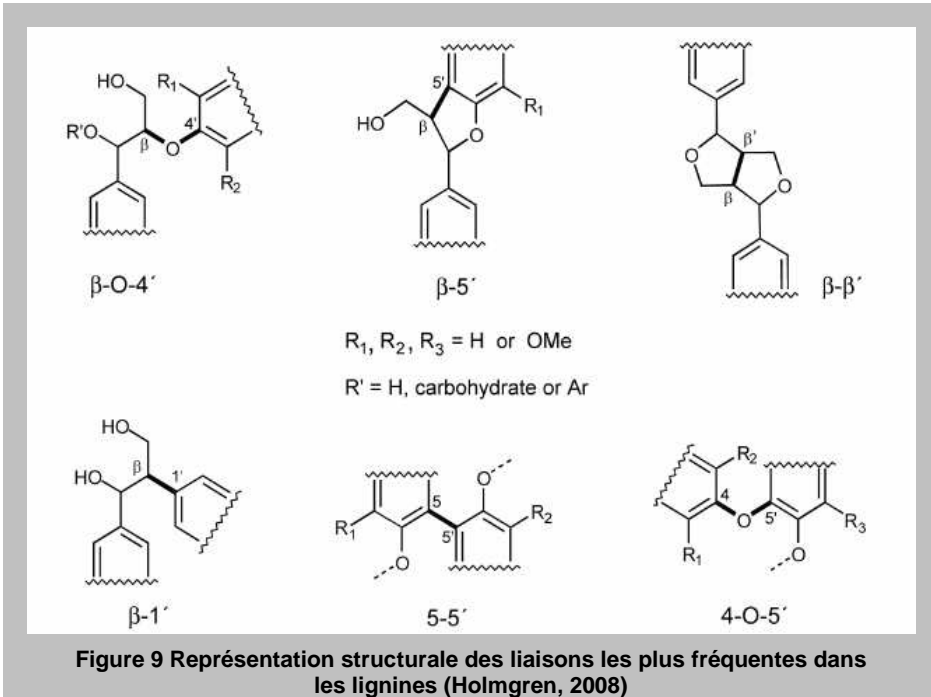


### 2.2.3 La lignine

La lignine est un polymère phénolique d'origine végétale de haut poids moléculaire, étroitement associé à la cellulose dans les bois. La lignine, composant majeur des parois végétales, est, après la cellulose, le second polymère le plus abondant du monde végétale. Elle fournit aux végétaux un support structural, assure l'imperméabilité et confère une résistance contre les attaques microbiennes (Perez et al., 2002). Ce polymère tridimensionnel provient de la copolymérisation radicalaire enzymatique de trois alcools phénylpropanoïques (Figure 8) : l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool coumarylique (ou p-hydroxycinnamylique).



La proportion des différents précurseurs des lignines varie en fonction des espèces, des tissus et même des fractions de paroi cellulaire. Par exemple, les lignines des gymnospermes sont habituellement référencées en tant que lignines guaiacyles car ses éléments structuraux sont principalement dérivés de l'alcool coniférylique. La nature du processus de polymérisation est telle que les lignines présentent une hétérogénéité importante de sous-structures avec six structures majeures inter-unités (Figure 9). Les liens inter-unités sont généralement des liaisons carbone-carbone ou des liens éther. Ces derniers représentent plus de deux-tiers des liaisons au sein de la structure ligneuse, le lien intermoléculaire  $\beta$ -O-4' (lien aryle-éther) étant le plus fréquent.



Les structures non condensées de la lignine sont généralement considérées comme celles impliquées uniquement dans les liens  $\beta$ -O-4' tandis que les structures 4-O-5', biphényles (5-5') et phénylcoumariques ( $\beta$ -5') constituent la majorité des structures condensées de la lignine (Liitia et al., 2002).

La polymérisation de la lignine n'est pas linéaire et les motifs de base associés entre eux constituent un réseau qui s'interpénètre dans le réseau de cellulose. La nature des différents liens entre la lignine et les polysaccharides est hautement complexe et loin d'être entièrement comprise. Cependant, il est communément accepté que la lignine est chimiquement liée avec au moins les hémicelluloses, même si il y a également des indications de liens entre la lignine et la cellulose. Les exemples des types de liaisons lignine-hémicellulose les plus fréquemment suggérés incluent les liens covalents du type benzyle éther, benzyle ester et phényle glycoside (Stenius, 2000). Ainsi, la lignine constitue une barrière physico-chimique qui limite très fortement l'invasion microbienne empêchant en conséquence la dégradation des polysaccharides. La variabilité de la dégradabilité des parois végétales serait liée à la variabilité de la teneur en lignine et au caractère plus ou moins linéaire ou réticulé du réseau de lignine (Grabber et al., 2004).

### 2.2.4 Les extraits

Les substances extractibles recouvrent une grande variété de composés (c'est-à-dire plusieurs milliers de composés individuels), la plupart de faible masse moléculaire, dont la nature chimique et la teneur des extraits varient considérablement selon les espèces, les genres ou les familles d'arbres. De manière générale, ces extraits sont soit solubles dans des solvants organiques (entre autres diéthyléther, dichlorométhane, acétone, éthanol, hexane, benzène, toluène, tétrahydrofurane) ou dans l'eau. Ces composés sont donc aussi bien lipophiles qu'hydrophiles. Le terme « résine » est souvent utilisé comme nom générique pour désigner les extraits lipophiles insolubles dans l'eau (à l'exception des composés phénoliques), qui peuvent être extraits d'un échantillon de bois par des solvants organiques non polaires (Stenius, 2000). Le [tableau 2](#) reprend la classification des extraits des bois.

**Tableau 2 Classification des extraits organiques dans les bois (Stenius, 2000)**

Composés aliphatiques et alicycliques	Composés phénoliques	Autres composés
Terpènes et terpénoïdes (dont les acides résiniques et les stéroïdes)	Phénols simples	Sucres
	Stilbènes	Cyclitols
	Lignans	Tropolones
Esters d'acides gras (graisses et cires)	Isoflavones	Acides aminés
	Tannins condensés	Alcaloïdes
Acides gras et alcools	Flavonoïdes	Coumarines
Alcanes	Tannins hydrolysables	Quinones

Même si la teneur en extraits dans les bois représente habituellement moins de 10 % de la matière sèche globale, ils transmettent la couleur, l'odeur et le goût au bois, et certains d'entre eux constituent la source d'énergie (graisses et cires) des fonctions biologiques dans les parois cellulaires. Certains extraits aromatiques présents dans des bois résistants à la dégradation possèdent des propriétés antifongiques et protègent également le bois contre des dommages microbiologiques ou les attaques d'insectes. Ainsi, la haute résistance aux champignons et aux termites de *Callitris glaucophylla* (pin de Cyprès) a été attribuée à la présence d'extraits dans le duramen (Evans et al, 1997). Kamdem (1994) a utilisé des extraits de duramen de *Maclura pomifera* (Oranger des Osages), *Robinia pseudoacacia* (Robinier faux-acacia), *Sequoia sempervirens* (Redwood) et *Intsia bijuga*



(Merbau) pour augmenter la résistance à la dégradation de *Populus tremuloides* (Peuplier faux-tremble). L'élimination d'une partie des extraits dans *Maclura pomifera* et *Robinia pseudoacacia* a également permis de réduire la résistance à la dégradation de ces bois. Par ailleurs, une étude de Nemli (2006) a montré que l'imprégnation avec des extraits d'écorce de *Pinus brutia* permet d'augmenter la résistance à la dégradation.

Suite aux risques sanitaires ou aux problèmes environnementaux associés à l'application d'agents de préservation chlorés et métalliques, un intérêt de plus en plus accru est porté sur l'utilisation d'espèces naturellement durables ainsi que la recherche d'alternatives à ces agents conventionnels de préservation. A l'heure actuelle, les extraits de duramen comme les acides résiniques, les polyphénols et les terpènes sont considérés comme des inhibiteurs actifs de la dégradation (Ratto et al., 2004 ; Mohammed-Ziegler et al., 2004 ; Pohjamo, 2003 ; Mantani et al, 2001 ; Choi et al, 2001 ; Shultz and Nicholas, 1997) même si le mécanisme régissant cette inhibition n'est pas connu de façon approfondie.

## 2. Généralités sur les bois fossiles

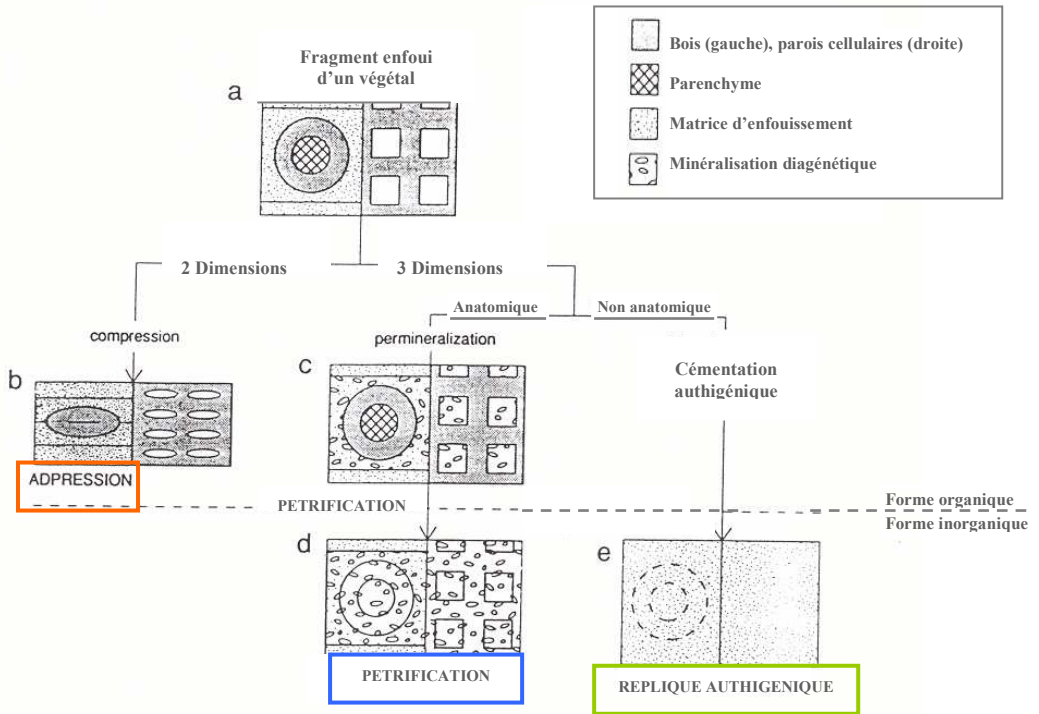
En dehors d'une petite communauté scientifique travaillant sur les bois fossiles, de nombreuses confusions apparaissent dans le langage courant quant à la définition correcte du terme « fossilisation » ; celle-ci étant trop souvent associée à une transformation du matériel vivant en pierre. Afin de fournir des éclaircissements sur ce point, ce paragraphe s'intéressera plus particulièrement aux modes de fossilisation des bois et à l'évolution des molécules chimiques au cours de la fossilisation.

**Qu'est-ce qu'un fossile?** On appelle fossiles les restes ou traces d'organismes qui ont vécu au cours des temps géologiques et qui ont été conservés dans des roches sédimentaires. L'état fossile s'exprime en terme de stabilité des matériaux constituant les organismes et du type d'environnement facilitant la préservation. La science qui a pour objet l'étude des fossiles est la paléontologie.

**Qu'est-ce que la fossilisation?** La fossilisation est l'ensemble des processus physico-chimiques qui aboutissent à la conservation dans des roches sédimentaires ou des roches métamorphiques, de traces ou de restes d'êtres vivants. Pour que la fossilisation ait lieu, une matrice de protection, habituellement sédimentaire, doit enrober les parties physiques des organismes. Par exemple, ils doivent être ensevelis et incorporés dans la croûte terrestre. Généralement, cette étape est réalisée par l'introduction dans un bassin de sédimentation (océan, lac, mer intérieure, estuaire ou dépôts fluviaux).

### 3.1 Les différents modes de préservation des fossiles végétaux

Dans les environnements terrestres actuels, le bois est progressivement dégradé par des processus tels que l'action bactérienne, l'hydrolyse et l'oxydation. Pour permettre toute forme de préservation des plantes, l'environnement où se fait le dépôt doit inhiber l'action des bactéries et des champignons. Les modifications du futur fossile sont intimement liées à la lithification du sédiment qui le recouvre, notamment la réduction de l'espace des pores (et par conséquent la circulation des fluides interstitiels et des gaz). Cela peut se dérouler physiquement (par compression du sédiment due à une pression surincombante\*) et chimiquement (par une minéralisation diagénétique\*). Les processus de destruction peuvent être ralentis, voire stoppés, par un enfouissement rapide dans un matériau mettant l'élément à l'abri de l'air (Staccioli et al., 1997). Dès l'instant où un organisme végétal est inclus dans un sédiment, il peut être soumis à cinq modes de fossilisation : la turbification\* (*peatification*), l'adpression, la perminéralisation\*, la pétrification\* et la céméntation authigénique (Bateman, 1991 ; Gerards and Gerienne, 2003) (Figure 10).



**Figure 10** Schéma résumant les différents modes de conservation des fossiles végétaux : la turbification (a), l'adpression (b), la perminéralisation (c), la pétrification (d) et la céméntation authigénique (e) (Bateman, 1991)

Lors de la turbification, après une rapide dégradation du cytoplasme, le volume de la plante ensevelie n'est pas modifié. Tôt ou tard, le fossile est soumis à la pression des couches sus-jacentes. Initialement, les espaces intracellulaires subsistent si cette compression n'est pas trop importante et les parois des cellules restent inchangées.

Au cours de l'**adpression** (cas le plus fréquent), le fragment végétal soumis à des pressions mécaniques perd plus de 80 % de son épaisseur originale et est comprimé. Si les composés organiques et les matières volatiles du fragment végétal ont été conservés en ne subissant que des modifications minimales, on observera une compression non coalifiée. Le plus souvent, les adpressions ont perdu toutes les matières organiques et de plus, les composés organiques ont été dégradés à des degrés divers, ne laissant assez souvent subsister que le carbone et donnant des compressions charbonneuses. Un autre mode de fossilisation est la **pétrification** au cours duquel le fossile, ayant perdu moins de 80 % de

son épaisseur d'origine, a toujours une structure tridimensionnelle. On parlera de perminéralisation lorsque la pétrification s'accompagne d'une conservation des tissus végétaux par des eaux chargées de minéraux dissous (carbonates, sels de fer, silice,...) qui les ont pénétrés et se sont cristallisés dans tous les espaces cellulaires et interstitiels. Ce mode de fossilisation conserve tous les détails de la morphologie et l'anatomie du végétal. Si la matière organique a disparu et que les tissus végétaux ont été remplacés par des minéraux cristallisés, le végétal sera qualifié de pétrifié au sens strict. Durant la céméntation ou **préservation authigénique**, des sédiments meubles pénètrent la cavité d'un organisme creux avant consolidation et seul un moulage du végétal est préservé.

### **3.2 Evolution des biomacromolécules au cours de la fossilisation/chimie des bois fossiles**

Parmi les modes de fossilisation présentés précédemment, la compression non coalifiée est le mode de fossilisation pour lequel des détails abondants sur l'évolution des structures des biomacromolécules du xylème\* secondaire de gymnosperme sont fournis dans la littérature. Elle représente le stade de la fossilisation qui nous intéresse le plus dans nos recherches. Ce type de fossilisation, plus communément appelé la voie de la transformation du bois en charbon ou *coalification*, se présente globalement en deux étapes. La première décrit les premiers stades de la coalification, soit la transformation de la lignine en lignite, et le deuxième reprend la transformation de la lignite en charbon (*coal*).

#### *Les étapes initiales de la coalification : de la lignine à la lignite*

La transformation du bois en *coalified wood* débute au stade de la tourbe dans laquelle la cellulose est préférentiellement dégradée et éliminée du bois alors que la lignine, un biopolymère aromatique du bois, est préservée sélectivement. L'aspect le plus étonnant de ce processus de dégradation, appelé turbification, est la sélectivité et la précision structurale avec lesquelles il se déroule. Essentiellement, le composé majeur du bois, la cellulose, et les hémicelluloses sont éliminées (Stout et al., 1989). Certains pourraient insinuer que la destruction physique du bois résulte de ce procédé, cependant, le bois turbifié conserve remarquablement sa morphologie. En effet, les structures délicates du bois apparaissent physiquement intactes bien que toute la cellulose a été dégradée.

Le bois a probablement été dégradé par des microorganismes (bactéries et champignons) qui utilisent des enzymes extracellulaires pour permettre la destruction du matériel cellulosique, procédé qui n'impliquerait pas de macération physique (Hatcher and Clifford, 1997). Sous certaines conditions, l'activité de tels microorganismes peut être supprimée, et cette suppression mène à un plus haut degré de préservation du matériel cellulosique dans la tourbe (Hatcher et al, 1989a). Toutefois, même si les composés cellulosiques peuvent résister à la dégradation microbienne, leur perte est la règle plutôt que l'exception au cours de la turbification\* (Hatcher et al., 1990).

Des études réalisées sur des bois turbifiés ont montré que ces bois sont constitués essentiellement d'unités structurales dérivées de la lignine, celle-ci ayant seulement subi de légères altérations au cours de la turbification\* (Stout et al., 1988 ; Hatcher et al., 1989a). En fonction de la nature de la lithologie\* et de l'importance de la surcharge, la diagenèse\* peut en effet altérer de façon plus ou moins prononcée la lignine dans les roches sédimentaires (Van Bergen et al., 1995). Au cours des stades plus avancés de dégradation de la lignine et donc vers une structure plus proche de celle du charbon, plusieurs transformations chimiques importantes de la structure ligneuse ont pu être identifiées (Figure 11) :

- La première réaction implique le clivage des liens aryle-éther au sein de la lignine, ce qui inclut l'hydrolyse des groupements méthoxyles par déméthylation (Figure 11, 1) et le clivage des liens  $\beta$ -O-4' (ou aryle éther) (Figure 11, 2). Ces deux réactions produisent des structures phénoliques résultant en la formation de structures catéchols (1, 2-dihydroxyphénols).
- Une autre réaction importante se déroulant durant les premiers stades de la coalification est le clivage des liens aryle-O dans la lignine, plus précisément ceux reliant les groupements méthoxyles aux noyaux aromatiques. La proportion de ces liens diminue lorsque le degré de coalification augmente.

- La dernière réaction consiste en une alkylation des structures catéchols adjacentes (Figure 11, 3) ce qui permet de maintenir l'intégrité physique au sein des lignites\*. Des changements supplémentaires plus subtils de la lignine comprennent la perte des groupements hydroxyles des chaînes latérales. Il est probable que celle-ci soit réalisée par une réduction des groupements hydroxyles en alkyles.

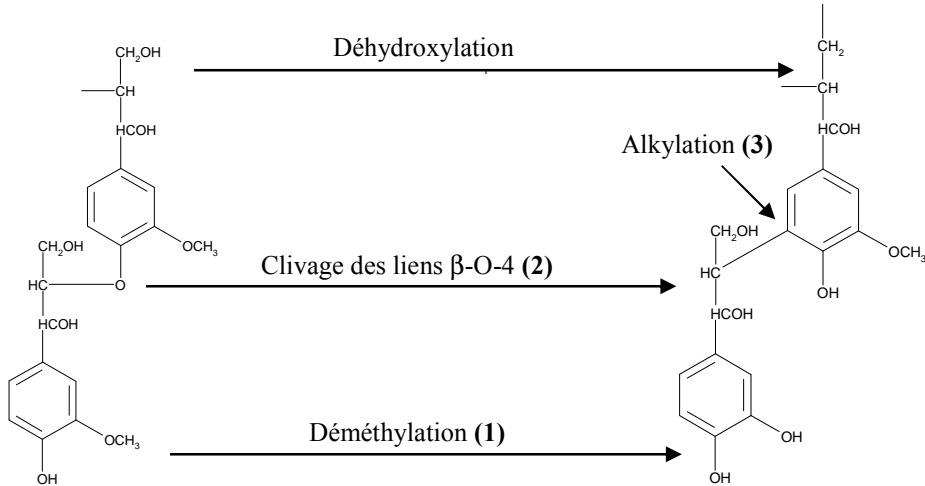


Figure 11 Réactions proposées pour la transformation des unités de la lignine en lignite (Hatcher and Clifford, 1997)

Durant la transformation du bois en lignite\*, les réactions de condensation s'intensifient, et, les noyaux aromatiques deviennent hautement substitués (Hatcher et al., 1990). Un certain nombre de réactions peuvent être responsables de cette augmentation :

- L'une des réactions possibles est un processus d'enrichissement sélectif pendant lequel les structures guaiacyles condensées, déjà présentes dans la lignine, sont devenues dominantes tandis que les structures non condensées ont été dégradées. En effet, les structures condensées habituellement présentes dans la lignine en petite quantité peuvent avoir montré une certaine résistance à la dégradation microbienne. Il s'ensuit les réactions inhérentes au processus de coalification, particulièrement les processus de dégradation capables de scinder les parties labiles de la lignine en molécules plus petites et plus solubles. Au fur et à mesure du processus de coalification impliquant la perte de molécules d'eau via la pression

surincombante\*, ces molécules ont été éliminées ne laissant que les structures guaiacyles condensées plus résistantes (Hatcher et al., 1989b).

- Une réaction envisageable est un *cross-linking* entre les unités guaiacyles induit par les réactions de coalification. Ces réactions ont peut être été augmentées par la déméthylation des unités guaiacyles. Les structures catéchols sont connues comme étant intrinsèquement plus réactives que les unités guaiacyles. Tout au long de l'évolution du processus de coalification et la déméthylation progressive des unités guaiacyles, l'augmentation des structures catéchols aurait induit des réactions de *cross-linking* (Hatcher et al., 1989a,b).
- Il est également possible que les structures non condensées aient été dégradées pour former des structures catécholes qui se sont polymérisées ou condensées par un processus oxydatif (Hatcher et al, 1989a).

#### *De la lignite\* au charbon*

La transformation de la lignite en charbon, appelée gélification, est caractérisée par des transformations qui résultent en une complète déméthylation des méthoxyphénols en catécholes et une réduction de ces structures catéchols en structures phénols (Hatcher et al., 1994).

## **4. Biochimie du processus de dégradation des composés du bois**

### **4.1 Description générale du processus biochimique de décomposition du bois**

La décomposition de la matière organique par des microorganismes aérobies et anaérobies est un procédé physiologique et biochimique complexe. La phase de dégradation aérobie, nécessitant la présence d'oxygène, est essentiellement présente lorsque les fragments de bois et autres débris végétaux commencent à s'accumuler sur un lit de sédiments. La présence d'oxygène donne la possibilité à la microflore de dégrader les matières organiques. Cette dégradation est accompagnée, suite à la respiration des bactéries, d'un dégagement gazeux qui est principalement constitué de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de vapeur d'eau.

Une fois les fragments de bois ensevelis sous des couches de sédiments, il devient impossible pour les microorganismes régnant en profondeur d'utiliser l'oxygène présent au niveau de la surface. Cette absence d'oxygène donne naissance à la phase anaérobie qui se subdivise généralement en quatre étapes successives : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Figure 12).

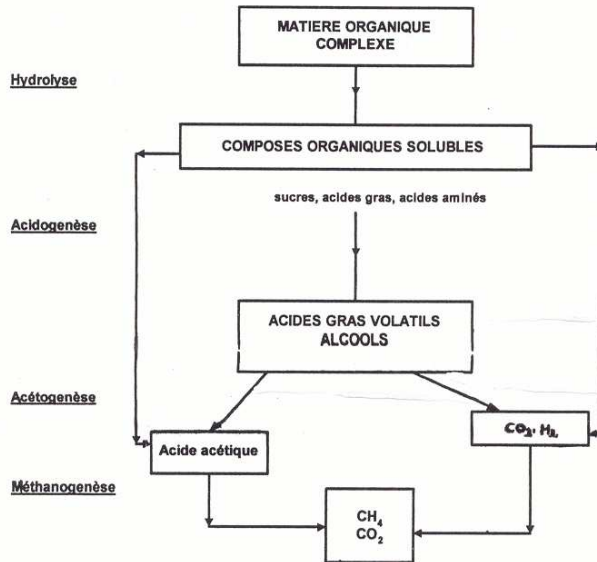


Figure 12 Quatre étapes caractéristiques du processus de biodégradation anaérobie de la matière organique

L'hydrolyse des polymères, c'est-à-dire la première étape des processus de biodégradation, est l'œuvre des bactéries hydrolytiques et fermentaires (aérobies, anaérobies strictes ou facultatives; mésophiles ou thermophiles). Ces bactéries sécrètent des enzymes extracellulaires responsables de l'hydrolyse de macromolécules telles que les polysaccharides, les protéines et les matières grasses en molécules plus petites (sucres, acides aminés, acides gras) (Barlaz et al., 1990). Au cours de l'étape d'acidogénèse, ces molécules sont converties par des bactéries acidifiantes notamment en alcools et molécules acides de petites tailles dont les plus importantes sont appelées acides gras volatiles (AGV). Le groupe des bactéries acétogènes qui intervient dans la troisième étape est très hétérogène et produit de l'acide acétique, de l'hydrogène et du dioxyde de carbone à partir des AGV. Quant aux bactéries méthanogènes, elles sont anaérobies strictes, c'est-à-dire que cette étape ne se produira qu'en absence totale d'oxygène. Un premier groupe consomme l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour donner du méthane (CH<sub>4</sub>), un second groupe transforme l'acide acétique en méthane et en dioxyde de carbone.



## 4.2 Biodégradation des composés cellulotiques

### 4.2.1. Microorganismes cellulolytiques

La cellulose est le composé organique le plus abondant sur la planète et représente par conséquent une vaste source d'énergie pour les microorganismes. La décomposition microbienne de la cellulose se déroule aussi bien dans des conditions aérobies qu'anaérobies. La capacité à dégrader en aérobiose la cellulose est largement répandue chez les champignons et est spécialement représentée à travers les Ascomycètes et les Basidiomycètes. La dégradation aérobie de la cellulose est également connue chez certaines espèces bactériennes du sol de type filamenteux (*Streptomyces*, *Micromonospora*) et non filamenteux (*Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*).

La dégradation fermentative de la cellulose est largement représentée chez les bactéries anaérobies strictes (*Acetivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*). Dans la plupart des environnements anaérobies, les bactéries sont presque exclusivement responsables de la dégradation de la cellulose. Les bactéries anaérobies utilisent des complexes multienzymatiques extracellulaires appelés cellulosomes, qui permettent une activité enzymatique concertée des différentes cellulases, et minimise la distance sur laquelle les produits d'hydrolyse de la cellulose doivent diffuser dans les cellules. Ce système efficace n'est pas présent chez les bactéries et les champignons aérobies qui produisent des systèmes libres de diffusion d'enzymes extracellulaires composés d'endoglucanases, d'exoglucanases et  $\beta$ -glucosidase qui agissent en synergie pour convertir la cellulose en glucose. En général, cependant, il est convenu que la majorité de la dégradation cellulotique dans les sols est réalisée par les champignons (De boer et al., 2005).

### 4.2.2. Mécanisme d'action

Le schéma généralement admis pour décrire l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en glucose est basé sur le système du champignon *Trichoderma reesei*. La cellulolyse est réalisée par l'action synergique de trois types d'activités enzymatiques regroupées au sein d'un complexe enzymatique repris sous le terme de cellulase.

Les sous-unités enzymatiques des cellulases sont (Schwarz, 2001) :

- les *endoglucanases* (1,4- $\beta$ -D-glucane-4-glucanohydrolase) agissant au hasard sur le polymère et libérant de nouvelles extrémités
- les *exoglucanases* qui agissent à partir des extrémités des chaînes de cellulose et de cellodextrines. Elles incluent les 1,4- $\beta$ -D-glucane 4 glucanohydrolases libérant du D-glucose, ainsi que les 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases libérant du D-cellobiose
- les  $\beta$ -*glucosidases* ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases) libérant des unités D-glucose à partir de cellodextrines et d'autres glucosides comme le cellobiose

La réaction d'hydrolyse catalysée par les glucosidases, comme les cellulases et les xylanases, procède par un mécanisme acide-base impliquant deux résidus sur le site catalytique (comme l'acide aspartique et l'acide glutamique). Un premier résidu agit comme un catalyseur acide et protone l'oxygène du lien glycosidique. Le second agit comme un nucléophile interagissant soit avec l'intermédiaire oxocarbonium formé après la première étape soit en induisant la formation d'un ion OH<sup>-</sup> à partir d'une molécule d'eau (Béguin and Aubert, 1994; Rye and Withers, 2000).

Les hémicelluloses sont également dégradées en sucres monomériques. Ainsi, le xylane qui est le polysaccharide principal des hémicelluloses est dégradé par l'action synergique d'endo-1,4- $\beta$ -xylanases qui libèrent des oligosaccharides et de xylane 1,4- $\beta$ -xylosidases qui libèrent du xylose. La dégradation des hémicelluloses nécessite également l'intervention d'enzymes complémentaires comme les xylane estérases, les férulic et *p*-coumaryliques estérases, les  $\alpha$ -arabinofuranosidases, etc. (Perez et al., 2002).

## 4.3 Biodégradation de la lignine

### 4.3.1. Microorganismes lignolytiques

Malgré sa large distribution et son apparition précoce dans la vie terrestre, la décomposition de la lignine est largement, mais pas exclusivement, représentée par certains champignons Basidiomycètes de type pourriture blanche (*white rot fungi*) (De boer et al., 2005). Certaines

bactéries actinomycètes comme les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* dégradent également la lignine (Vicuña, 1988; Berrocal et al., 1997). D'autre part, certaines bactéries, comme les *Pseudomonas sp.*, sont seulement capables de dégrader des parties de la structure de la lignine (Vicuña, 1988). Tous ces microorganismes permettent une dégradation significative de la lignine durant un processus de compostage lorsque des conditions d'humidité, de température et de balance carbone/azote sont respectées.

En absence d'oxygène, la lignine n'est pratiquement pas dégradée et les microorganismes évoluant dans ces conditions ne sont capables d'agir qu'en tant que dégradeurs secondaires en s'attaquant aux fragments de faible poids moléculaire issus d'une dégradation oxydative (Young and Frazer, 1987). Selon Van Soest (1994), la lignine peut persister pendant de très longues périodes en conditions anaérobies.

### **4.3.2. Mécanisme d'action**

La lignine est un polymère hétérogène qui ne contient pas de liens hydrolysables, ce qui signifie que les enzymes doivent agir par oxydation. La lignine a une structure tridimensionnelle irrégulière, ce qui conduit à plus d'attaques non-spécifiques comparativement aux autres polymères naturels (Hatakka, 2004). Les enzymes extracellulaires impliqués dans la dégradation de la lignine en condition aérobie sont :

- les *lignines peroxydases* (LIP) qui oxydent les noyaux aromatiques en présence de peroxyde et forment des radicaux chargés positivement (Kirk and Farrell, 1987; Perez et al., 2002)
- les *peroxydase Mn-dépendantes* (MnPs) où le Mn (III) oxyde les noyaux phénols de la lignine en radicaux phénoxyles qui induisent une dépolymérisation de la structure. Le Mn (II) est ensuite régénéré en Mn (III) en présence de peroxyde (Gold et al., 2000)
- les *laccases* (LAC) où les noyaux phénols sont oxydés en radicaux phénoxyles en présence d'oxygène ce qui conduit au clivage du polymère de lignine (Kirk and Cullen, 1998)

D'autres enzymes sont également citées comme d'une part, les *peroxydases versatiles* (VP) qui ont en même temps des activités *lignine peroxydases* et *manganèse peroxydases* (Camarero et al., 1999) et d'autre part, les *superoxyde dismutases* qui libèrent des radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) qui réagissent avec des radicaux produits par les autres enzymes lignolytiques (Leonowicz et al., 1999).

En fonction des facteurs environnementaux et climatiques présents, la dégradation de la matière organique, et notamment de la fraction lignocellulosique, conduit à la formation d'intermédiaires qui vont polymériser avec d'autres fractions organiques au cours d'un processus appelé humification. Cette humification aboutit à la formation de molécules organiques complexes : les acides humiques et fulviques. Au point de vue structure, ils sont composés de noyaux aromatiques, de chaînes aliphatiques et sont liés à des lipides, des sucres et des acides aminés (Koivula and Hänninen, 2001; Nanny and Ratasuk, 2002; Allard, 2005). Le temps de demi-vie de ces macromolécules, très faiblement biodégradables, peut atteindre plusieurs siècles (Comans et al., 2000).

## **5. Objectifs**

Afin d'établir un lien entre l'état de préservation extraordinaire des bois fossiles de l'ESEM et la non-biodégradabilité de leur contenu lignocellulosique, trois pistes de travail ont été sélectionnées. La première et la deuxième impliquent la biomacromolécule de cellulose et les composantes l'enrobant (la lignine et les extraits). La troisième piste concerne les paramètres environnementaux caractérisant les sites d'enfouissement des bois fossiles. Toutefois, avant de vérifier ces trois hypothèses de travail, il était nécessaire d'étudier plus intimement les bois fossiles et donc d'en déterminer leurs caractéristiques chimiques, biochimiques et structurales. Cette thèse a donc été scindée en cinq parties, chaque partie ayant pour but d'apporter un élément de réponse à la question « quels sont les propriétés physicochimiques ayant influencé la préservation exceptionnelle de la cellulose des bois fossiles ? »

▪ **Caractérisation paléobotanique, chimique, biochimique et structurale des bois fossiles**

Pour réaliser les études chimiques, physicochimiques et biochimiques inhérentes à cette thèse sur les bois fossiles, il est apparu que la détermination des espèces actuelles les plus proches des espèces fossiles étudiées était indispensable afin d'établir des comparaisons. De plus, étant donné que nous cherchons à comprendre comment la structure chimique des bois a pu évoluer afin de préserver sa matière première, la cellulose, il a semblé dès lors logique d'utiliser un témoin qui n'avait pas subi de modification de structure au cours du temps. Par ailleurs, à ce stade de notre étude, une détermination du stade de fossilisation des bois fossiles semblait aller de pair avec nos objectifs puisqu'elle permettrait de comparer l'évolution des structures chimiques des bois fossiles par rapport à celle constatée dans la littérature. Afin d'établir un lien entre la biodégradation du substrat cellulosique présent dans les bois fossiles et les paramètres physicochimiques les caractérisant, les bois fossiles étudiés ont finalement été caractérisés en combinant des approches chimiques, biochimiques et structurales.

▪ **Influence des paramètres environnementaux**

Il s'agit ici d'étudier l'influence des paramètres extérieurs telles que l'humidité, l'imperméabilité, l'acidité,.. de la matière organique ou ligniteuse susceptibles d'avoir contrôlé la préservation de la cellulose des bois fossiles. En effet, s'ils n'ont pas, ou peu, subi de dégradation depuis plusieurs millions d'années, les bois fossiles ont pu bénéficier de conditions d'ensevelissement particulières conduisant, d'une part, à leur préservation et/ou, d'autre part, à une modification de leur structure qui à l'heure actuelle leur permet de se conserver dans des conditions tout à fait hostiles.

▪ **Impact de la cellulose sur sa propre bioaccessibilité**

La biodégradabilité de la cellulose présente dans les bois fossiles étudiés pourrait s'expliquer par un manque d'accessibilité dû aux propriétés physico-chimiques (cristallinité, degré de polymérisation, surface spécifique, porosité des fibres) de la cellulose fossile. Au cours de ce doctorat, l'impact de la cristallinité (et autres paramètres associés), de la surface et de la morphologie des fibres sur le taux d'hydrolyse de la cellulose fossile a ainsi été investigué.

▪ **Influence des extraits sur la bioaccessibilité de la cellulose**

Une des hypothèses de travail de cette thèse se base sur l'effet protecteur que les extraits de bois fossiles pourraient exercer sur la biodégradation de la cellulose des bois et ce, par exemple, par l'inactivation des enzymes responsables de la dégradation de la cellulose. En effet, certains extraits ou composés phénoliques présent dans des bois résistant à la dégradation sont toxiques à certains champignons et autres microorganismes. Trois tests différents seront donc réalisés afin de mettre en évidence l'importance du rôle des extraits de bois dans la préservation de la cellulose.

▪ **Influence de la lignine sur la bioaccessibilité de la cellulose**

Le mécanisme de préservation sélective des polysaccharides pourrait également être lié aux caractéristiques de la lignine dont les caractéristiques physicochimiques seront déterminées au cours de cette étude. La lignine est en effet connue pour son action inhibitrice de la dégradation des polysaccharides. Dans notre cas, elle pourrait donc constituer un obstacle important à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Dans cette optique, une modification de l'organisation structurale du complexe lignocellulosique nous permettra de déterminer l'impact de la lignine sur la bioaccessibilité de la cellulose.

## **Chapitre II : Matériels & Méthodes**

## 1. Caractérisation paléobotanique des bois

Afin de procéder à l'étude de l'accessibilité des substrats celluloseux au sein des bois fossiles, il est nécessaire de retracer l'appartenance botanique de ceux-ci pour disposer de points de comparaison, en l'occurrence l'espèce actuelle la plus proche. En relevant les différents caractères sur les coupes du bois fossile et en recherchant dans la littérature les bois fossiles possédant le même type de caractéristiques, il est possible de déterminer l'espèce fossile et par la même, l'espèce actuelle.

### 1.1 Détermination taxonomique par microscopie optique

Les trois plans de coupe classiques en botanique (transversal, radial et tangentiel) sont effectués à main levée dans les échantillons à l'aide d'une lame de rasoir. Suivant le processus habituel (Schoch et al., 2004), les sections sont éclaircies à l'eau de javel, rincées et mordancées à l'acide acétique. Les sections des échantillons de *Metasequoia* ont de plus subi une étape de coloration à la safranine pour améliorer le contraste entre les différents éléments constitutifs des tissus cellulaires. Pour obtenir un meilleur contraste, quelques gouttes de glycérine sont étalées sur la section et la lame est recouverte avec un couvre-objet. Les différentes coupes sont ensuite examinées au microscope photonique (Polyvar, Reichert, New-York, USA) et les différents caractères sont relevés.

### 1.2 Détermination taxonomique par microscopie électronique

Certains fragments intéressants ont été fixés sur un porte-objet en aluminium pour le microscope électronique avec de la colle conductrice (*dotite point*). Le porte-objet et les fragments sont ensuite métallisés dans un pulvérisateur cathodique (SPI-MODULE™ Sputter Coater). Le vide est fait dans la chambre de pulvérisation et de l'or est vaporisé. Les spécimens sont ensuite examinés au microscope électronique à balayage JEOL JSM-5800.



## 2. Description des substrats cellulose et lignocellulose étudiés

Etant donné la complexité des substrats lignocellulose étudiés, des paramètres tels que la structure de la cellulose, les composantes de la matrice enrobant la cellulose et l'environnement dans lequel ces substrats ont évolué, constituent autant de facteurs pouvant influencer la biodégradabilité de la cellulose des bois fossiles. Par conséquent, et afin de déterminer le rôle exercé par chacun de ces facteurs, cette étude a été dans un premier temps réalisée sur des systèmes simples ou non-lignocellulose. Dans ce sens, trois poudres de cellulose commerciales ont été choisies : l' $\alpha$ -cellulose, la cellulose médium et la cellulose microcristalline 20  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Trois fibres végétales (chanvre, lin et coton) et du papier Whatman n°1 (Whatman, Maidstone, Angleterre) ont également été sélectionnés. Le [tableau 3](#) reprend un bref descriptif de ces substrats. Les caractéristiques géologiques des systèmes plus complexes ou lignocellulose, c'est-à-dire les bois fossiles constituant la base de notre étude, sont repris dans le [tableau 4](#).

**Tableau 3 Caractéristiques des fibres commerciales et végétales de cellulose étudiées**

Source	Description	Référence
$\alpha$ -cellulose	Résidu fibreux insoluble obtenu par extraction de bois de gymnosperme avec une base forte. Bien que les $\alpha$ celluloses consistent en chaînes de $\beta$ -1,4-glucopyranose (89 - 90 %), elles contiennent également quelques unités non glucosidiques (xylane, mannane). La longueur moyenne d'une fibre est de 180 $\mu\text{m}$ .	Adams and Bishop (1953)  Sigma-aldrich (2009)
cellulose microcristalline 20 $\mu\text{m}$	Cellulose purifiée, partiellement dépolymérisée, obtenue par traitement avec des acides minéraux de l' $\alpha$ -cellulose de fibres végétales. Ce traitement permet d'éliminer les zones amorphes et de garder les zones cristallines de la cellulose. Sa masse moléculaire est alors d'environ 36.000 - 40.000 Da. La taille des particules de cette poudre commerciale est de 20 $\mu\text{m}$ .	OIV (2009)  Adrianor (2009)
cellulose médium	Fibres de cellulose, synthétisées à partir des fibres végétales de coton, de 50 à 350 $\mu\text{m}$ de long, 12 à 15 $\mu\text{m}$ $\varnothing$	Sigma-aldrich (2009)
papier whatman	Cellulose synthétisée à partir de linters de coton de haute qualité traités afin d'obtenir une teneur minimum en $\alpha$ cellulose de 98%.	Whatman (2009)
chanvre	60-66% cellulose, fibres de 5 à 50 mm de long, 10 à 30 $\mu\text{m}$ $\varnothing$	Université-du-Maine (2009)
coton	93-95 % cellulose, fibres de 25 à 30 mm de long	
lin	Environ 70% cellulose, fibres de 25 à 50 mm de long, < 25 $\mu\text{m}$ $\varnothing$	

**Tableau 4 Description de l'environnement géologique (origine, âge, environnement et taxonomie\*) des bois fossiles étudiés**

Dénomination		Origine	Age <sup>a</sup>	Environnement	Taxonomie	Référence
Andenne	AN	Andenne (Belgique)	Miocène moyen	Argile* accompagnée d'abondantes lignites* xyloïdes*	<i>Juniperoxylon</i>	Stockmans and Willière, 1934 Calement, 1948
Dunarobba	DU	Dunarobba, (Vallée du Tibre, Italie)	Pliocène	Argile	<i>Taxodioxylon gypsaceum</i> (Göbber) Kräusel	Benvegnù et al., 1989 Biondi, 1982 Palanti et al., 2004
Florennes	Flo	Florennes (ESEM, Belgique)	Miocène moyen	Argiles ligniteuses brun- noir à gris, très épaisses constituées d'une alternance de lits brun foncé riches en matières organiques et de lits plus clairs riches en silt.	-	De Putter et al., 1996 Nicaise, 1998
Hambach	H	Hambach (Allemagne)	Miocène	Lignites	-	Figueiral et al., 1999
Kerguelen	KE	Kuergelen (Ile de l'Océan Indien)	Pléistocène	Moraine* entourée de sédiments matins et de basaltes*	-	Philippe et al., 1998
Lampernisse	LA	Lampernisse (Belgique)	3550 ans	Tourbe*	<i>Pinus</i>	Stockmans and Vanhoorne, 1954
Longemaison	LO	Longemaison (France)	Miocène supérieure	Lignites	<i>Taxodioxylon distichoïdes</i> Huard, 1966	Philippe et al., 1992
Maasmechelen	MA	Maasmechelen (Belgique)	Miocène supérieure	Lignites avec localement des fragments de bois fossiles.	-	-
Onhaye	Onh	Onhaye (ESEM, Belgique)	Miocène moyen	Argiles ligniteuses avec localement des troncs de bois fossiles qui sont l'équivalent de la tourbe de la carrière.	-	Nicaise, 1998
Sint Odilienberg <sup>b</sup>	SO	Roermond (Pays-Bas)	Holocène	Sédiments essentiellement organiques et riches en argile	Chêne ( <i>Quercus robur</i> )	-

<sup>a</sup> Holocène (10.000 ans à aujourd'hui), Pléistocène (0.01 à 1.75 Ma), Pliocène (1.75 à 5.3 Ma), Miocène (23.8 à 5.3 Ma), Miocène moyen (10.2 à 15.2 Ma), Miocène supérieure (15.2 à 23.8 Ma)

<sup>b</sup> Ce bois fossile est le seul angiosperme de la Xylothèque.

\* Les mots surmontés d'un astérisque sont définis dans le lexique situé dans l'Annexe 1.

### **3. Caractérisation chimique des échantillons de sols et des substrats celluloses**

#### **3.1 Dosage de la cellulose et des hémicelluloses**

Les composés celluloses (cellulose et hémicelluloses) sont hydrolysés par voie acide et les monomères libérés sont dosés par HPLC en suivant la procédure reprise dans la section 5.5. Les quantités de glucose et de xylose libérées lors de l'hydrolyse permettent de déterminer la quantité de cellulose et d'hémicelluloses présente dans l'échantillon de départ (Pettersen and Schwandt, 1991).

Un échantillon représentatif de 300 mg est pesé dans une bouteille en verre, munie d'un septum et d'un capuchon à visser, est hydrolysé avec 3 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 72% pendant 1h à 30°C dans un bain-marie faiblement agité. L'échantillon est ensuite dilué avec de l'eau déminéralisée pour atteindre une concentration de 2,5 % d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  et est autoclavé à 120°C pendant 1 heure afin d'achever l'hydrolyse. Des témoins contenant 40 mg de D(+) glucose et D(+) xylose sont également préparés directement et sont autoclavés à 120°C pendant 1 heure afin de servir d'étalon interne permettant par la suite de corriger la fraction de sucres détruits par le processus d'autoclavage. Une fois les bouteilles refroidies, 16 ml d'hydrolysats sont neutralisés par 1.98 g de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Les hydrolysats sont ensuite agités (Vortex), puis sont centrifugés à 10.000 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse (Sorvall RC5C+, Asheville NC, USA). Chaque surnageant est finalement filtré sur une membrane de 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité (Sartorius filter, Gottingen, Allemagne) et est conditionné dans un vial avant d'être analysé par HPLC.

#### **3.2 Dosage de la lignine**

La quantité de lignine présente dans l'échantillon est déterminée par la perte de poids après un traitement avec un détergent neutre qui élimine les tannins et les cires (Goring and Van Soest, 1970 ; Rowland and Roberts, 1999) suivi d'un traitement de dissolution de la lignine au triéthylèneglycol-HCl (Edwards, 1973).

Environ 600 mg d'échantillon exactement pesés sont placés dans un ballon contenant 100 ml de solution détergent NDF<sup>2</sup>. La solution est portée à ébullition pendant une heure avec un système de reflux d'eau constitué par une colonne de refroidissement. La solution bouillante est ensuite filtrée sous vide et le résidu est lavé avec 150 ml d'eau bouillante. Le résidu est ensuite lavé au méthanol jusqu'à disparition de la coloration. Le résidu NDF est alors séché à 105°C pendant 2 heures et refroidi dans un dessiccateur. Environ 500 mg de résidus NDF exactement pesés sont ensuite introduits dans une bouteille en verre munie d'un septum et d'un capuchon à visser avec 30 ml de triéthylèneglycol- 0.2 % HCl. La solution est autoclavée durant une heure à 120°C. A près filtration sous vide de l'échantillon sur un filtre GF/C, le résidu est lavé avec de l'eau bouillante et avec du méthanol. L'échantillon est ensuite séché à 105°C, refroidi dans un dessiccateur et pesé. La quantité de lignine présente dans l'échantillon est calculée par la perte de poids par rapport au résidu NDF en tenant compte de la perte de poids liée à la procédure de lavage.

### **3.3 Dosage des extraits**

La séparation des extraits s'opère par extraction avec des solvants organiques selon la norme ASTM D1105-96 (2007). Cette extraction nécessite l'utilisation de trois solvants : un mélange éthanol/benzène (élimination des résines, des huiles, des cires et des acides gras), l'éthanol (élimination des tannins) et l'eau (élimination des matières colorantes, des sucres et autres matières hydrosolubles).

L'extraction est appliquée sur deux grammes de bois et 420 ml de solvant dans un dispositif Soxtec (6 extracteurs de type soxhlet placés en série) pendant quatre heures sous hotte. Le solvant consiste en un mélange éthanol/benzène (1/2 en volume). Le soxhlet permet de solubiliser, de manière répétitive, les extraits présents dans la matière végétale dans du solvant facilement condensé. Les extraits sont concentrés dans un ballon de récupération et les solvants sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor R, Büchi, Suisse).

---

<sup>2</sup> La préparation de un litre de solution détergente nécessite la mise en solution de 18,61 g de d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 6,81 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  dans 500 ml d'eau déminéralisée. 30 g de sodium lauryl sulfate (SLS) et 10 ml d'éthoxyéthanol sont ensuite ajoutés au milieu. Une solution de 300 ml d'eau déminéralisée contenant 4,56 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre est réalisée à part et est également ajoutée à la solution précédente. Le mélange est ajusté à un volume final de 1 litre.

La même procédure est répétée pour l'extraction avec l'éthanol (95%) à partir de l'extrait préalablement traité avec le mélange éthanol/benzène. Pour l'extraction avec l'eau, la matière, préalablement extraite avec le mélange éthanol/benzène et l'éthanol seul, est transférée dans un erlenmeyer contenant un litre d'eau désionisée. L'ensemble est porté à ébullition pendant une heure et filtré sur Büchner. Les extraits sont concentrés dans le ballon de récupération et l'eau est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Cette opération est répétée deux fois. À la fin de la troisième extraction, le résidu est récupéré puis séché à 80 °C jusqu'à masse constante.

### **3.4 Dosage des cations échangeables**

Les cations échangeables présents dans les sols sont analysés par spectrométrie d'émission de flamme (ICP) après extraction au  $\text{BaCl}_2$  (Hendershot and Duquette, 1986). Les cations échangeables sont extraits par agitation pendant 2 heures de 2 g d'échantillon de sol sec (fraction inférieure à 4 millimètres et pesée en sol frais) en présence de 20 ml d'une solution de  $\text{BaCl}_2$  0.1 M. Après centrifugation à 1100 g pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré, filtré et analysé par ICP-AES (Vista-Varian, Victoria, Australie) afin de doser les éléments minéraux suivants : Al, Ca, Mg, Na, Fe, K Mn et Zn.

## **4. Caractérisation biochimique des substrats celluloseux et des matrices d'enfouissement**

### **4.1 Hydrolyse enzymatique des composés celluloseux**

#### **4.1.1 Préparation du mélange enzymatique**

Les enzymes utilisées pour les tests d'hydrolyse enzymatique sont des complexes multi-enzymatiques fournis par Agrostar (Gembloux, Belgique). Le Viscozyme L® et le Celluclast 1.5L® sont des préparations (hémi)cellulolytiques liquides provenant respectivement d'une culture d'*Aspergillus aculeatus* et de *Trichoderma reesei*. Le Celluzyme® est une préparation cellulolytique solide provenant d'une culture d'*Humicola insolens*. La solution de Celluzyme est préparée en mettant en solution le produit commercial dans un tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M à pH 5,5 auquel 0,05 % d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) ont été ajoutés pour empêcher la croissance microbienne. Cette solutions est centrifugée à

10.000 g pendant 10 minutes puis est filtrée sur une membrane GF/C (Whatman, Maidstone, Angleterre). Avant toute utilisation, le Celluclast 1.5L et le Viscozyme L sont dialysés pendant 15 h en utilisant des membranes en nitrocellulose ayant une limite d'exclusion de 10 kDa (Sigma-Aldrich, S<sup>t</sup>-Louis, USA). Les volumes dialysés sont 100 ml de préparations enzymatiques contre 25 litres du tampon phosphate. Un litre de mélange enzymatique est obtenu en mélangeant 500 ml de Celluzyme à 20 g/l, 100 ml de Viscozyme L dialysé, 50 ml de Celluclast dialysé et 350 ml de tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M avec 0.05 %  $\text{NaN}_3$  à pH 5.5. Toutes les solutions enzymatiques sont conservées à 4 °C pendant quelques semaines tout au plus et les hydrolyses enzymatiques sont répétées plusieurs fois selon les cas.

#### **4.1.2 Détermination de l'activité cellulolytique**

Dans les cas des cellulases, une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzymes libérant une micromole de monosaccharides par minute. L'activité cellulolytique, exprimée en mUI/ml, des préparations est déterminée en utilisant un test de dégradation de papier filtre Whatman n°1 (activité FPase) décrit par Mandels (1976). Pour ce test, 50 mg de papier Whatman n°1 sont incubés avec 1,5 ml de solution enzymatique à tester pendant 1 heure à pH 5,5 et 40 °C. Des témoins sans substrat sont réalisés pour déterminer la présence résiduelle de sucre dans la solution enzymatique. Après incubation, les échantillons sont chauffés pendant 2 minutes à 100 °C pour stopper la réaction et les hydrolysats sont centrifugés à 10.000 g. Les surnageants contenant les monosaccharides libérés sont analysés par HPLC (*cf.* section 5.5.1).

#### **4.1.3 Test enzymatique de dégradation de la cellulose (test ECD)**

**(Rodriguez et al., 2005)**

Pour déterminer la fraction cellulosique biodisponible, 50 mg de substrat sont hydrolysés par 4 ml de mélange enzymatique pendant 48 heures à 40°C en appliquant une agitation. Toutes les hydrolyses sont réalisées en triple et des témoins sans substrat sont réalisés afin de mesurer la concentration résiduelle en sucre dans le mélange enzymatique. Après incubation, les hydrolysats sont centrifugés pendant 10 minutes à 10.000 g et les surnageants sont filtrés sur une membrane 0.2 µm pour être récupérés dans un vial. Les monosaccharides sont ensuite dosés par HPLC (*cf.* section 5.5.1). Pour déterminer la

biodisponibilité des composés celluloseux, la quantité totale de monosaccharides libérés est rapportée à la masse sèche initiale de l'échantillon.

#### **4.2 Test BMP (Biochemical methane potential assay)**

Le test BMP est réalisé en suivant la procédure décrite par Wang et al. (1994). Les échantillons sont placés dans des conditions anaérobies, et le processus de méthanisation lié à la bioconversion de la matière organique en méthane, est activé par l'apport d'une flore microbienne (boues de digesteur anaérobie). Le développement microbien est lui-même favorisé par l'ajout de cofacteurs tels que des minéraux, des oligo-éléments et des vitamines présents dans le milieu de culture Médium. Le biogaz produit est analysé par chromatographie en phase gazeuse.

Les compositions des différentes solutions utilisées pour réaliser le milieu de culture Médium sont reprises dans les [tableaux 6 et 7](#). Pour la mise en route du test, 1000 mg d'échantillon sont pesés dans des bouteilles en verre de 125 ml munies d'un septum et d'un capuchon à visser. Sous un flux d'azote, 5 ml de boues anaérobies (prélevées à la station d'épuration de l'Yerne) et 45 ml de milieu Médium, dont la composition est reprise dans le [tableau 5](#), sont versés dans les bouteilles. Chaque échantillon est testé par trois essais BMP. Après avoir scellé les bouteilles au moyen d'un septum, les traces d'O<sub>2</sub> sont éliminées par barbotage du milieu pendant 30 secondes avec du CO<sub>2</sub> via une aiguille traversant le septum. Ensuite, le CO<sub>2</sub> est chassé de l'espace gazeux de la bouteille en faisant passer un flux d'azote à travers le septum. La surpression éventuellement présente dans les bouteilles est ajustée à la pression atmosphérique en introduisant une aiguille montée sur une seringue de 5 ml à travers le septum et en laissant se détendre le piston si nécessaire. Des témoins sans substrat sont également réalisés afin de connaître la quantité de biogaz produite par les bactéries anaérobies à partir de la matière organique résiduelle contenue dans les boues. L'incubation est ensuite réalisée à 35°C, sans agitation, pendant une durée minimale de 100 jours. Au terme de chaque temps d'analyse, la surpression est mesurée dans chaque bouteille en perçant le septum à l'aide d'aiguilles montées sur des seringues allant de 5 à 60 ml. La composition du biogaz est analysée par chromatographie en phase gazeuse (*cf* Section 5.5.2). Le volume spécifique de méthane et de dioxyde de carbone produit est obtenu en multipliant le volume total de biogaz par la concentration en méthane et en dioxyde de carbone dans le biogaz.

**Tableau 5 Composition pour 1 litre de milieu Médium**

Composants	Pour 1 litre
Solution phosphate	100 ml
Solution M3	100 ml
Solution minérale	10 ml
Solution vitaminée	10 ml
Resazurin 0,1 % (Sigma-Aldrich)	2 ml
Eau déminéralisée	768 ml
<i>Ajustement du pH à une valeur de 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH 5 N</i>	
<i>Dégazage du milieu par barbotage avec de l'azote et du dioxyde de carbone</i>	
NaHCO <sub>3</sub> (Merck)	3,5 g
Cystéine hydrochloride 5 %	10 ml

**Tableau 6 Composition pour 1 litre de solution phosphate et 1 litre de solution M3**

Solution phosphate	(g)	Solution M3	(g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,1	NH <sub>4</sub> Cl	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	21,1	NaCl	9
		MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2
		CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1

**Tableau 7 Composition pour 1 litre de solution minérale et 1 litre de solution vitaminée**

Solution minérale	(g)	Solution vitaminée *	(mg)
Acide nitrotriacétique	1,5	Biotine	2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	Acide folique	2
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,1	Pyridoxine hydrochloride	10
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17	Riboflavine	2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1	Acide pantothénique	5
ZnCl <sub>2</sub>	0,1	Vitamine B <sub>12</sub>	0.1
NiCl <sub>2</sub>	0,026	Acide p-aminobenzoïque	0.1
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025	Acide thioctique	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01		
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01		
NaCl	1		
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,016		

\* vitamines fournies par Sigma-Aldrich et mises en solution dans un tampon phosphate NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 10 mM à pH 7,1.



### **4.3 Tests d'inhibition par des extraits de bois fossiles et un biocide**

#### **4.3.1 Préparation des extraits**

Avant de débiter les tests d'inhibition, une étape préliminaire consiste à préparer les solutions d'extraits de bois à tester. Celles-ci sont obtenues par extraction benzène/éthanol de 2 g de bois (*cf.* Section 3.3), déshydratation et remise en suspension dans du tampon phosphate pH 5.5.

#### **4.3.2. Test d'inhibition de l'activité enzymatique**

Afin de vérifier si la cellulose reste accessible aux enzymes cellulolytiques sous l'effet protecteur des extraits de bois, un substrat pur de cellulose est dégradé en présence d'extraits de bois fossile de Florennes.

Pour déterminer la fraction cellulosique biodisponible, les solutions d'extraits ou de biocide sont incubées avec 50 mg de papier whatman n°1 et 4 ml de mélange enzymatique pendant 48 heures à 40°C en appliquant une agitation (*cf.* Section 4.1.3). Les monosaccharides libérés au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose sont ensuite dosés par HPLC (*cf.* Section 5.5.1). La biodisponibilité des composés cellulosiques est déterminée en rapportant la quantité totale de monosaccharides libérés à la masse sèche initiale de l'échantillon.

#### **4.3.2 Test d'inhibition de l'activité microbienne**

Des méthodes de diffusion sont couramment utilisées pour investiguer l'action antibactérienne d'extraits de plantes. Ces tests se basent sur l'utilisation de puits creusés dans une gélose comme réservoir contenant la solution de substances à examiner (Brantner et al., 1994)

L'effet des extraits de bois ou du biocide sur la croissance microbienne est étudié sur des boîtes de pétri de milieu PCA géloséensemencées avec 100 µl d'une flore microbienne. Le milieu PCA est préparé en additionnant 5 g de peptone, 2.5 g de levure, 1 g de glucose et 15 g d'agar à 1 litre d'eau désionisée. La flore microbienne provient quant à elle d'un

consortium de bactéries (cf. Section 4.2). Cinq puits équidistants sont aménagés dans la gélose pour inoculer la solution d'extraits de bois ou de biocide à raison de 80 µl par puits. Les concentrations des solutions d'extraits de bois ou de biocide sont :

- Diffusion du biocide par des puits : 8 µl, 16 µl, 32 µl et 80 µl de Xylamon sont inoculés dans chaque puits ce qui correspond à 0.1 %, 0.2 %, 0.4 % et 1% de propiconazole par puits.
- Diffusion du biocide sur toute la boîte de pétri : 4 ml de Xylamon sont étalés sur la boîte de pétri ce qui correspond à une imprégnation avec 15 % propiconazole (0.15 g propiconazole/g glucose).
- Diffusion des extraits de bois par des puits : une solution mère contenant 240/140 mg d'extraits de bois de Florennes/*Metasequoia* déshydratés dans 2 ml d'eau désionisée, est préparée. 40 µl de la solution mère sont inoculés dans chaque puits ce qui correspond à 6 % d'extraits de bois fossile de Florennes et 3.5 % d'extraits de *Metasequoia* par puits.

Le volume final de solution inoculé dans chaque puits est ajusté avec de l'eau désionisée. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 30°C et contrôlées après 48 heures afin de déterminer l'étendue des zones d'inhibition et ce, par rapport à un témoin uniquement ensemencé avec la flore microbienne.

#### 4.4 Comptage des microorganismes présents dans le sol

Cette méthode ne dénombre que les cellules vivantes. Elle consiste tout d'abord à suspendre 5 grammes de terre dans 200 ml d'eau peptonée (Tableau 8). Après une heure d'agitation, les dénombrements sont réalisés par dilution de 10 en 10 de la suspension bactérienne dans de l'eau peptonée (Tableau 8). 0,1 ml des dilutions appropriées sont ensuite étalées en triplicata sur des boîtes de pétri de milieu 863 gélosé (Tableau 8). Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 48 heures. La concentration bactérienne initiale est déterminée par comptage des colonies qui se sont développées sur les boîtes de pétri et multiplication par le facteur de dilution.

**Tableau 8 Composition pour 1 litre de milieu 863 et d'eau peptonée**

Milieu 863	(g)	Eau peptonée	(g)
Peptone de caséine	10	Peptone de caséine	1
Extrait de levure	10	NaCl	5
Agar	20	Tween 80	1 ml
Glucose	10		

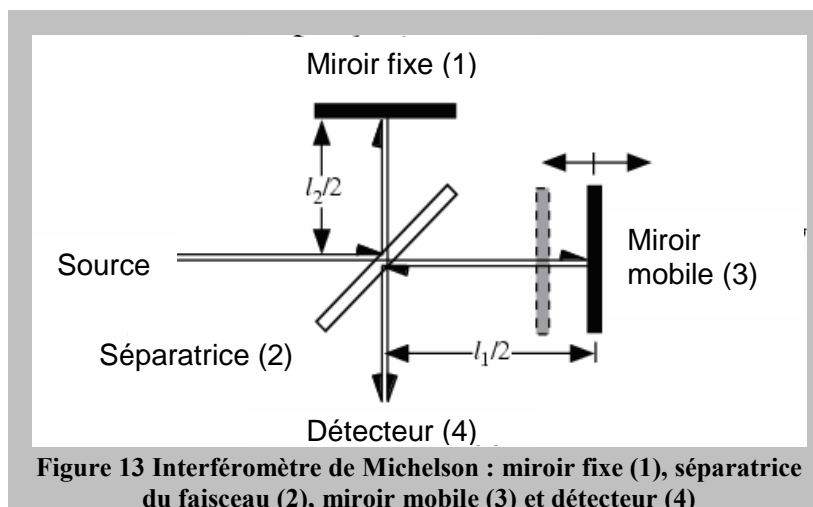
## 5. Caractérisation physicochimique des substrats cellulosiques

### 5.1 Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque l'énergie du faisceau infrarouge est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise sera enregistrée. Le domaine infrarouge entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $400\text{ cm}^{-1}$  correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson (Figure 13) qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinaient, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon (non représenté), où des absorptions interviennent. Le faisceau

arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique reconnu par un système de traitement ou d'affichage du signal approprié.



Les spectres infrarouges fournissent deux types d'informations : des *informations qualitatives* (les longueurs d'onde d'absorption de l'échantillon sont caractéristiques des différents groupes chimiques présents dans le matériau analysé) et des *informations quantitatives* (l'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption).

Pratiquement, 1.5 mg de poudre de bois sont broyés finement en présence de 250 mg de KBr. Afin de travailler dans des conditions opératoires qualitatives, la poudre de KBr doit toujours être conservée dans une étuve à 105°C et les échantillons de poudre de bois dans un dessiccateur. Le mélange finement broyé est alors placé dans la pastilleuse et soumis pendant 5 minutes à une pression de 10 tonnes. La pastille est alors démoulée et placée dans le dessiccateur. Un témoin contenant uniquement du KBr est également réalisé, celui-ci sert à éliminer le signal émis par les différents échantillons et lié à la présence du KBr dans les pastilles. Celles-ci sont ensuite analysées à l'aide d'un spectromètre Thermo-Nicolet Nexus 670 FTIR (Thermofischer scientific, Waltham, MA, USA).

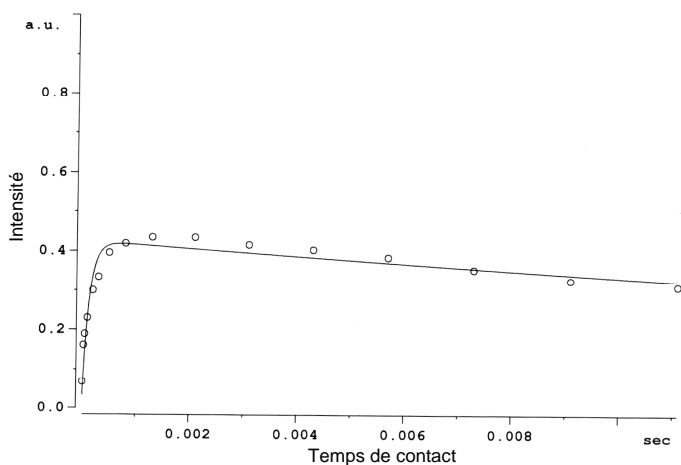
## 5.2 Résonance Magnétique Nucléaire $^{13}\text{C}$ de l'état solide (RMN)

La résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide consiste à faire basculer l'aimantation nucléaire créée par le champ magnétique dans le milieu étudié, au moyen d'une onde électromagnétique. Après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané : cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définissant comme la résultante des moments cinétiques (rotation sur eux-mêmes) des protons et des neutrons d'un atome. L'appareil fonctionne par accumulation successive de spectres individuels qui sont ensuite moyennés afin d'améliorer le rapport signal/bruit.

Les expériences de CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance DSX400 (Karlsruhe, Allemagne) opérant à 100.6 MHz sur le  $^{13}\text{C}$ . La vitesse du rotor a été fixée à 7000 Hz. Un temps de recyclage de 5 s et un temps d'acquisition de 34.9 ms ont été utilisés. Le principal avantage de la résonance magnétique nucléaire de l'état solide est qu'elle permet la détermination quantitative des groupes fonctionnels dans un matériel complexe parce que tous les noyaux équivalents donnent naissance à des signaux de même intensité quelque soit leur environnement chimique. Toutefois, les signaux de certains noyaux  $^{13}\text{C}$  peuvent être atténués ou rendus complètement inobservables par un certain nombre de facteurs qui interfèrent avec l'expérience RMN, spécialement lorsque la technique de polarisation croisée est employée.

Afin de vérifier si les spectres expérimentaux ont été réalisés dans des conditions quantitatives, une série d'expériences à temps de contact variable (VCT) a été réalisée sur une poudre de cellulose de référence, la cellulose médium (Tableau 3). L'objectif de cette expérience est de trouver un temps de contact optimal (OCT) pour lequel les pertes d'intensité des signaux sont minimisées. Les pics choisis pour évaluer la variabilité des temps de contact se situent à 107.7, 106.9, 106, 90.7, 90, 76.9, 76.2, 74.4, 73.3, 67.7 et 66.7 ppm dans le spectre RMN. Pour chacun des pics, une courbe expérimentale reprenant l'évolution de l'intensité du signal en fonction du temps de relaxation a été tracée (Figure 14) et adaptée à l'équation théorique  $I = I_0 (1 - \exp(-t_{\text{CP}}/T_{\text{CH}}))\exp(-t_{\text{CP}}/T_{1\rho\text{H}})$  où  $I$  est l'intensité mesurée,  $I_0$  est l'intensité du signal en l'absence de relaxation des noyaux C,  $T_{\text{CH}}$  et  $T_{1\rho\text{H}}$

sont deux temps de relaxation caractéristiques du système. Dans notre cas, il apparaît qu'un temps de contact de 2 ms est optimal pour atteindre une polarisation maximale de tous les carbones des échantillons de cellulose et de bois.



**Figure 14** Courbe de l'intensité du pic C4 (90.729 ppm) de la cellulose médium en fonction des temps de contact (ms)

### 5.3 Diffractométrie à rayons X

La technique d'analyse par diffraction des rayons X est une méthode semi quantitative qui permet de déterminer rapidement dans les cas qui nous concernent l'indice relatif de cristallinité, la taille des cristallites (micelles) ainsi que le type de réseau cristallin de substrats cellulosiques. Le faisceau de rayons X émis par le tube à rayons X (Figure 15) est limité par une fente de divergence afin de contrôler la surface irradiée de l'échantillon situé au centre du goniomètre. Le faisceau réfléchi est focalisé par une fente réceptrice placée devant le détecteur qui enregistre l'intensité. L'anode du tube à rayons X, les cristallites de l'échantillon participant à la diffraction et la fente du détecteur se trouvent sur le cercle de focalisation. Les rayons X collectés par le détecteur sont convertis en impulsions électriques qui permettent de tracer les diagrammes de l'intensité du rayonnement diffracté en fonction de l'angle de diffraction:  $I=f(2\theta)$  qui sont la base de l'analyse.

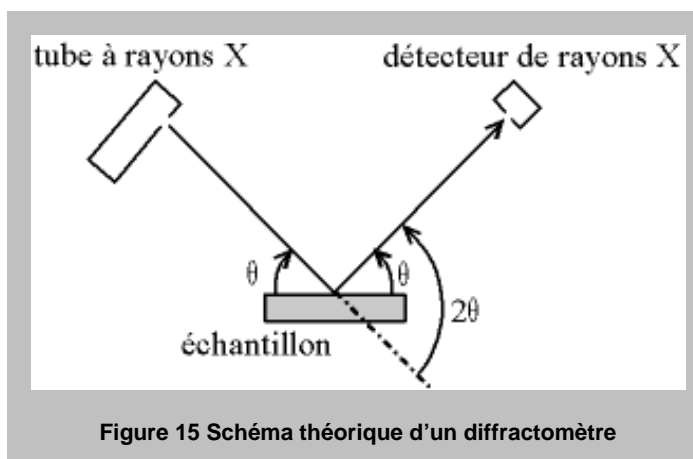


Figure 15 Schéma théorique d'un diffractomètre

Les diffractogrammes des différents substrats cellulosiques étudiés, préalablement comprimés (granulométrie inférieure à 425  $\mu\text{m}$ ), ont été obtenus en utilisant un diffractomètre à poudre D5000 SIEMENS (Karlsruhe, Allemagne) équipé d'un goniomètre. La largeur des fentes du détecteur sont, respectivement, 6 et 0.2 mm. Un filtre de nickel a été inséré entre le détecteur et la fente du détecteur. Lorsque l'échantillon tourne d'un angle  $\theta^\circ$ , le détecteur tourne d'un angle  $2\theta^\circ$  dans la même direction. L'échantillon a été scanné à la vitesse de 0.02°/min sur une gamme  $2\theta$  allant de 8 à 40°. Le générateur (SIEMENS) opère à 40 kV, 50 mA et produit une radiation  $\text{Cu K}_\alpha$  ( $\lambda = 0.154 \text{ nm}$ ).

#### 5.4 Caractérisation des produits d'oxydation de la lignine

Cette méthode est basée sur une dégradation d'une faible quantité de lignine en présence d'hydroxyde de sodium et d'oxyde de cuivre comme agent d'oxydation. Elle permet de caractériser la lignine des bois de même que le degré d'altération de la lignine au cours de la biodégradation. En fonction de l'origine du matériel (angiospermes, gymnospermes,...), une série de produits phénoliques d'oxydation est libérée à partir des structures non condensées de la lignine suite à l'oxydation alcaline relativement douce au  $\text{CuO}$ . Seules les unités guaiacyles, syringyles et cinnamyles sont comprises dans la somme des phénols dérivés de la lignine. Les p-hydroxyphénols sont également obtenus à partir de l'oxydation de structures non-ligneuses, par exemple des acides aminés aromatiques, et ne sont donc pas intégrés dans la somme. Etant donné que les structures condensées ne sont pas attaquées au cours du traitement, cette méthode ne donne par conséquent aucune

indication sur la décomposition des parties condensées de la lignine (Johansson et al., 1986 ; Kögel, 1986).

Les échantillons de bois sont séchés et broyés. Chaque récipient de la bombe pressurisée (Hedges and Ertel, 1982) est rempli avec 50 mg de substrat, 50 mg de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 250 mg de  $\text{CuO}$  et 15 ml de  $\text{NaOH}$ . Les traces d' $\text{O}_2$  sont éliminées par barbotage de la solution sous un flux d'azote pendant 5 minutes. Le récipient est ensuite scellé et chauffé sous pression à  $170^\circ\text{C}$  pendant 2h. Il est refroidi et son contenu est centrifugé (centrifugeuse Sorvall RC5C+, Asheville NC, USA) pendant 25 min à 1400 g dans des tubes à fond conique protégés de la lumière par un film d'aluminium. Le surnageant est conservé. Le sédiment est lavé avec de l'eau désionisée et centrifugé comme précédemment. Les surnageants combinés et acidifiés à pH 2 avec de l' $\text{HCl}$  6N sont conservés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 1h. Les surnageants, préalablement centrifugés pour en éliminer tout dépôt, sont récupérés dans un tube à fond conique et 2 mg d'éthylvanilline (étalon interne) y sont ajoutés.

Avant d'injecter les surnageants dans les colonnes d'extraction (RP C18, Alltech, Deinze, Belgique), celles-ci sont conditionnées avec 5 ml de méthanol et 10 ml d'eau distillée. 1 ml de supernageant est injecté sur la colonne C18 et celle-ci est séchée sous un flux de  $\text{N}_2$ . Les produits d'oxydation de la lignine sont élués sélectivement dans 2 volumes de 1 ml d'acétate d'éthyle. Le solvant est ensuite éliminé au SpeedVac SC100 (Savant, NY, USA) et le résidu est dissout dans 1 ml de méthanol. La solution est centrifugée dans un microtube à fond conique et mise en vial. Elle est conservée à l'abri de la lumière avant injection dans l'HPLC.

Les différents produits d'oxydation de la lignine sont analysés par HPLC (Agilent HP 1100 series, Agilent Technologies, Massy, France) équipé d'un détecteur UV (280 nm). Les différentes molécules sont séparées par une colonne Lichrospher  $5\ \mu\text{m}$  C18 (250 mm x 4 mm, Agilent Technologies, Massy, France) précédée d'une précolonne (4 mm x 4 mm) de phase identique. Pour effectuer les analyses, le volume d'injection et le débit d'élution sont ajustés respectivement à 10  $\mu\text{l}$  et 1 ml/min. L'élution a été réalisée avec un gradient d'acétonitrile pure (solvant A) et d'une solution d'acide phosphorique 0.1 % (solvant B) comme suit : (temps en min/ % de solvant A) 0/0, 40/40, 45/70, 55/70, 60/0 et 70/0. La structure des produits d'oxydation détectés au cours du test est décrite dans l'Annexe 1.



## **5.5 Techniques chromatographiques**

### **5.5.1 Analyse des sucres par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

Les monosaccharides libérés par l'hydrolyse chimique ou enzymatique des composés cellulosiques et les acides gras volatils produits lors des tests BMP sont analysés par HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Massy, France) équipé d'un détecteur réfractométrique (RID). Les différentes molécules sont séparées par une colonne échangeuse d'ion Supelcogel C-610-H (300 mm x 7,8 mm, Supelco, Bellefonte, PA) précédée par une pré-colonne Supelguard (50 mm x 4,6 mm, Supelco, Bellefonte, PA). Pour effectuer les analyses, le débit d'élution est ajusté à 0,5 ml/min d'une solution d'acide phosphorique 0,1 % (Acros Organics, Geel, Belgique), la colonne et le détecteur RID sont thermostatés à respectivement 30 °C et 35 °C. Le volume d'injection des échantillons est de 20 µl et les concentrations sont déterminées par rapport à des étalons de sucres simples dont les concentrations vont de 0,125 à 4 g/l.

Ces conditions d'analyse permettent la séparation de monosaccharides comme le glucose et le xylose. Cependant, certains monosaccharides qui composent les hémicelluloses, comme le mannose et l'arabinose, ont un temps de rétention équivalent au xylose et ne peuvent pas être séparés. Sur les chromatogrammes, les pics représentant ces sucres ont des aires comparables à celui du xylose à concentrations égales. Ces sucres ont donc été considérés comme des équivalents xylose lors des calculs (Rodriguez, 2005).

### **5.5.2 Analyse du biogaz par chromatographie gazeuse (CPG)**

Les concentrations en méthane et en dioxyde de carbone présents dans le biogaz produit sont mesurées par CPG (Hewlett Packard 5890 series II) équipé d'un détecteur à conductibilité thermique (TCD). La séparation des gaz s'effectue en utilisant en série deux colonnes de type PLOT (Porous Layer Open Tubular) : une colonne GasPro GSC (30 m x 0,32 mm, Alltech, Deerfield, USA) et une colonne CP-Carboplot P7 (27,5 m x 0,53 mm, Varian, Middelburg, Pays-Bas). L'hélium N45 (Air liquide, Liège, Belgique) est utilisé comme gaz vecteur et gaz de référence. L'étalonnage est effectué avec des mélanges de gaz standards dont la composition est donnée dans le [tableau 9](#). Pour effectuer l'analyse du

biogaz, 500 µl d'échantillons prélevés avec une seringue à valve (SGE, Australie) dans l'espace gazeux des bouteilles de méthanisation sont injectés manuellement dans la chambre d'injection. La pression en tête de colonne est fixée à 60 kPa et le débit du gaz vecteur est ajusté à 1,2 ml/min. La température de la colonne est tout d'abord maintenue à 34°C pendant 13 min, puis monte graduellement à 25 °C/min pour atteindre une température de 105°C qui sera maintenue pendant 16 minutes. La température du détecteur TCD est fixée à 110 °C. Le débit du gaz "making up" (apport auxiliaire de gaz vecteur en sortie de colonne) est ajusté à 4 ml/min tandis que celui du gaz de référence est ajusté à 20 ml/min.

**Tableau 9 Composition des étalons pour calibrer le chromatographe en phase gazeuse. Les mélanges I, II et IV sont fournis par Air liquide (Liège, Belgique), le mélange V est fourni par Scantec (Anvers, Belgique) et le mélange III est du gaz de ville.**

	% CH <sub>4</sub>	% CO <sub>2</sub>	% N <sub>2</sub>	Autres gaz
Etalon I	50	35	15	-
Etalon II	-	20	-	80 % H <sub>2</sub>
Etalon III	87,6	1,7	3,3	5,3 % éthane & 1,47 % propane
Etalon IV	2,5	-	97,5	-
Etalon V	-	8	74,5	17,6 % O <sub>2</sub>

## 6. Traitements appliqués aux substrats cellulosesiques

### 6.1 Traitements de régénération et mercerisation de la cellulose

Le traitement de mercerisation consiste à traiter les échantillons de cellulose (*cf.* Section 2) avec une solution concentrée en NaOH (Weimer et al., 1990). Pratiquement, 5 g de cellulose sont suspendus dans 200 ml d'une solution de NaOH 20 % préalablement refroidi et agités dans un bain de glace à 4°C pendant une heure. Les pâtes sont ensuite filtrées sous vide et transférées dans un bécher d'un litre rempli d'eau désionisée. Les échantillons de cellulose sont ensuite centrifugés, le surnageant est éliminé et environ 900 ml d'eau désionisée est rajoutée ; ce processus est répété 10 fois. Les échantillons sont ensuite suspendus dans 200 ml d'acide acétique glacial 30 %, mélangés pendant 30 minutes à température ambiante et filtrés sous vide. Les résidus subissent ensuite plusieurs cycles de rinçage/centrifugation jusqu'à ce que le pH de l'eau de rinçage soit compris entre 6.5 et 6.8. Les échantillons sont finalement séchés au Speed Vac SC100 (Savant, NY, USA).

La cellulose régénérée est obtenue par dissolution des celluloses de type I (**Tableau 3**) dans la solution d'un complexe Cu(II)éthylènediamine 1 M et reprécipitation à l'acide chlorhydrique (Paquot and Thonart, 1982). Pratiquement, 1 g de substrat est mis en solution par agitation dans 100 ml d'un solution du complexe Cu (II)éthylènediamine 1M pendant 40 minutes. La cellulose est régénérée par un ajout de 20 ml d'HCl 5N, puis filtrée sur Buchner. La coloration vert bleu résiduelle est éliminée par lavage à l'eau désionisée jusqu'à obtention d'un pH neutre ou légèrement acide du filtrat.

## **6.2 Traitements de délignification**

Le peroxyde d'hydrogène, le sulfite neutre et le chlorite de sodium sont des réactifs qui permettent d'éliminer ou modifier la lignine et les hémicelluloses sans affecter significativement la matière cellulosique. L'application de ces traitements de délignification permet d'obtenir des composés cellulosiques plus accessibles aux enzymes.

**Traitement au peroxyde d'hydrogène (Gould, 1984).** Cinq grammes de poudre de bois sont suspendus dans 250 ml d'eau désionisée contenant 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et amenée à pH 11,5 avec du NaOH 0,1M. La solution est agitée légèrement à 25°C pendant 24 heures. Le résidu insoluble est filtré et ensuite lavé avec de l'eau désionisée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Enfin, il est séché 105°C pendant 24 heures .

**Traitement au sulfite neutre (Desmons, 1987).** Une liqueur contenant 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 4% NaHCO<sub>3</sub> et 4% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dilués dans de l'eau désionisée est préparée. Cinq grammes de poudre sont suspendus dans 50 ml de liqueur et ensuite incubés pendant 2 heures à 121°C. Le résidu insoluble est filtré et lavé avec de l'eau désionisée jusqu'à pH neutre. Enfin, il est séché à 105°C pendant 24 heures.

**Traitement au chlorite de sodium (Mooney et al., 1998).** Une liqueur obtenue en diluant 11.25g de NaClO<sub>2</sub> dans 250 ml d'eau désionisée est préparée et amenée à pH 4 avec de l'acide acétique 96 %. Quatre grammes de poudre sont suspendus dans 80 ml de liqueur et 20 µl d'acide formique sont ajoutés. La suspension est gardée durant 10 jours à l'abri de la lumière. Tous les jours 20 µl d'acide formique sont ajoutés. Le résidu insoluble est filtré et lavé avec de l'eau désionisée jusqu'à pH neutre. Finalement il est séché à 105°C pendant 24 heures.

## **7. Caractérisation des matrices d'enfouissement**

### **7.1 Perméabilité des matrices d'enfouissement**

Le test de perméabilité est utilisé afin de fournir des indications sur la facilité de l'eau à traverser un type de sol particulier. Lorsqu'un haut taux de perméabilité est atteint, le mouvement de l'eau à travers le sol est rapide et facile. Un bas coefficient de perméabilité indique un faible taux de déplacement de l'eau à travers le sol (Roberts, 1996).

La mesure de perméabilité a été réalisée en cellule triaxiale. Les échantillons extraits du carottier de 100 mm de diamètre ont été arasés à environ 100 mm, puis placés dans la cellule entre deux pierres poreuses saturées. Ils ont ensuite été entourés d'une membrane de caoutchouc souple pour assurer l'étanchéité. L'échantillon provenant de Onhaye a été obtenue par un léger compactage modéré en moule Proctor. Après saturation en eau des circuits, une contrainte de confinement de 50 kPa est appliquée progressivement, de manière à assurer l'étanchéité. De l'eau est ensuite introduite par la base, avec une pression d'injection de 25 kPa, ce qui correspond à un gradient hydraulique d'environ 25. Le débit de sortie est mesuré par empotement et pesée. La valeur du coefficient de perméabilité est obtenue par la formule de Darcy (essai à charge constante). Cette valeur est ensuite ramenée à la température de référence conventionnelle de 10°C. Plusieurs mesures successives permettent de vérifier la stabilisation de l'écoulement à travers l'éprouvette.

### **7.2 pH et $pH_{KCl}$ des matrices d'enfouissement**

Le pH d'un sol n'est autre que la mesure du pH d'une solution à l'équilibre avec un échantillon de sol mis en suspension dans l'eau (ou une solution de KCl), dans un rapport défini sol/solution. La mesure du pH d'une suspension de sol dans l'eau rend compte de la concentration en ions  $H_3O^+$  à l'état dissocié dans le liquide surnageant. Ces ions sont en équilibre avec ceux présents à l'état non dissocié, fixés sur certaines composantes solides du sol tels que les minéraux argileux\* et la matière organique. Ces composés solides, par leur aptitude à capter les ions  $H^+$  ou  $OH^-$  tempèrent les variations du pH du sol.

L'équilibre dans l'eau ne tient pas compte de la totalité des ions acides fixés sur la capacité d'échange du complexe argilo-humique. Par contre, ces ions acides fixés peuvent être déplacés par échange avec un ion tel que  $K^+$  d'une solution de KCl normale. (Braize, 1988).

Pratiquement, 3 g de sol séché à l'air ambiant et tamisé (fraction inférieure à 325  $\mu\text{m}$ ) sont placés dans un bécher. Après addition de 7.5 ml d'eau désionisée (ou de la solution de KCl) et agitation pendant environ 1 minute, le pH (ou le  $\text{pH}_{\text{KCl}}$ ) est mesuré dans le surnageant après une heure de repos et une seconde brève agitation.

### **7.3 Autres paramètres**

Le *pourcentage d' $O_2$*  a été mesuré à l'aide d'un analyseur de gaz portable Geotechnical GA 2000 plus en enfonçant la sonde à une profondeur d'environ 10 à 20 cm.

Le *potentiel d'oxydo-réduction* a été mesuré avec une sonde d'oxydo-réduction au platine dans un puits d'environ 10 à 20 cm de profondeur collectant les écoulements de liquide du sol environnant. En raison des conditions climatiques, il a été impossible de prélever du liquide dans les sédiments hôtes d'Onhaye, Maasmechelen BERG et Maasmechelen OPL.

## **Chapitre III : Résultats & Discussions**

## 1. Caractérisation paléobotanique, chimique, biochimique et structurale des bois fossiles

### 1.1 Caractérisation paléobotanique

Les bois fossiles collectés dans les karsts\* de l'Entre-Sambre-et-Meuse constituent la base de notre étude. Afin de disposer de points de comparaison, une xylothèque de bois fossiles a été constituée. Ces bois de différents environnements et d'âges différents, des gymnospermes en général, proviennent de la forêt fossile de Dunarobba (Italie), des îles de Kerguelen (océan indien austral), des lignites\* du Rhin (Allemagne), des tourbes\* de l'Entre-Sambre-et-Meuse (Belgique) ainsi que divers échantillons fournis par le Musée des Sciences Naturelles de Bruxelles (sites d'Andenne et de Lampernisse), l'Université de Lyon (site de Longemaison) et l'Université d'Utrecht (site de Roermond) (cf. Section 2 du chapitre *Matériels & Méthodes*).

Dans un premier temps, une détermination taxonomique des bois fossiles a été réalisée afin de retracer l'appartenance botanique de ceux-ci. Cette approche nous a permis de retrouver les espèces actuelles les plus proches, espèces qui serviront de points de comparaison pour les analyses chimiques, biochimiques et structurales. Dans un second temps, le stade de fossilisation des bois fossiles et plus particulièrement ceux de Florennes et d'Onhaye, a été déterminé. La détermination du stade de fossilisation va nous permettre de comparer l'évolution des structures des bois fossiles par rapport à celle constatée dans la littérature (cf. Section 3 du chapitre *Introduction*).

#### 1.1.1. Détermination taxonomique des bois fossiles de la xylothèque

**Andenne.** D'après l'examen des trois plans de coupe du bois fossile d'Andenne, celui-ci appartient aux Cupressaceae et plus précisément au genre *Juniperoxylon* si on se réfère à la clef classique de détermination taxonomique de Kräusel & Weyland (1949). Les différents caractères relevés sur ce bois et caractéristiques de la famille des Cupressaceae sont :

---

\* Les mots surmontés d'un astérisque sont définis dans le lexique situé dans l'Annexe 1.

- Cernes de croissance nets
- Trachéides avec grandes ponctuations aréolées unisériées et bisériées opposées sur les parois radiales; présence commune de barres de Sanio; ponctuations également mais de plus petite taille sur les parois tangentielles (Annexe 3, Pl.1.1)
- Parenchyme vertical assez abondant avec cellules à parois fines typiquement en forme de tonneau avec contenu brunâtre; parois transversales ponctuées et irrégulièrement épaissies; épaississements peu importants
- Rayons unisériés d'une vingtaine de cellules de hauteurs, homogènes. Cellules parenchymateuses à parois fines, les horizontales sont lisses, les verticales sont ponctuées et paraissent légèrement noduleux (épaississements junipéroïdes)
- Présence d'indentures (Annexe 3, Pl.1.2)
- Ponctuations de champs de croisement cupressoïdes, au nombre de 3 à 5 par champ

En raison du peu d'importance des épaississements junipéroïdes, ce bois peut être rattaché au *Juniperoxylon pachyderma* (Göppert) Kräusel et Weyland.

**Florennes.** Tous les bois fossiles étudiés appartiennent aux Taxodiaceae\*, c'est-à-dire la famille des Cupressaceae dans la nomenclature moderne. En effet, les caractéristiques de cette famille relevées dans les travaux de Greguss (1955) sont la présence de :

- Cernes de croissance distincts
- Trachéides du bois de printemps anguleuses, d'hexagonales à quadrangulaires en section transversale; les paires de ponctuations aréolées ne sont pas rares sur leurs parois radiales (Annexe 3, Pl.1.3); elles sont même parfois trisériées
- Parenchyme vertical diffus, contenant des restes (résines, tannins) colorés, et possédant des parois horizontales lisses à ponctuées (Annexe 3, Pl.1.5)
- Rayons vasculaires monosériés, rarement bisériés, entre 1 et 28 cellules de haut
- Ponctuations de champs de croisement majoritairement taxodioides dans le bois de printemps



A la suite de cet examen au microscope optique, deux types morphologiques peuvent apparemment être distingués parmi les bois de Florennes : ***Taxodioxylon gypsaceum*** Krausel (ponctuations de champs taxodioides dans le bois de printemps et parois horizontales du parenchyme vertical lisses à peu ponctuées) et ***Juniperoxylon pachyderma*** Krausel (rares ponctuations de champs cupressoïdes et parois verticales du parenchyme de rayon avec localement des épaissements dits junipéroïdes (Annexe 3, Pl.1.4.). On se retrouve néanmoins face à un problème de détermination : certaines 'espèces' de bois fossiles sont définies d'une manière si étroite et rigide qu'elles ne peuvent tenir compte de la variabilité normalement observée chez une 'vraie' espèce biologique (vivante). Ce problème se marque particulièrement dans les dépôts du Miocène où les bois déterminés soit *Taxodioxylon gypsaceum* soit *Juniperoxylon pachyderma* sont en réalité très proches morphologiquement, ne différant dans la seconde espèce que par la présence des épaissements junipéroïdes sur les parois tangentielles des cellules de rayons. De plus, des formes intermédiaires existent. Certains auteurs (dont van der Burgh et Meijer, 1996) considèrent donc que les deux 'espèces' fossiles font en réalité partie d'un même plexus de Taxodiaceae apparentés aux *Sequoia* et *Metasequoia*.

Les arbres qui vivaient à Florennes ont accumulé de la tourbe\* or les *Sequoia* actuels ne sont pas formateurs de tourbe. Le *Metasequoia*, turfigène, a donc été choisi comme genre actuel le plus proche, tant au point de vue morphologique que biologique, des fossiles de Florennes et par conséquent servira de point de comparaison pour les tests biochimiques.

**Hambach.** Ce bois localement dégradé appartient également aux Cupressaceae. Il peut être rattaché à ***Juniperoxylon sp.*** sans plus de précision :

- Cernes de croissances nets
- Ponctuations aréolées unisériées sur les parois radiales des trachéïdes
- Nombreuses ponctuations aréolées, petites sur les parois tangentielles des trachéïdes
- Présence de parenchyme axial assez abondant avec dépôts bruns; parois transverses nettement noduleuses
- Rayons monosériés, localement bisériés, bas (de 2 à 5 cellules de haut; ceux de 6-10 cellules de haut sont très rares), homogènes

- Parois horizontales du parenchyme de rayon ponctuées et parois verticales avec nodosités en chapelet (épaississements junipéroïdes)
- Ponctuations de champs en majorité cupressoïdes (piceoïdes dans le bois final), de 2 à 4 par champs, à disposition oblique

**Kerguelen.** Ces caractères orientent les affinités de ce bois (par ailleurs assez mal conservé) vers les Cupressaceae et plus particulièrement vers le genre ***Cupressinoxylon*** Göppert :

- Cernes de croissance nets
- Parenchyme axial abondant avec remplissage brunâtre (Annexe 3, Pl.1.6); cellules rectangulaires à parois horizontales fines, lisses ou faiblement noduleuses
- Rayons unisériés, de 2 à 15 cellules de haut, nombreux et homogènes avec souvent le même remplissage brunâtre que le parenchyme vertical
- Cellules parenchymateuses à parois horizontales et verticales, fines ne semblant pas ponctuées; pas d'indentures
- Ponctuations de champs de croisement cupressoïdes, devenant piceoïdes dans le bois final, au nombre de 2 ou 4 par champs, disposées obliquement, suivant diagonale du champ (Annexe 3, Pl.1.7)
- Dépôts minéraux

**Lampernisse.** Ce bois appartenant aux Pinaceae et plus particulièrement au genre ***Pinus*** peut être rattaché au genre ***Pinuxylon*** (Gothan, 1905).

- Cernes de croissance nets
- Présence de canaux résinifères dans les rayons uniquement avec cellules épithéliales à parois fines (Annexe 3, Pl.2.1)
- Les rayons vasculaires ont jusque 12 cellules de hauteur; ils sont hétérogènes et unisériés sauf lorsqu'il y a un canal résinifère. Les trachéides de rayon sont situées aux extrémités des rayons sur un ou deux, rarement trois rangs d'épaisseur; elles sont courtes et ponctuées; leurs parois portent des dentelures très marquées se projetant vers la lumière des cellules

- Les cellules de parenchyme de rayon ont des parois fines et ponctuées. Les ponctuations de champs de croisement sont fenêtrées (pinoïdes) avec une seule grande ponctuation occupant tout le champ (Annexe 3, Pl.2.2)

**Maasmechelen.** Ce bois appartient aux Pinaceae. Ses caractères le rattachent au genre fossile *Piceoxylon* Gothan. Il est particulièrement proche du *Piceoxylon pseudotsugae* Gothan emend Van der Burgh, lui-même rapproché du *Pseudotsuga menziesii* actuel (syn. *Pseudotsuga taxifolia*). *Pseudotsuga* n'est pas considéré comme 'indigène' en Europe; il a été ré-introduit au dix-neuvième siècle. Il reste néanmoins que le bois *Piceoxylon pseudotsugae*, très proche morphologiquement de celui du *Pseudotsuga menziesii*, est commun dans les gisements du Miocène d'Allemagne (lignites du Rhin), de Hollande, Silésie, Pologne, Autriche et France (Van der Burgh, 1973).

- Pas de sections transversales mais cernes de croissance nets repérés sur les coupes tangentielles et radiales
- Ponctuations aréolées serrées souvent écrasées l'une contre l'autre dans une série verticale et prenant une forme ovale
- Présence de canaux résinifères verticaux rares
- Parenchyme vertical occasionnel, rare
- Rayons hétérogènes, unisériés (jusque 13-15 cellules de haut)
- Trachéides transversales présentes
- Ponctuations de champs (2 à 3) taxodioides devenant piceoides dans le bois final
- Parois horizontales du parenchyme de rayon épaisses et non ponctuées; parois tangentielles avec nodules en chapelet
- Présence d'épaississements spiralés fins, inclinés de 10° à 25° par rapport à la verticale. Ces épaississements peuvent être superposés aux ponctuations aréolées (Annexe 3, Pl.2.3)

**Onhaye.** Malgré l'état très mal conservé de ces fragments de bois, ce bois a été associé au genre *Taxodioxylon* d'après la clef de Krausel & Weyland et appartient donc lui aussi aux Cupressaceae - Taxodiaceae. Les quelques lambeaux de préparation obtenus pour la microscopie optique permettent en effet d'observer :

- Trachéides plus larges que sur les spécimens précédents

- Présence de parenchyme vertical à parois transversales épaisses et garnies de nodules en chapelet; remplissage brunâtre
- Ponctuations aréolées mono et bisériées sur les parois radiales des trachéides
- Champs de croisement avec ponctuations taxodioïdes (3 - 4) disposées sur une rangée horizontale

Les bois de Dunarobba, Longemaison et Sint Odiliënberg n'ont pas fait l'objet d'une étude taxonomique de notre part. En effet, les genres auxquels ces bois sont rattachés, sont déjà décrits dans la littérature (cf. Tableau 4 du chapitre *Matériels & Méthodes*).

### **1.1.2. Détermination du stade de fossilisation**

Les diverses analyses réalisées au microscope optique et au microscope électronique à balayage sur les fragments de bois fossiles de Florennes et d'Onhaye suggèrent, compte tenu de l'environnement géologique, que le stade de fossilisation des fragments de ces bois du Miocène serait celui de la turbification\* (*peatification*). En effet, les bois fossiles de Florennes n'ont ni été compressés, ni minéralisés, ni transformés en charbon.

L'état de détérioration des bois d'Onhaye n'a permis aucune étude au microscope optique. Toutefois les clichés obtenus grâce au microscope électronique à balayage ont montré des bois dans un état de dégradation et de compression plus avancé que ceux de Florennes. Malgré le fait que la détermination de l'espèce fossile n'a pas été faite vu l'impossibilité de relever les différentes caractéristiques nécessaires à l'identification, les échantillons de bois fossiles d'Onhaye, dont l'âge et le type d'environnement sont assez proches de ceux de Florennes, ont été conservés afin de disposer de points de comparaison supplémentaires pour réaliser les différentes analyses.

Il n'a pas semblé nécessaire d'établir le stade de fossilisation des autres bois fossiles de la xylothèque. En effet, étant donné que le stade de fossilisation peut nous fournir une idée de l'évolution des structures au sein des bois fossiles, il a été uniquement déterminé dans le cas des bois de l'ESEM puisque seuls ceux-ci se verront l'objet d'une étude structurale approfondie dans les chapitres suivants.

## 1.2. Caractérisation chimique et biochimique

### 1.2.1. Composition chimique

Afin de caractériser les échantillons de bois fossiles et actuels, les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignine ainsi que la biodisponibilité de la cellulose ont été déterminés par des analyses chimiques et biochimiques. Le dosage des polysaccharides repose sur la digestion chimique des polymères cellulosiques et sur l'analyse HPLC des monosaccharides libérés (cf. Sections 3.5 et 5.5 du chapitre *Matériels & Méthodes*). Le dosage de la lignine et de la pseudo-lignine est basé, quant à lui, sur une méthode gravimétrique décrite dans la section 3.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*. Enfin, la biodisponibilité des substrats cellulosiques est déterminée par un test enzymatique de dégradation de la cellulose (cf. Section 4.1 du chapitre *Matériels & Méthodes*), ce qui permet d'évaluer le potentiel d'évolution des bois.

**Tableau 10 Synthèse des principaux résultats obtenus sur les bois fossiles étudiés : Détermination des bois actuels les plus proches. Dosage de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine, de la pseudo-lignine et taux de dégradation de la cellulose après 48 heures d'hydrolyse (pourcentage pondéral moyen  $\pm$  écart type)**

Echantillons <sup>a</sup>	Bois actuel le plus proche <sup>b</sup>	Cellulose (%)	Hémicelluloses (%)	Lignine (%) <sup>c</sup>	Pseudo-Lignine (%) <sup>d</sup>	Taux de dégradation de la cellulose (%)
AN		35 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	9 $\pm$ 0	38 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
DU		4 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	24 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0
Flo3		21 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	3	nd	1 $\pm$ 1
Flo5		26 $\pm$ 10	0 $\pm$ 0	0	nd	1 $\pm$ 0
Flo6	Mt	13 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0	15 $\pm$ 7	24 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4
Flo7		21 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0
HA		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	85 $\pm$ 3	0 $\pm$ 0
HB		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	3 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0
HC		20 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	8 $\pm$ 5	58 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0
KE		27 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	42 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0
LA	PS	18 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	42 $\pm$ 2	23 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0
LO	nd	7 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	67 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3
MABERG	Do	16 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0	68 $\pm$ 2	7 $\pm$ 0
MAOPL		2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	77 $\pm$ 1	38 $\pm$ 5
Onh4	Mt	5 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	56 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0

SOA		16 ± 1	4 ± 2	42 ± 4	3 ± 0	8 ± 2
SOB	Ch	29 ± 2	7 ± 2	39 ± 1	3 ± 1	70 ± 7
SOC		17 ± 3	7 ± 1	41 ± 1	2 ± 0	nd

<sup>a</sup> AN (Andenne), DU (Dunarobba), Flo (Florennes), HA-B-C (Hambach A-B-C), KE (Kerguelen), LA (Lampernisse), LO (Longemaison), MABERG-OPL (Maasmechelen BERG-OPL), Onh4 (Onhaye 4) et SOA-B-C (Sint Odilienberg A-B-C)

<sup>b</sup> Ch (chêne), Do (Douglas), Mt (Metasequoia), PS (Pin sylvestre)

<sup>c</sup> déterminé par extraction au triéthylèneglycol (Edwards, 1973)

<sup>d</sup> déterminé par extraction au triéthylèneglycol (Edwards, 1973) suivie d'une hydrolyse acide (Rodriguez et al., 2005)

nd : non déterminé

**Tableau 11 Synthèse des principaux résultats obtenus sur les bois actuels étudiés : Dosage de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine, de la pseudo-lignine et taux de dégradation de la cellulose après 48 heures d'hydrolyse (pourcentage pondéral moyen ± écart type)**

Echantillons <sup>a</sup>	Appartenance	Cellulose (%)	Hémicelluloses (%)	Lignine (%) <sup>b</sup>	Pseudo-lignine (%) <sup>c</sup>	Taux de dégradation de la cellulose (%)
Ce B		27 ± 0	nd	38 ± 2	14 ± 3	4 ± 0
Ep		36 ± 0	14 ± 0	42 ± 2	7 ± 3	6 ± 0
Mt	Gymnosperme	29 ± 6	11 ± 2	44 ± 5	7 ± 3	19 ± 1
PS		23 ± 1	nd	31 ± 2	9 ± 2	4 ± 0
Seq B		12 ± 2	8 ± 2	38 ± 1	13 ± 0	19 ± 1
Seq C		16 ± 2	7 ± 1	43	nd	27 ± 1
Ch		27 ± 2	15 ± 1	42 ± 2	4 ± 2	6 ± 1
Cha	Angiosperme	19 ± 5	7 ± 2	42 ± 1	3 ± 2	19 ± 2
He		27 ± 3	10 ± 1	46 ± 2	9 ± 6	5 ± 0

<sup>a</sup> Mt (Metasequoia), Ce B (Cèdre branche), Ch (Chêne), Ep (Epicéa), He (Hêtre), Seq B (Séquoia Branche), Seq C (Séquoia cœur), Cha (Châtaignier) et PS (pin sylvestre)

<sup>b</sup> déterminé par extraction au triéthylèneglycol (Edwards, 1973)

<sup>c</sup> déterminé par extraction au triéthylèneglycol (Edwards, 1973) suivie d'une hydrolyse acide (Rodriguez et al., 2005)

nd : non déterminé

Les analyses effectuées (Tableau 10) montrent que la majorité des bois fossiles ne présentent aucune trace d'hémicelluloses. Goldstein (1991) suggère que ces polysaccharides sont plus facilement hydrolysables à cause de leur structure branchée et de leur faible poids moléculaire. En règle générale, lors de la perte des polysaccharides, les composantes hémicellulosiques sont les premières à être dégradées (Hedges et al., 1985 ; Stout et al., 1988 ; Hatcher and Clifford, 1997). Seuls les bois de Sint Odilienberg

présentent encore un faible pourcentage d'hémicelluloses : ce phénomène pourrait être lié à la taxonomie\* de ces bois qui constituent les seuls angiospermes de notre collection.

La lignine des bois fossiles présente un comportement assez particulier. En effet, la teneur en lignine dans les bois fossiles (Tableau 10), déterminée par une extraction simple au triéthylèneglycol, est significativement réduite par rapport aux bois modernes (Tableau 11). Ceci suggère que la lignine s'est détériorée au cours de la fossilisation ou a été modifiée sous une forme insensible au traitement au triéthylèneglycol. Cependant, étant donné que des quantités importantes de lignine ont été détectées suite à l'hydrolyse acide du résidu récupéré à la fin du test au triéthylèneglycol, il semblerait qu'une fraction des bois fossiles équivalente à la fraction ligneuse soit toujours présente mais soit chimiquement différente de la lignine des bois modernes (Lechien et al., 2006).

L'analyse des bois de **Andenne**, **Florennes**, **Hambach C** et **Maasmechelen BERG** révèle un pourcentage de cellulose proche de leurs homologues actuels en général. Ces pourcentages élevés en cellulose témoignent d'un état de conservation plus important par rapport aux autres bois de la collection et par rapport aux bois analysés dans la littérature. En effet, très peu d'articles mentionnent la présence de cellulose résiduelle dans des bois fossiles (Fengel, 1991) et selon de nombreuses études (Hatcher et al., 1994 ; Orem et al., 1996 ; Staccioli et al., 1997 ; Palanti et al., 2004), l'étape biochimique initiale de la transformation des matières cellulosiques est caractérisée par une réduction significative en cellulose qui, après un très court intervalle de temps géologique, sera à son tour complètement dégradée. Les pourcentages de lignine observés dans ces échantillons restent relativement faibles et confirment les résultats obtenus précédemment, à savoir une modification de la structure ligneuse qui entraînerait une insensibilité au traitement au triéthylèneglycol.

Les échantillons de **Maasmechelen OPL** et **Hambach (A et B)** ne présentent aucune trace de lignine et de cellulose. Au vu des résultats chimiques et biochimiques obtenus, ces bois se situeraient à une étape beaucoup plus avancée de la *coalification*. L'analyse structurale par microscopie électronique à balayage de ces bois le confirme (aspect vitrifié, aucune structure identifiable). Un phénomène particulier se manifeste au sein des échantillons d'Hambach : étant donné l'absence de cellulose dans les échantillons A et B (situés aux

profondeurs les plus faibles), aucune dégradation n'a été observée néanmoins le même type de comportement a été observé pour l'échantillon C (enfoui le plus profondément) qui, lui, possède un pourcentage non négligeable de cellulose.

Les bois d'**Onhaye** manifestent le même type de comportement : ils ne contiennent plus de lignine « chimiquement intacte » mais contiennent encore 5% de cellulose ce qui indique un état de dégradation avancé. Néanmoins les analyses de la structure au MEB ont montré que ces bois seraient restés au stade de la turbification\* accompagné d'un début de compression.

Les bois de **Dunarobba**, **Lampernisse**, et **Sint Odiliënberg** qui constituent les trois espèces les plus « récentes » de la collection, présentent un taux de lignine plus élevé, en accord avec les quantités de lignine des bois actuels. Ce résultat tendrait à montrer que la lignine est chimiquement modifiée avec l'âge et que sa structure diffère de plus en plus de son état d'origine. Il y a néanmoins une exception : Kerguelen (40 000 ans et 5% de lignine). Il faut toutefois tenir compte du contexte géologique assez hostile (sédiments marins) dans lequel ce bois se trouvait.

#### **1.2.2. Détermination de la biodisponibilité de la cellulose**

L'analyse de la composition chimique nous a révélé que les bois fossiles possèdent des caractéristiques particulières par rapport à l'évolution naturelle des composés au cours de la fossilisation. Afin de caractériser la biodisponibilité de la cellulose des bois fossiles, trois tests ont été réalisés : un test enzymatique de dégradation de la cellulose en conditions aérobies, un test de méthanisation BMP en conditions anaérobies et un test de détermination de la durabilité naturelle du bois massif vis-à-vis de *Coniophora puteana*, un champignon lignivore (Norme CEN/TS 15083-1, 2004).

Les tests enzymatiques ont tout d'abord été réalisés sur les bois fossiles de l'ESEM et ensuite sur les autres bois fossiles de la collection. Dans un premier temps, les échantillons ont été maintenus dans leur aspect naturel de départ afin de ne pas modifier leurs caractéristiques physico-chimiques originales (nature de la lignine, densité, porosité, surface spécifique, cristallinité de la cellulose) et de permettre l'analyse de la fraction de



cellulose encore accessible aux cellulases. Par conséquent, les échantillons n'ont pas été broyés mais l'hydrolyse a été réalisée sur environ 2 g de fragments de bois fossiles et de *Metasequoia*. Dans un second temps, les échantillons ont été réduits à une faible granulométrie par broyage (broyage à une fraction inférieure à 3 mm) et 500 mg de substrat ont été incubés en présence du mélange enzymatique. Cette opération vise à augmenter la surface spécifique accessible aux enzymes et donc à améliorer la digestibilité. L'incubation s'est déroulée pendant une période de 20 heures, à une température de 40°C et à un pH de 5,5, en présence de 60 ml de mélange enzymatique. Un échantillon de papier whatman n°1 a été choisi comme témoin positif du test car les fibres cellulosiques y sont complètement accessibles et dépourvues de lignine. Les sucres libérés suite à l'hydrolyse des échantillons de bois par le mélange enzymatique sont dosés par HPLC.

**Tableau 12 Biodégradabilité des bois fossiles de Florennes (Flo) et d'Onhaye (Onh) comparée avec celle de *Metasequoia* (Mt) et du papier whatman n°1 (what). Les différents tests ont été réalisés avec les échantillons dans leur état d'origine et/ou les échantillons finement broyés.**

	Test ECD de 48 h <sup>a</sup> Taux d'hydrolyse de la cellulose (%)		Test BMP de 60 jours CH <sub>4</sub> produits (ml/g)	Test de durabilité (4 mois) Perte de masse (%)
	Etat d'origine	Broyage	Etat d'origine	
Mt	8	19	11	34
Flo3	0	2	0	nd
Flo5	0	3	0	0
Onh3	0	1	0	nd
what	75	nd	29	nd

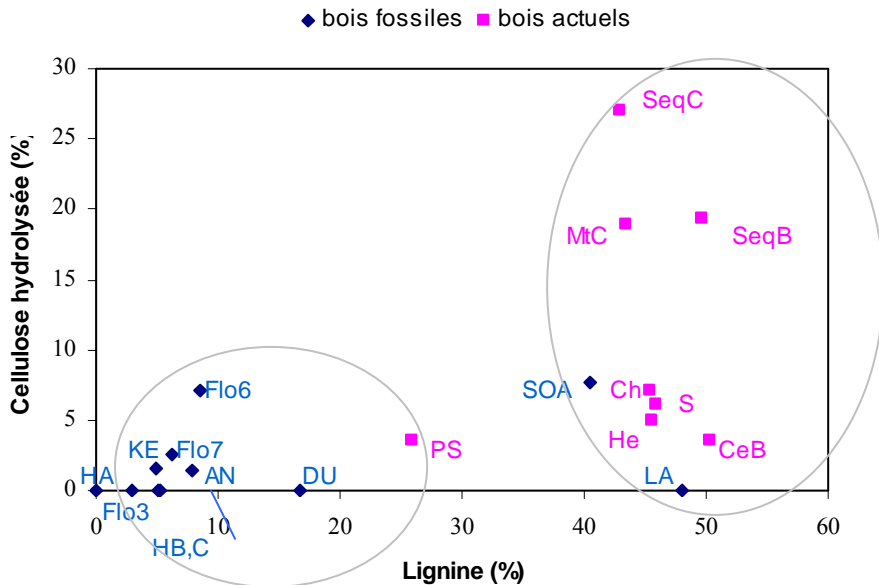
<sup>a</sup> L'activité cellulolytique du mélange enzymatique utilisé au cours de ce test est de 270 mUI/ml  
nd : non déterminé

Dans leur état d'origine, les fragments de bois fossiles présentent une cellulose non réactive à l'action des enzymes cellulases. En effet, les bois fossiles de Florennes (environ 35 % de cellulose) et de Onhaye (6 % de cellulose) non broyés n'ont pas réagi au traitement enzymatique de 20 heures alors que le bois actuel non broyé (40 % de cellulose) présente un taux d'hydrolyse de la cellulose de 7% (Tableau 12). Afin de s'assurer que l'absence de dégradation enzymatique au bout des 48 heures n'est pas le résultat d'une inactivation du mélange enzymatique, un ajout de substrat facilement hydrolysable (papier whatman n°1) à l'hydrolysate des échantillons de bois non broyés obtenus après 48 heures a été réalisé. Dès l'ajout du nouveau substrat dans le milieu contenant les échantillons et les enzymes, une

reprise de l'activité enzymatique a été constatée. Ces résultats suggèrent que la faible proportion de glucose produite après 48 heures serait due à un manque d'accessibilité de la cellulose contenue dans les échantillons de bois fossiles. Ils sont de plus confirmés par le test de méthanisation BMP et le test de durabilité naturelle en présence de *C. puteana* (Tableau 12). Ce dernier test nous montre que la capacité d'attaque, exprimée en pourcentage de perte de masse, du champignon lignivore vis-à-vis du bois fossile de Florennes, est limitée par rapport au bois actuel *Metasequoia*.

De surcroît, la réactivité de la cellulose n'est pas accrue par le traitement physique des échantillons par broyage. En effet, une augmentation de la surface spécifique du substrat n'augmente presque pas la digestibilité enzymatique dans les cas des bois fossiles (taux d'hydrolyse de 2-3 % pour Florennes et 1 % pour Onhay), alors que la fraction accessible est multipliée par 4 dans le cas du *Metasequoia*. Le potentiel d'évolution des bois fossiles est donc nul dans leur état natif et très faible s'ils sont broyés.

Ce test de biodisponibilité de la cellulose a également été réalisé sur les bois fossiles de toute la collection. La teneur en lignine des bois fossiles et actuels a été mise en relation avec la biodisponibilité de la cellulose dans la figure 16. A gauche du graphique se situent des bois fossiles très peu biodégradables ayant probablement subi des modifications chimiques de leur lignine, ce qui les a rendu plus résistants à toute forme de biodégradation. A droite se trouvent les bois fossiles les plus contemporains (Sint Odilienberg et Lampernisse) et les essences actuelles (hêtre, séquoia, cèdre,...) biodégradables composés de lignine « intacte » qui laisse les cellulases jouer partiellement leur rôle hydrolytique.



**Figure 16** Relation entre la biodisponibilité de la cellulose et la teneur en lignine des bois fossiles et actuels. MtC (Métaséquoia cœur), CeB (Cèdre branche), Ch (Chêne), He (Hêtre), SeqB (Séquoia Branche), SeqC (Séquoia cœur), PS (pin sylvestre), S (sapin), AN (Andenne), DU (Dunarobba), Flo (Florennes), HA-B-C (Hambach A-B-C), KE (Kerguelen), LA (Lampernisse) et SOA (Sint Odiliënberg A)

Plusieurs explications relatives à la non biodisponibilité de la cellulose peuvent d'emblée être envisagées. Une première explication serait liée à un manque d'accessibilité dû à une modification des propriétés physico-chimiques (cristallinité, degré de polymérisation, surface spécifique, porosité des fibres) de la cellulose fossile. En effet, la cellulose dite "récalcitrante" pourrait avoir subi des modifications physico-chimiques lors de l'enfouissement initial des bois fossiles et/ou lors de leur fossilisation, tout en maintenant sa structure polymérique. Cette hypothèse sera d'emblée étudiée dans la suite de la thèse. Une deuxième explication aurait trait à la présence des composantes enrobant les fibres de cellulose (lignine, tannins, résines,...) qui auraient subi des modifications physico-chimiques au cours du temps (Hatcher et al., 1994) mais surtout joueraient un rôle de protection contre les attaques des microorganismes.

### 1.3. Caractérisation structurale

#### 1.3.1. CPMAS $^{13}\text{C}$ RMN

La résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide est une technique qualitative et quantitative de caractérisation structurale des composés organiques présents dans les bois. Le relevé de ces caractéristiques est essentiel pour une meilleure compréhension du processus de fossilisation ayant mené à la préservation importante de la cellulose présente dans les bois fossiles de Florennes. Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS du bois moderne de *Metasequoia* et du bois fossile de Florennes sont présentés dans la figure 17. Les assignements des pics ont été réalisés sur base de la littérature (Gilardi et al., 1995).

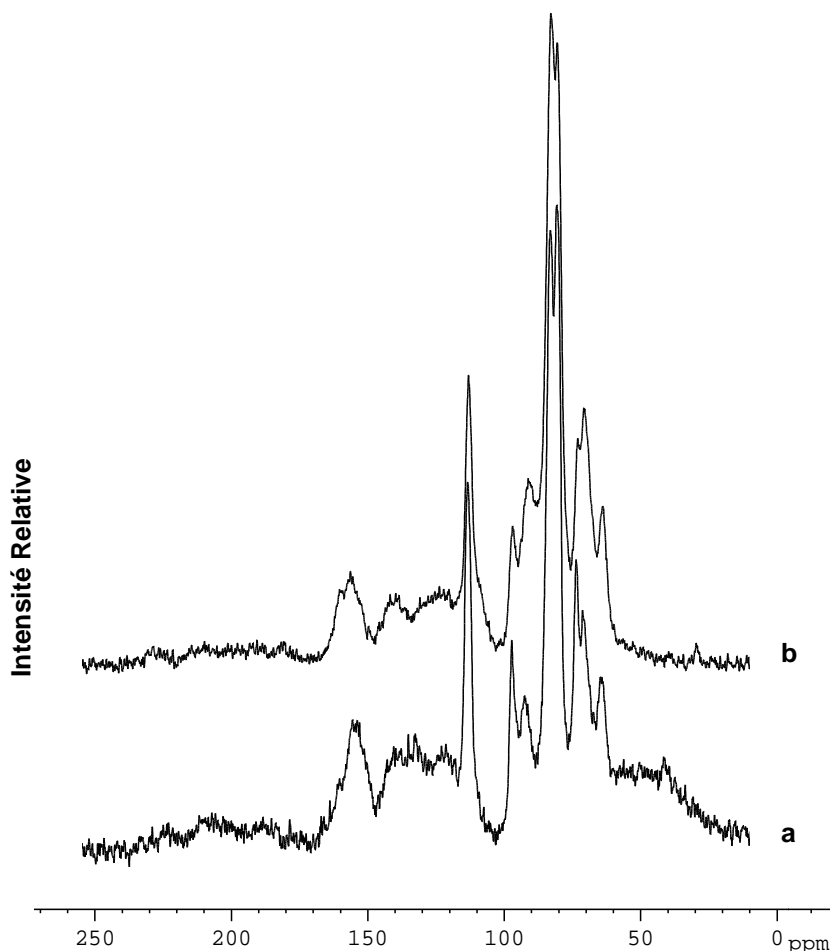


Figure 17 Spectres RMN  $^{13}\text{C}$ CP/MAS du bois fossile de Florennes (a) et du bois moderne *Metasequoia* (b)

**Polysaccharides.** Les résonances des polysaccharides apparaissent dans les bois fossile et actuel à 64, 67, 72, 85, 90 et 106 ppm (Figure 17, a et b). La comparaison entre les pourcentages (relatifs aux carbones) de polysaccharides présents dans le bois fossile avec ceux du bois actuel suggèrent une légère dégradation des polysaccharides avec le temps. Les résonances à 22 et 175 ppm dans le spectre du bois actuel sont dues aux hémicelluloses. Ces pics sont absents dans le spectre du bois fossile, ce qui suggère que les hémicelluloses présentes dans ce bois ont été préférentiellement dégradées par rapport à la cellulose. La cellulose est, quant à elle, présente sous la forme I dans tous les échantillons de bois, comme le montre le pic singulet à 106 ppm.

**Composantes aromatiques.** Les spectres présentent des pics de résonance entre 100 et 160 ppm relatifs aux composantes aromatiques de la lignine illustrées dans la figure 17. Les carbones des unités méthoxyles de la lignine présents dans le bois fossile montrent une résonance intense à 56 ppm. L'unité guaiacyle est la principale unité présente dans les bois de gymnospermes. Une description plus détaillée de la structure de la lignine présente au sein du bois fossile de Florennes et *Metasequoia* sera réalisée dans la section 3 de ce chapitre.

**Composantes aliphatiques.** Des signaux de résonance caractéristiques de structures aliphatiques (par exemple les résines, les graisses et les huiles essentielles) forment une bande large et faiblement résolue de 0 à 50 ppm. Les résines donnent en effet lieu à ce type de signaux et sont connues pour ne subir que très peu de changements au cours du temps comme elles sont assez résistantes (Hatcher et al., 1982). Cependant, ces pics aliphatiques se distinguent nettement plus dans le bois fossile de Florennes ce qui montre que ces structures ont évolué par rapport à celles présentes dans le bois actuel. Les examens microscopiques ont de plus révélé que ce bois est fortement imprégné par des résidus colorés. Teichmuller (1975) suggère que les lignites\* d'Allemagne (Miocène) ont été préservées avec très peu de changements morphologiques grâce aux résines des conifères qui protègent les bois de la dégradation avancée.

### 1.3.2. FTIR

Les spectres FTIR des échantillons de bois contiennent plusieurs bandes superposées. En outre, la plupart des composants du bois contribuent, au moins en partie, à toutes les bandes observées. La seule bande « pure » est attribuée aux composés aromatiques présents dans la lignine, qui donne une absorption caractéristique à  $1508\text{ cm}^{-1}$  et habituellement utilisée comme bande de référence (Ferraz et al., 2000). Les spectres expérimentaux obtenus pour le bois fossile de Florennes et *Metasequoia* (Figure 18) ont ainsi été normalisés par rapport à ce pic de résonance. Ainsi, il est possible, sur base des graphes FTIR et des intensités relatives des différents pics caractéristiques des composés du bois, d'analyser l'évolution des différents composés du bois.

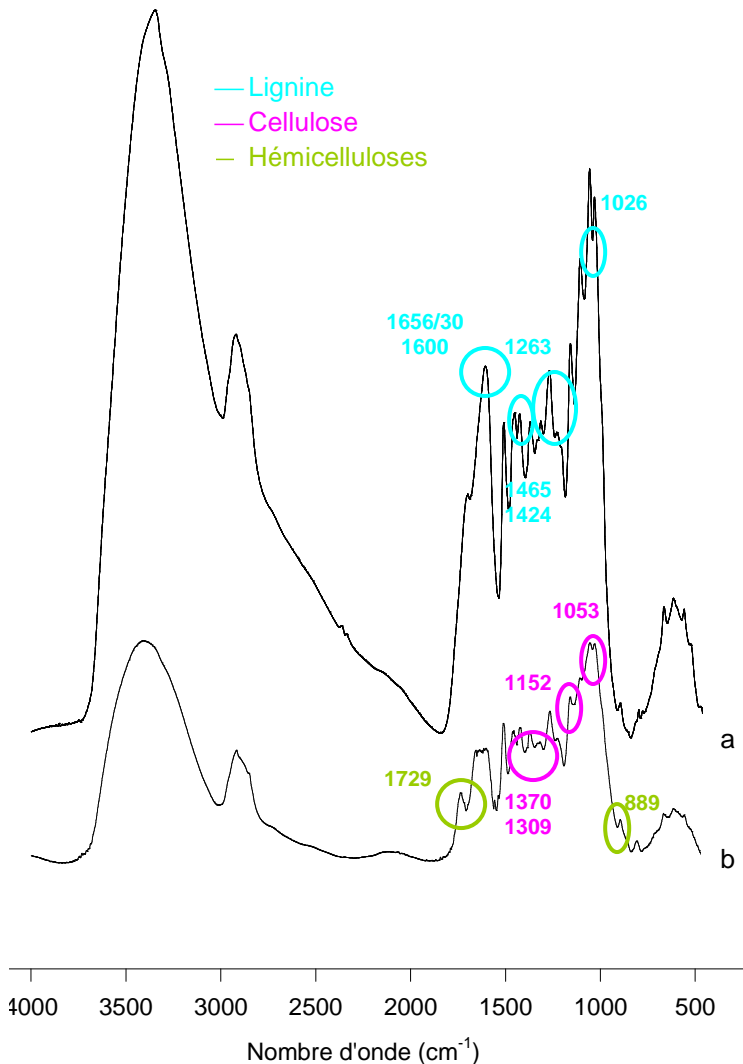


Figure 18 Spectres FTIR du bois fossile de Florennes (a) et de *Metasequoia* (b)

Les spectres FTIR du bois fossile de Florennes et de *Metasequoia* montrent la même structure de base : une large bande de stretching OH-CH entre 2800-3000 $\text{cm}^{-1}$ , et plusieurs pics distincts dans la région la plus caractéristique du spectre (*finger print*) entre 500 et 1750  $\text{cm}^{-1}$ . L'attribution de ces bandes d'absorption a été réalisée à partir des travaux de Pandey and Pitman (2003). Ces pics correspondent aux longueurs d'onde caractéristiques des polysaccharides (1729  $\text{cm}^{-1}$ , 1370  $\text{cm}^{-1}$ , 1309  $\text{cm}^{-1}$ , 1152  $\text{cm}^{-1}$ , 1053  $\text{cm}^{-1}$  et 889  $\text{cm}^{-1}$ ) et des composés ligneux (1656/30  $\text{cm}^{-1}$ , 1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1465  $\text{cm}^{-1}$ , 1424  $\text{cm}^{-1}$ , 1263  $\text{cm}^{-1}$  et 1026  $\text{cm}^{-1}$ ) des parois cellulaires.

En ce qui concerne l'évolution des structures au sein des échantillons de Florennes, la diminution d'intensité de la bande d'absorption à 889  $\text{cm}^{-1}$  et la disparition de celle à 1729  $\text{cm}^{-1}$  nous montrent que ces bois fossiles ne contiennent plus d'hémicelluloses. Ce résultat est en accord avec les analyses chimiques. Du fait de la disparition des signaux relatifs aux hémicelluloses, l'intensité des pics relatifs aux autres composés (lignine et cellulose) se voit augmentée : pics à 1110, 1600, 1700  $\text{cm}^{-1}$  pour la lignine et 1053  $\text{cm}^{-1}$  pour la cellulose. De plus, les résultats indiquent une structure de cellulose similaire et des différences de structure de la lignine entre le bois fossile et *Metasequoia*. Par contre, aucun des changements mentionnés par Orem et al. (1996) au cours du processus expérimentale de coalification de la tourbe n'est constaté au sein des échantillons testés.

## **2. Etude des conditions naturelles de fossilisation des bois fossiles**

### **2.1. Caractérisation physicochimique de la matrice d'enfouissement**

Il s'agit ici d'étudier l'influence des paramètres extérieurs telles que l'humidité, l'imperméabilité, l'acidité,... de la matière organique ou ligniteuse susceptibles d'avoir contrôlé la préservation de la cellulose des bois fossiles. En effet, s'ils n'ont pas, ou peu, subi de dégradation depuis plusieurs millions d'années, les bois fossiles ont pu bénéficier de conditions d'ensevelissement particulières conduisant, d'une part, à leur préservation et/ou, d'autre part, à une modification de leur structure qui à l'heure actuelle leur permet de se conserver dans des conditions tout à fait hostiles. En vue d'élucider les altérations chimiques possibles des fragments de bois fossiles, les échantillons d'argiles ligniteuses\*

de l'ESEM (Florennes et Onhay) sont comparés à ceux de Maasmechelen prélevés dans des sédiments similaires (cf. [Tableau 4](#) du chapitre *Matériels & Méthodes*). Ces échantillons ont été sélectionnés sur base de leur composition, leur biodégradabilité et la possibilité de prélèvement dans les sites. Le [tableau 13](#) présente les résultats des mesures (température, pourcentages d'oxygène, potentiel d'oxydo-réduction, coefficient de perméabilité, humidité et pH) effectuées sur ces quatre sites ou à partir d'échantillons de sédiments hôtes prélevés sur ces sites.

**Tableau 13 Synthèse des différents paramètres mesurés le 02/12/04 in situ (température, pourcentage d'oxygène, potentiel d'oxydo-réduction) et sur les échantillons de sédiments hôtes non congelés en profondeur (coefficient de perméabilité, humidité, pH, pH<sub>KCl</sub>) des sites de Florennes, Onhay, Maasmechelen BERG et OPL**

Echantillons	T(°C)	% O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Potentiel d'oxydo-réduction (mV) <sup>a</sup>	Coefficient de perméabilité à 10°C (m/s) <sup>a</sup>	Humidité (%) <sup>a, b</sup>	pH <sub>KCl</sub> <sup>a, b</sup>	pH <sup>a, b</sup>
Florennes	4	20	70-80	7.2 à 21 10 <sup>-8</sup>	47	4.6	5.3
Onhay	4	20	-	4.0 à 7.8 10 <sup>-8</sup>	46	4.7	5.3
Maasmechelen BERG	0	20.8	-	3.9 à 5.4 10 <sup>-8</sup>	54	4.6	5.4
Maasmechelen OPL	0	20.2	-	0.7 à 1.6 10 <sup>-8</sup>	72	4.3	5.0

<sup>a</sup> paramètres mesurés en laboratoire et *in situ* selon les protocoles décrits dans la section 7 du chapitre *Matériels & Méthodes*

<sup>b</sup> expériences réalisées sur les échantillons remaniés des différents sols

Rappelons que plus la perméabilité est grande, plus le passage de l'eau à travers le sol se fera aisément et, par hypothèse, plus les échantillons de bois seront susceptibles d'être dégradés (création de points de passage préférentiel au sein des structures végétales). Pour information, le coefficient de perméabilité de l'argile\* est en général inférieur à 10<sup>-9</sup> m/s et celui des sables fins se situe aux environs de 10<sup>-6</sup> m/s. Lors des mesures, une certaine variation des coefficients de perméabilité a été observée. Cette fluctuation provient vraisemblablement de l'hétérogénéité des matériaux analysés ainsi que de la formation de bulles de gaz dans ceux-ci au cours des essais. La dispersion des mesures de perméabilité (0.7 10<sup>-8</sup> à 21 10<sup>-8</sup>) est assez étroite ([Tableau 12](#)). Néanmoins ces valeurs de l'ordre de 10<sup>-8</sup> indiquent dans l'ensemble que les sédiments hôtes dans lesquels sont enfouis les bois fossiles sont assez imperméables pour préserver ceux-ci mais permettent quand même une



certaine circulation d'eau. Les échantillons de Maasmechelen BERG et de Florennes contiennent une cellulose mieux conservée (16 et 27 % de cellulose respectivement, [Tableau 10](#)) bien que les sols enrobant ces bois fossiles soient les plus perméables. Par conséquent, l'hypothèse n'est pas tangible.

Par contre, le pourcentage d'oxygène et le potentiel d'oxydo-réduction nous montrent que les bois fossiles se trouvent dans des conditions totalement aérobies. Les taux d'humidité relevés montrent que de très bonnes conditions de biodégradation de la matière organique sont présentes. L'analyse du pourcentage de gaz carbonique présent dans les sols indique que l'activité biologique des sédiments hôtes est très faible (résultats non montrés). Cependant, étant donné la température extérieure assez basse, des analyses complémentaires pourraient être effectuées en été. Toutes les transformations (bio)chimiques dans le sol ainsi que l'activité des microorganismes sont influencées par l'activité protonique, qui est habituellement définie par le pH (Alef and Nannipieri, 1995). D'après les références du département de l'agriculture des Etats-Unis (USDA, 2009), les sédiments étudiés sont à classer parmi les sols fortement acides (pH entre 5.0 et 5.5). Le pH des sols a cependant pu être différent par le passé. Dans les conditions aérobies telles que relevées sur le terrain et qui ont prévalu au cours de ces dernières dizaines d'années (mise en activité des différentes carrières), les bactéries (*Streptomyces*, *Cellulomonas*,...) et les champignons (*Aspergillus*, *Trichoderma*,...) qui décomposent habituellement la matière organique des sols auraient dû exercer leur activité hydrolytique (De Boer et al., 2005).

Les cations échangeables ont été dosés dans les sédiments hôtes enrobant les bois fossiles afin de vérifier si ces bois auraient pu subir une minéralisation partielle ou totale au sein des sédiments.

**Tableau 14 Cations échangeables (Al, Ca, Mg, Na) présents dans les 4 sédiments hôtes étudiés**

Echantillons	meq/g poids sec			
	Al	Ca	Mg	Na
Florennes	0.001	0.593	0.108	0.001
Onhayé	0.005	0.455	0.057	0.002
Maasmechelen BERG	0.000	0.917	0.049	0.002
Maasmechelen OPL	0.049	0.679	0.085	0.003

Le dosage des ions Fe, K, Mn et Zn ne sont pas repris dans le [tableau 14](#) car ils sont seulement présents à l'état de traces. Le calcium est le cation dominant du complexe d'échange au sein des différents sédiments (sols calcaires\*). La tourbe\* contenant les échantillons de Florennes présente quant à elle une concentration plus élevée en ions magnésium tandis que les lignites\* de Maasmechelen OPL présentent une concentration plus élevée en ions aluminium. Ces ions  $Al^{3+}$  apparaissent dans les sols organiques acides suite à l'altération des silicates (Braize, 1988).

L'étude des conditions naturelles de fossilisation des fragments de bois fossiles de l'ESEM et de Maasmechelen telles que l'humidité, la perméabilité, l'acidité,... des sédiments hôtes montre que les conditions étaient réunies pour favoriser la dégradation des polysaccharides ou la minéralisation des bois. Cependant les bois de Florennes et de Maasmechelen BERG ont résisté aux dégradations aussi bien aérobies qu'anaérobies. La détérioration plus importante des bois fossiles d'Onhaye et de Maasmechelen OPL, (5 et 2 % de cellulose restante respectivement, [Tableau 10](#)), pourtant récoltés dans des conditions similaires à ceux de Florennes et Maamechelen BERG, confirme l'hypothèse probable de l'intervention d'une altération antérieure à l'enfouissement.

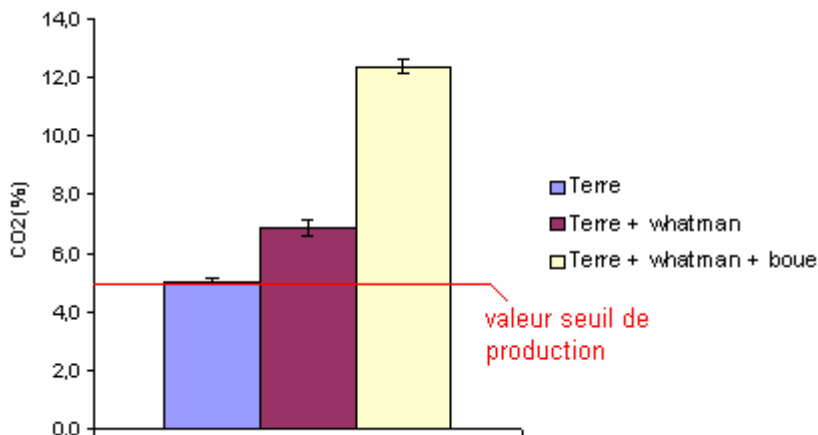
## **2.2. Estimation de l'activité microbienne du sol**

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'existence dans le sol environnant des bois de Florennes d'une flore microbienne capable de dégrader la cellulose des bois fossiles.

Un dénombrement sur milieu riche a permis de caractériser le sol en nombre de microorganismes totaux en cfu/g de sol sec. Cette unité permet de tenir compte du nombre de microorganismes mis en suspension dans une solution diluée de terre et celui-ci est de  $1.5 \cdot 10^5$  cfu/g. Pour information, le nombre de microorganismes présents dans un sol agricole se situe entre  $10^7$ - $10^8$  cfu/g de sol (Aon et al., 2001) tandis que dans une litière végétale de chêne ou de pin, il évolue respectivement entre  $10^3$ - $10^6$  cfu/g (Criquet et al., 2002) en fonction des saisons. Le résultat obtenu montre que ce milieu contient un nombre de microorganismes tel qu'il aurait pu exercer une action de dégradation sur les bois fossiles de Florennes. Pour mettre en évidence l'activité de dégradation par les

microorganismes, un test biochimique de production de méthane a été réalisé sur un échantillon du sol considéré.

La mise en évidence de l'activité microbienne du sol de Florennes a été réalisée au cours d'un test de biodégradation en anaérobiose (BMP) en mettant en présence de la terre de Florennes et un substrat cellulosique facilement accessible, le papier whatman. Ce test permet d'étudier la production de gaz tels que le méthane ou le dioxyde de carbone, produits par les microorganismes anaérobies en dégradant la cellulose. Afin de déterminer la part de biogaz produit réellement par les échantillons de terre de Florennes, le test a nécessité l'utilisation de deux témoins préparés dans les mêmes conditions mais sans ajout de papier whatman pour le premier témoin et avec apport d'une flore microbienne supplémentaire (consortium de bactéries issues d'une station d'épuration) pour le deuxième témoin. La composition du biogaz produit par les microorganismes a été analysée par chromatographie en phase gazeuse après 30 jours d'incubation à 30°C.



**Figure 19 Taux de CO<sub>2</sub> produit au cours du test BMP par les échantillons de sol de Florennes, de terre de Florennes + whatman et de terre de Florennes + whatman + boue**

La figure 19 nous montre que la dégradation de la cellulose du papier whatman a entraîné la production de CO<sub>2</sub> dans tous les échantillons. La quantité de CO<sub>2</sub> produite par la terre de Florennes seule a permis de déterminer un seuil de production. Par rapport à ce seuil, une légère évolution de la production de CO<sub>2</sub> est observée dans les échantillons de terre additionnés de papier whatman ce qui indique une dégradation de la cellulose du papier whatman par les microorganismes présents dans le sol de Florennes. Cette activité reste

relativement faible par rapport à l'activité des boues sur le papier whatman. Ce résultat est tout à fait logique car le consortium de bactéries présentes dans ces boues est constitué de populations acclimatées à la digestion anaérobie. Les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les bois fossiles de Florennes depuis l'exploitation du karst\* (environ 50 ans) permettent la dégradation de la cellulose des bois fossiles. L'environnement immédiat des bois fossiles ne peut donc logiquement pas expliquer la non-biodégradation de la cellulose de ces bois.

### **3. Influence de la structure de la cellulose sur sa digestibilité**

Face au problème posé par la non-biodégradation des celluloses fossiles, une explication envisagée serait un manque de digestibilité pour les enzymes hydrolytiques suite à des modifications des propriétés physico-chimiques (cristallinité, degré de polymérisation, surface spécifique, porosité des fibres) de la cellulose fossile. En effet, différents auteurs s'accordent à dire que l'hydrolyse enzymatique de la cellulose est influencée par les caractéristiques structurales citées précédemment mais classent différemment l'impact de ces paramètres sur la digestibilité de la cellulose (Thonart et al., 1979 ; Fan et al., 1980 ; Ramos et al., 1993 ; Hayashi et al., 1998). Au cours de ce doctorat, l'impact de la cristallinité (et autres paramètres associés), de la surface spécifique et de la morphologie des fibres sur le taux d'hydrolyse de la cellulose fossile a été investiguée. Afin de faciliter ces recherches, des modèles simples, c'est-à-dire des systèmes non lignocellulosiques tels que des poudres de cellulose commerciale et des fibres naturelles (lin, chanvre, coton) ont tout d'abord été testés. L'analyse de systèmes plus complexes ou lignocellulosiques (bois actuels et fossiles de différentes essences) a ensuite été réalisée.

#### **3.1. Cristallinité, réseau cristallin, taille des cristallites et allomorphes $I_{\alpha}$ / $I_{\beta}$**

La non-biodégradation des celluloses fossiles pourrait s'expliquer par un manque de digestibilité pour les enzymes hydrolytiques dû à une modification de la cristallinité de la cellulose fossile au cours du temps. En effet, d'après Weimer et al. (1990), la conversion de la cellulose native (I) vers un autre type de structure cristalline (II ou autre) ralentit la cinétique de dégradation de la cellulose. Une structure de départ différente ou une modification de la structure originale de la cellulose fossile pourrait donc être à la base de sa non-biodégradabilité.

L'hypothèse que nous avons cherché à vérifier est la suivante : une augmentation de la cristallinité s'accompagne d'une diminution de la digestibilité. En effet, les groupements hydroxyles libres au sein du polymère de cellulose sont susceptibles d'être impliqués dans un certain nombre de liens hydrogène inter ou intra moléculaires ce qui limite l'accessibilité de ces zones aux enzymes et à l'eau. Le phénomène inverse se déroule dans les zones amorphes où les groupements hydroxyles libres sont susceptibles de réaliser des liaisons hydrogènes avec des molécules d'eau et de favoriser l'accessibilité enzymatique. De même, nous avons analysé l'influence de la taille des cristallites, du type de réseau cristallin et du rapport des allomorphes  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  sur la digestibilité de la cellulose. Les caractéristiques moléculaires et structurales de la cellulose ont été déterminées par deux techniques différentes : la diffraction rayons X (Malutan et al., 1999) et la résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide (Hatcher et al., 1999).

### 3.1.1. Celluloses I

Afin de vérifier notre hypothèse de départ, différents échantillons de celluloses natives (cf. Section 2 du chapitre *Matériels & Méthodes*) ont été soumis à des hydrolyses enzymatiques. La majorité des celluloses natives possèdent la même structure cristalline (cellulose I) caractérisée par un arrangement parallèle des chaînes de cellulose et une absence de liaisons hydrogène inter chaînes (Perez and Mazeau, 2005). Ces résultats ont ensuite été mis en relation avec le degré de cristallinité déterminé préalablement par diffraction RX et par RMN  $^{13}\text{C}$  de l'état solide (cf. Section 5 du chapitre *Matériels & Méthodes*).

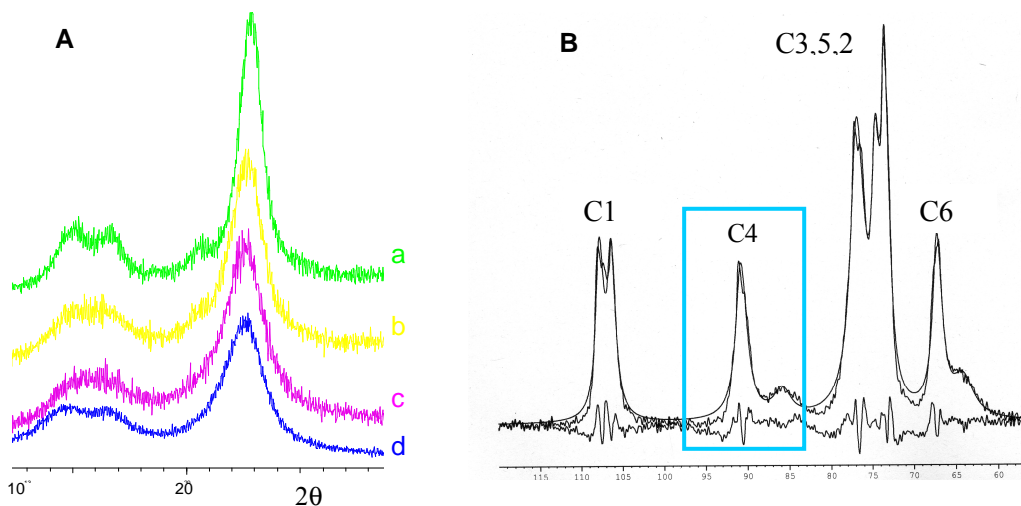


Figure 20 Diffractogrammes RX de celluloses commerciales (A) dont la cellulose médium (a), la cellulose microcristalline 20  $\mu\text{m}$  (b), l' $\alpha$ -cellulose (c) et le lin (d). Spectre de déconvolution\* RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de la cellulose médium à 100.6 MHz (B).

Les profils de diffraction RX réalisés sur des poudres de cellulose ( $\alpha$  cellulose, cellulose médium et cellulose microcristalline 20  $\mu\text{m}$ ) (Figure 20, A) ainsi que sur des fibres végétales (chanvre, coton, jute, lin, ramie) et sur le papier Whatman montrent des profils caractéristiques des celluloses dites de type I (Segal et al., 1959 ; Stewart & Foster, 1976). Le pic le plus intense des diffractogrammes de la cellulose I est celui produit par les réflexions des plans 002 ( $2\theta = 22^\circ$ , singulet) et a donc été choisi pour calculer le pourcentage de cristallinité.

La figure 20 B montre également le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de la cellulose médium. Les différents pics ont été assignés en se référant à l'article de Kono et al. (2002). Notons d'emblée que les bandes larges qui apparaissent vers 86 ppm et 64 ppm ne sont pas des bandes de rotation<sup>3</sup>, en effet, un spectre pris à une vitesse de rotation de 5 KHz l'a démontré. Ces signaux appartiennent à la phase amorphe de la cellulose et se rapportent aux pics cristallins C-4 et C-6 respectivement (Wickholm et al., 1998 ; Liitia et al., 2000 ; Hult et al., 2002). Le degré de cristallinité a été déterminé dans notre cas à partir des aires des signaux C-4 déconvolués<sup>4</sup>. Le tableau 15 reprend les indices de cristallinité calculés à partir des diffractogrammes RX et des spectres de déconvolution\* RMN  $^{13}\text{C}$  des différents substrats cellulosiques.

**Tableau 15 Indices de cristallinité (%) de celluloses commerciales et de fibres végétales, calculés à l'aide de la résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide et de la diffraction rayons X (Segal et al., 1959). Ce tableau reprend également la taille des cristallites (nm) calculée à l'aide de la diffraction RX (Azaroff and Buerger, 1958).**

Celluloses	Indice de cristallinité (%)		Taille des cristallites (nm)
	RMN $^{13}\text{C}$	Diffraction RX	
$\alpha$ cellulose	33.8	82.9	4.8
Cellulose 20 $\mu\text{m}$	46.1	87.8	5.6
Cellulose médium	70.9	94.2	8.1
Chanvre	-	81.9	4.7
Coton	-	74.6	5.1
Lin	-	82.4	4.5
Papier Whatman	57.1	85.1	7.7

<sup>3</sup> Bandes générées par une vitesse insuffisante de rotation de l'échantillon

<sup>4</sup> Déconvolution : reconstruction du spectre expérimental en courbes lorentziennes à l'aide du logiciel Bruker (Karlsruhe, Allemagne). Elle est réalisée en partant de l'estimation de la position et de la largeur des bandes expérimentales qui sont ajustées progressivement en supposant une forme de raie appropriée et un niveau de convergence minimum.

On observera une dispersion importante des indices de cristallinité calculés par RMN par rapport à ceux calculés par diffractométrie RX. Toutefois, cela ne constitue pas un problème en soi. En effet, cette différence est liée aux principes mêmes de ces deux techniques : la diffraction RX se base sur la périodicité de la structure tandis que la résonance magnétique nucléaire est une méthode locale (fonction de l'environnement immédiat). Néanmoins, cela permet d'établir des comparaisons et de vérifier les résultats obtenus en diffractométrie RX. Par conséquent, pour des raisons pratiques (réduction du temps d'analyse), la méthode de diffraction RX a été utilisée pour la détermination de l'indice de cristallinité.

En vue de vérifier notre hypothèse de travail, environ 50 mg de chacune de ces celluloses ont été incubées pendant une période de 48 heures, à une température de 40°C et à un pH de 5.5, en présence de 4 ml de mélange enzymatique.

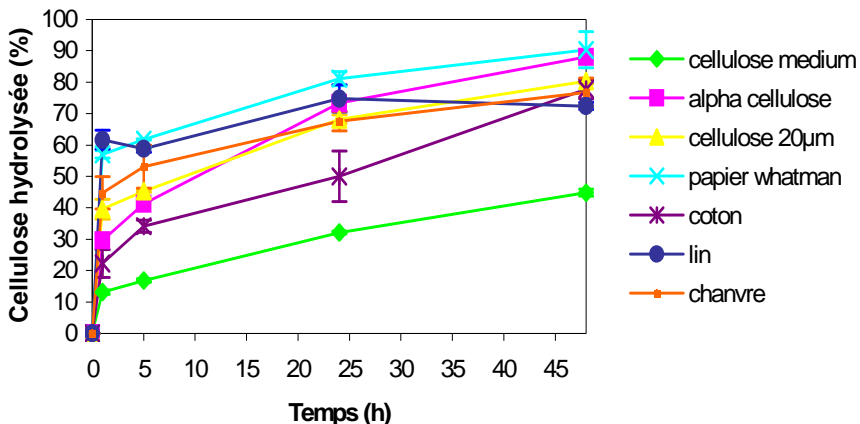


Figure 21 Evolution du taux d'hydrolyse (1h, 5h, 24h et 48h de digestion) de la matière cellulosique présente dans différentes poudres de cellulose ainsi que dans des fibres végétales et du papier Whatman suite à la dégradation par le mélange enzymatique (activité cellulolytique de 693 mUI/ml)

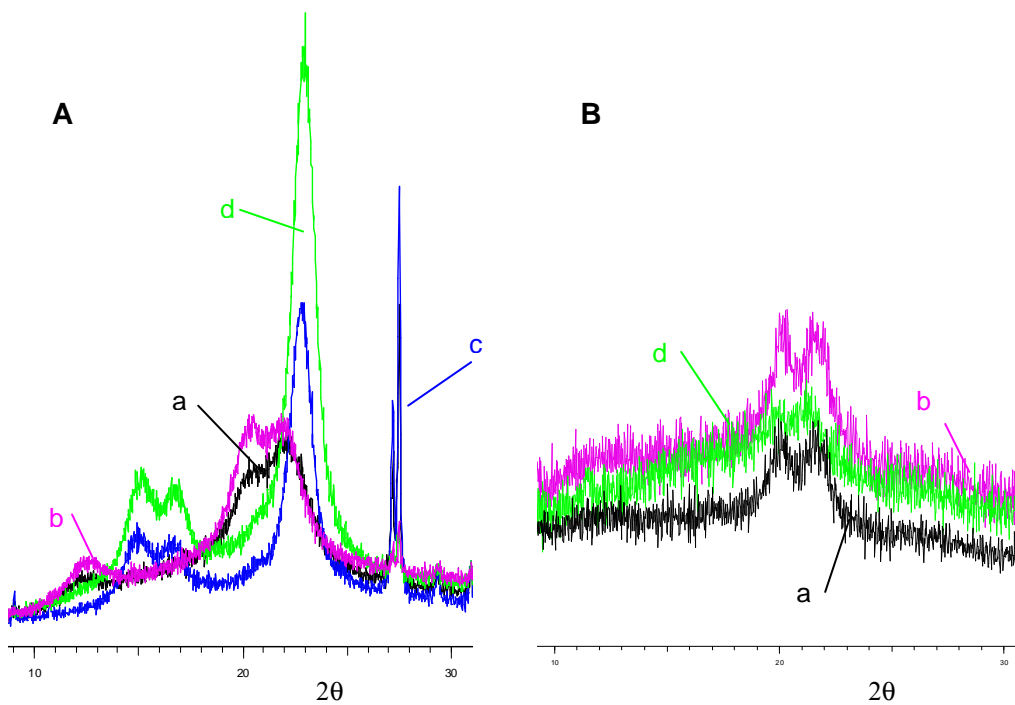
L'analyse des indices de cristallinité des différentes celluloses (Tableau 15) et des profils de digestibilité correspondant (Figure 21) ont confirmé qu'une cristallinité importante influence négativement la digestibilité des différentes poudres de celluloses commerciales. Cependant, les fibres végétales (chanvre, coton, lin) ainsi que le papier Whatman ne suivent pas cette tendance générale ce qui signifie que d'autres paramètres structuraux doivent également être pris en compte pour expliquer les différentes affinités pour ces substrats. La taille des cristallites (Tableau 15) ne semble pas être quant à elle un paramètre critique reflétant la bioaccessibilité des celluloses.

Les celluloses pures et les fibres végétales présentent une cinétique de digestibilité en deux phases. Initialement les fractions les plus accessibles de la cellulose sont attaquées et, par conséquent, la fraction la plus résistante reste et la réaction ralentit lorsque l'hydrolyse se poursuit. Au cours de cette dernière phase, environ 15 % des celluloses pures et du papier whatman (30 % dans les fibres végétales) restent non hydrolysés après 48 heures d'hydrolyse. Ceci confirme que la réduction du taux d'hydrolyse n'est pas due à un manque de substrat mais à sa transformation en une forme plus résistante à l'attaque enzymatique. Ce résultat ne peut être imputé à une inactivation du mélange enzymatique. En effet, après ajout d'un substrat facilement hydrolysable (papier whatman n°1) à l'hydrolysats des échantillons de cellulose obtenus après 48 heures, une reprise de l'activité enzymatique a été constatée. La cellulose médium présente quant à elle un comportement légèrement différent : elle semble moins susceptible à la dégradation enzymatique (seulement 40 % de cellulose dégradée après 48 heures d'hydrolyse).

#### **3.1.2 Celluloses II**

Afin de déterminer l'influence du réseau cristallin sur la digestibilité, les celluloses de type I des différents échantillons ont été transformées en celluloses de type II par des traitements de mercerisation (Weimer et al., 1990) ou de régénération (Paquot & Thonart, 1982). Ces traitements (*cf.* Section 6 du chapitre *Matériels & Méthodes*) provoquent un réarrangement du réseau cristallin et des liaisons hydrogène qui devrait permettre d'améliorer la digestibilité. En effet, les chaînes de la cellulose I sont arrangées de manière parallèle, tandis que la cellulose II montre un arrangement anti parallèle de ses chaînes. Les différents arrangements des chaînes résultent des réseaux de liaisons hydrogène inter chaînes et intra chaînes différents et, par conséquent, un degré de cristallinité différent. Des études ont montré que la cellulose II possède des liaisons hydrogène supplémentaires entre les chaînes aux extrémités et au centre de la maille unité, et que cet arrangement a pour résultat d'être plus stable que la cellulose I (Krassig, 1996). L'analyse des profils de diffraction des celluloses ainsi traitées a été utilisée pour confirmer les transformations sous forme de réseau de type II.





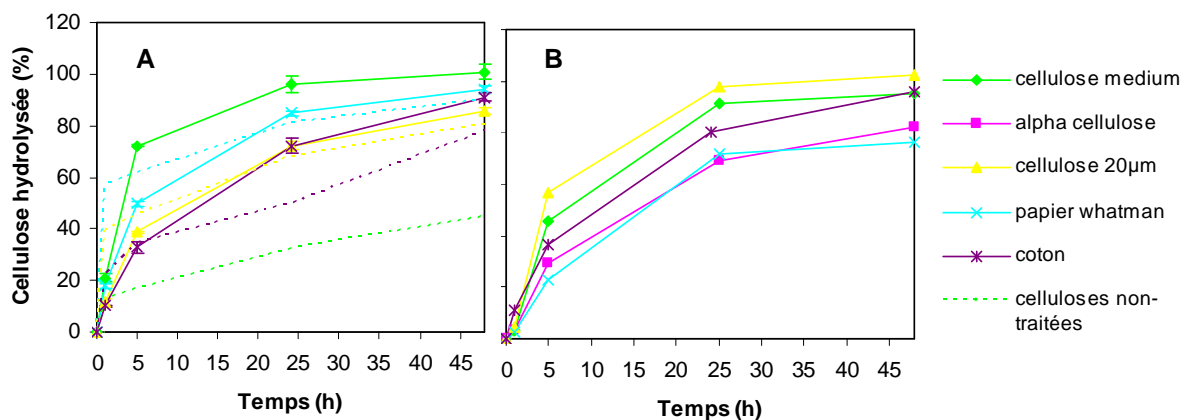
**Figure 22** Diffractogrammes RX de celluloses commerciales mercerisées (A) et régénérées (B) dont l' $\alpha$  cellulose (a), la cellulose microcristalline 20  $\mu\text{m}$  (b), la cellulose médium (c) et le papier whatman (d)

Les diffractogrammes de poudre des celluloses mercerisées sont montrés dans la [figure 22 \(A\)](#). La transformation de la cellulose I en cellulose II est confirmée par la présence de pics de diffraction des réflexions en 101,  $10\bar{1}$  et 002, apparaissant à environ  $12^\circ$  (singulet),  $20^\circ$  et  $22^\circ$   $2\theta$  (doublet) respectivement (Kumar et al., 2002). Néanmoins cette transformation s'effectue de façon aléatoire puisque au cours d'un premier essai, le réseau cristallin n'a pas été modifié pour l'ensemble des échantillons de cellulose traités ([Figure 22, A](#), échantillons c et d). A la suite d'un deuxième essai, aucune transformation vers un réseau de type II n'a eu lieu et un troisième essai a permis d'obtenir des celluloses entièrement mercerisées. Différents paramètres peuvent être envisagés pour expliquer le caractère « aléatoire » de la transformation dont l'influence de la concentration en solution NaOH, la température, le degré de polymérisation, la source de cellulose, la texture même des celluloses,...(Colom and Carillo, 2002). Ce traitement de mercerisation comporte en effet un certain nombre d'étapes (*cf.* Section 6 du chapitre *Matériels & Méthodes*) qui peuvent moduler ou non le réseau cristallin et la cristallinité.

Les diffractogrammes de celluloses régénérées (Figure 22, B) présentent quant à eux l'allure attendue pour la cellulose II, c'est-à-dire un doublet en 002 et un singulet en 101. Par comparaison au traitement de mercerisation, cette méthode constitue un excellent moyen d'obtenir des celluloses de type II lors de chaque traitement.

**Tableau 16 Indices de cristallinité (%) de celluloses commerciales mercerisées et régénérées**

	Merцерisées	Régénérées
α-cellulose	-	47.3
Cellulose medium	71.1	63.9
Cellulose microcristalline 20 μm	70.3	48.5
Coton	-	52.9
Papier Whatman	63.2	32.5



**Figure 23 Evolution du taux d'hydrolyse (1h, 5h, 24h et 48h de digestion) de la matière cellulosique mercerisée (A) et régénérée (B) présente dans différentes poudres de cellulose ainsi que dans du coton et du papier whatman suite à la dégradation par le mélange enzymatique (activité cellulolytique 787 mUI/ml)**

En règle générale et selon l'hypothèse posée initialement pour les celluloses de type I, la diminution de la cristallinité s'accompagne d'une augmentation de la digestibilité. Cette théorie reste vraie puisqu'avec environ 70% de cristallinité (Tableau 16), soit environ une diminution de 10% de la cristallinité lors du traitement de mercerisation, ces celluloses présentent un taux d'hydrolyse supérieures aux celluloses I (85-94% de cristallinité) (Figure 23, A). Néanmoins, étant donné que le degré de cristallinité de ces celluloses est plus ou moins identique, il ne peut pas expliquer les différences d'évolution dans les profils de

concentration. Les celluloses mercerisées présentent un profil de digestibilité enzymatique similaire à celle des celluloses natives avec néanmoins une première phase de digestion plus longue (Figure 23, A). En effet, ces poudres présentent une première phase de digestion d'environ 10 heures alors que cette phase ne dure qu'environ une heure dans les poudres non-traitées. Contrairement à la cellulose médium native, la cellulose médium mercerisée montre ici une cinétique enzymatique identique aux autres celluloses mercerisées : la transformation sous un réseau cristallin différent a permis la transformation de la cellulose sous une forme plus digestible (environ 100 % de cellulose dégradée après 48 heures d'hydrolyse).

Les profils de digestibilité enzymatique des celluloses régénérées (Figure 23, B) sont quant à eux identiques à ceux obtenus pour les poudres de celluloses mercerisées avec néanmoins une première phase de digestion plus longue (environ 15 heures). Le traitement de régénération a provoqué une diminution importante de la cristallinité (Tableau 16). Les rendements d'hydrolyse obtenus sont supérieures à ceux des celluloses de type I mais l'ordre de digestibilité ne concorde pas avec l'évolution du degré de cristallinité. Même si ce procédé permet de synthétiser des celluloses de type II, les résultats ne sont pas identiques à ceux obtenus pour les celluloses mercerisées. En effet, malgré des similarités dans les dimensions des unités élémentaires du réseau cristallin de la cellulose, il existe certaines différences qui pourraient être significatives entre les celluloses régénérées et mercerisées dont, par exemple, une conformation différente des groupements hydroxyméthoxyles au centre de la chaîne de cellulose (Perez and Mazeau, 2005).

### **3.1.3 Celluloses de bois actuels et fossiles**

Après avoir étudié l'impact de la cristallinité et autres paramètres associés sur la digestibilité de la cellulose dans des systèmes non lignocellulosiques, des systèmes plus complexes ou lignocellulosiques (bois actuels et fossiles de différentes essences) ont été analysés. Dans un premier temps, une analyse des profils de diffraction a été effectuée sur ces bois afin de déterminer le type de réseau cristallin associé à leur cellulose. Dans un deuxième temps, les indices de cristallinité de la cellulose des bois ont été déterminés et mis en relation avec la biodisponibilité de celle-ci.

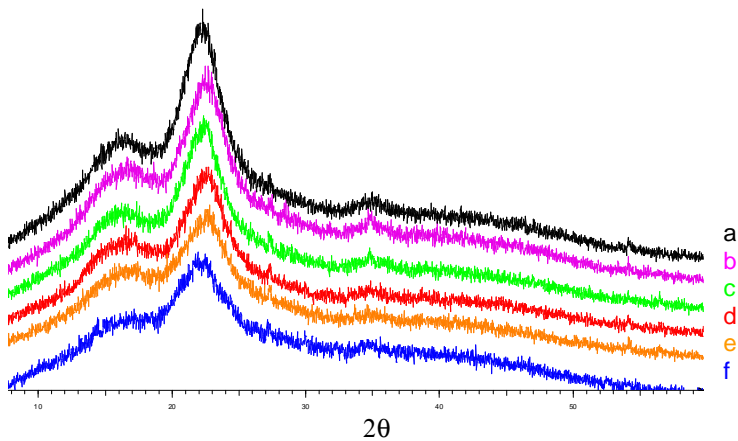


Figure 24 Diffractogrammes RX de poudres de bois divers dont a) l'hêtre (a), l'épicéa (b), le chêne (c), le cèdre (d), le séquoia (e) et le châtaignier (f)

Les diffractogrammes des bois récents (Figure 24) et des bois fossiles de différentes essences sont similaires à ceux des celluloses de type I (Figure 20), néanmoins les pics de diffraction 101 et 10 $\bar{1}$  n'apparaissent pas distinctement. L'élargissement des pics peut provenir de plusieurs facteurs dont la contribution des zones amorphes de la cellulose, une auto-amorphisation des cristallites due à leur petite taille,...

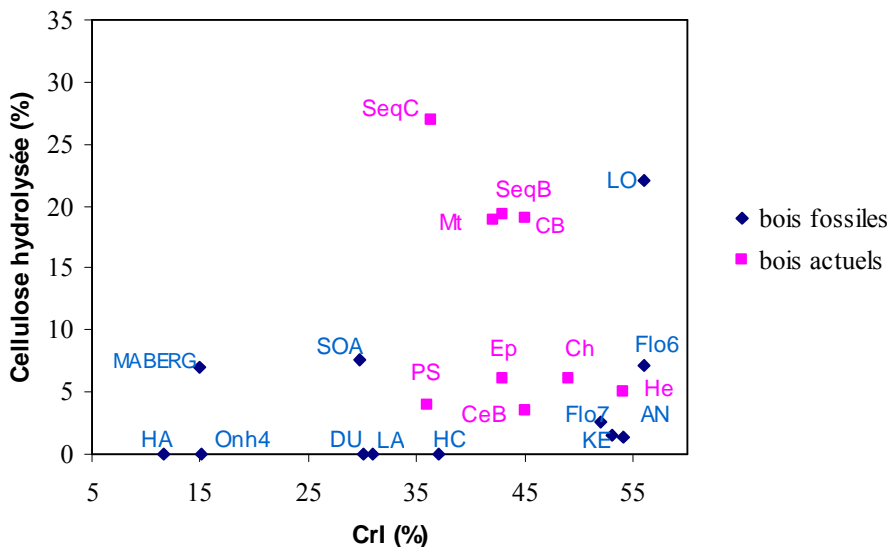


Figure 25 Relation entre la biodisponibilité de la cellulose et le degré de cristallinité des bois fossiles et actuels. Légende : Mt (Metasequoia branche), CeB (Cèdre branche), Ch (Chêne), Ep (Epicéa), He (Hêtre), SeqB (Séquoia branche), SeqC (Séquoia cœur), PS (Pin sylvestre), CB (Châtaignier branche), AN (Andenne), DU (Dunarobba), Flo (Florennes), HA (Hambach A), KE (Kerguelen), LA (Lampernisse), LO (Longemaison), MABERG (Maasmechelen BERG), Onh (Onhaye) et SOA (Sint Odiliënberg A).

Dans le cas des bois récents, l'analyse de la cinétique d'hydrolyse enzymatique et du degré de cristallinité (Figure 25) ne permet pas de confirmer, sous réserve d'autres analyses plus poussées, l'hypothèse d'une augmentation de la digestibilité en fonction d'une diminution de la cristallinité. En effet, leurs indices de cristallinité évoluent dans une fourchette de valeurs étroites comprises entre 36 et 54 % alors que les taux de cellulose hydrolysée s'échelonnent entre 4 et 26 %. Contrairement aux cinétiques enzymatiques de dégradation des celluloses pures qui se composent de deux phases distinctes, le profil de digestibilité enzymatique des bois actuels se présente en une seule phase ce qui tend à montrer que les barrières limitant la dégradation complète de la cellulose des bois telles que la lignine et/ou les extraits ne sont pas surmontées.

Les bois fossiles dont la cellulose n'est plus ou peu biodisponible, présentent quant à eux des indices de cristallinité s'étalant entre 15 et 56% (Figure 25). Aucune tendance concernant le lien entre la digestibilité des bois fossiles et la cristallinité de leur cellulose n'a pu être dégagée à partir de ces résultats.

### 3.1.4 Détermination du rapport des allomorphes $I_\alpha / I_\beta$ par RMN $^{13}\text{C}$ de l'état solide

La microstructure des microfibrilles de celluloses I est constituée de quantités variables de composantes amorphes mais aussi de nanodomains cristallins composés de deux phases cristallines distinctes (ou allomorphes),  $I_\alpha$  et  $I_\beta$ , présentant deux types de maille cristalline différente. La phase  $I_\alpha$  présente une maille triclinique avec une chaîne simple tandis que  $I_\beta$ , possède une maille monoclinique caractérisée par deux chaînes parallèles (Vietor et al., 2000). D'après l'article de Kono (2002), la forme  $I_\alpha$  de la cellulose native présente un singulet en C-1 et C-6 ainsi qu'un doublet en C-4, alors que la forme  $I_\beta$  ne possède que des doublets (Figure 26).

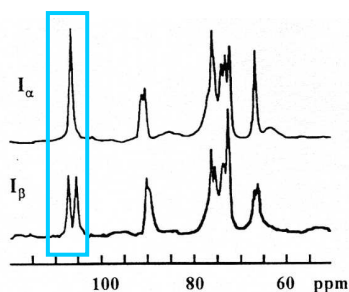


Figure 26 Spectres RMN de l'état solide des allomorphes  $I_\alpha$  et  $I_\beta$  de la cellulose native (Atalla & Vanderhart, 1984)

Le même type de comportement est observé dans le spectre de la cellulose médium (Figure 20, B). Les pics C-1, C-4 et C-6 sont tous des doublets. Néanmoins, une composante  $\alpha$  se retrouve dans le pic C-1 (107.1 ppm). Les deux composantes  $\beta$  du pic C-1 sont mesurées à 107.8 et 106.1 ppm. Nous avons donc essayé de calculer le rapport des deux allomorphes sur base de ce pic (Tableau 17). Des déconvolutions\* ont également été réalisées sur trois autres types de substrat cellulosique : l' $\alpha$ -cellulose, la cellulose microcristalline 20 $\mu$ m et le papier whatman n°1.

**Tableau 17 Résultats de la déconvolution sur la région C-1 du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de celluloses commerciales**

Echantillons	Composition de $I_{\alpha}/I_{\beta}$	
	$I_{\alpha}$ (%)	$I_{\beta}$ (%)
Cellulose médium	27.5	72.5
Papier whatman	26.7	73.3
Cellulose microcristalline	36.0	63.0
$\alpha$ -cellulose	28.8	71.2

En tenant compte des erreurs instrumentales (5 %), nous ne pouvons pas faire de distinction entre les proportions en composantes  $I_{\alpha}$  et  $I_{\beta}$  de la cellulose médium, de l' $\alpha$  cellulose et du papier whatman. La cellulose microcristalline, quant à elle, se démarque par une composition plus élevée en  $I_{\alpha}$ . D'après Hayashi et al. (1998), ces deux phases présentent des susceptibilités enzymatiques différentes. Cependant, la digestibilité des échantillons étudiés ne semble pas être liée à la composition en allomorphes  $I_{\alpha}$  et  $I_{\beta}$ .

### 3.2. Morphologie des fibres

Plusieurs études ont tenté de déterminer la nature des caractéristiques structurales affectant l'hydrolyse de substrats organiques particuliers. D'après Eriksson et al. (2002), la surface spécifique et la taille des particules de cellulose constituent des paramètres importants du substrat déterminant les taux initiaux d'hydrolyse dans des conditions anaérobies. Palmowski and Müller (2003) ont mis au point un modèle cinétique intégrant la surface spécifique des particules lors d'une dégradation anaérobie : ils ont trouvé que le taux d'hydrolyse était principalement corrélé à la surface spécifique de l'échantillon. De même, Lee and Fan (1982) ont démontré que la susceptibilité de la cellulose à l'hydrolyse est largement déterminée par l'accessibilité de la surface de la cellulose aux enzymes hydrolytiques. Au cours de cette étude, nous avons voulu déterminer si la morphologie ainsi que la surface des fibres constituent des paramètres influençant les taux d'hydrolyse des particules. Les données suivantes (Tableau 18) ont été mesurées par l'ALPAGA 500 NANO (OCCHIO, Liège, Belgique) qui constitue un système d'analyse granulométrique et morphologique de poudres.

**Tableau 18 Caractéristiques physiques (diamètre, largeur, longueur et surface des particules) de celluloses commerciales**

Cellulose	Dimension moyenne des particules <sup>a</sup> (µm)			
	Diamètre	Largeur	Longueur	Surface
α cellulose	15.7	18.9	59.3	1226.3
Cellulose médium	13.1	19.7	74.1	1309.3
Cellulose 20 µm microcristalline	10.0	10.0	20.2	233.8

<sup>a</sup> mesurés sur environ 2200 (α cellulose), 4100 (cellulose medium) et 15700 (cellulose 20 µm) particules

Pour rappel, après 48 heures de digestion enzymatique, le taux de cellulose hydrolysée dans les échantillons d'α cellulose, cellulose médium et cellulose microcristalline sont respectivement de 90 %, 45 % et 80 % (Figure 21). Nous nous attendions à ce qu'une augmentation de la surface des particules provoque une augmentation du taux d'hydrolyse de la cellulose. Les données montrent cependant que l'aire ou la morphologie des particules ne constitue pas un paramètre affectant significativement l'hydrolyse enzymatique de ces trois poudres de cellulose.

Etant donné qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de techniques permettant d'isoler la cellulose des bois sans en modifier ses propriétés physicochimiques, la technique utilisée ci-dessus pour déterminer la morphologie des poudres de cellulose n'a pu être appliquée sur les bois. Afin de déterminer l'impact de la surface des fibres de cellulose sur sa susceptibilité à la dégradation enzymatique, les échantillons de bois (bois fossiles de Florennes et Onhaye, *Metasequoia*) ont donc été réduits à une faible granulométrie (taille des particules inférieures à 425 µm). En effet, le contact entre les molécules de l'enzyme et la surface de la cellulose est un prérequis à l'hydrolyse. Une grande surface spécifique aurait tendance à augmenter l'accessibilité des molécules d'enzymes sur le substrat (Lee and Fan, 1982). Dans le cas des bois actuels, l'augmentation de la surface spécifique résulte en une augmentation du taux d'hydrolyse tandis qu'elle est sans effet sur la digestion des substrats fossiles (taux d'hydrolyse de 3 % pour Florennes et 1 % pour Onhaye, [Tableau 12](#)). Ces données montrent que le potentiel d'évolution des bois fossiles est nul dans leur état natif et très faible s'ils sont broyés. L'accessibilité de la cellulose des bois fossiles n'est donc que peu affectée par l'augmentation de la surface spécifique des échantillons. Cela est probablement dû à la nature hétérogène de ces matériaux et la contribution des autres composantes comme la lignine.

#### **4. Influence des extraits sur la bioaccessibilité de la cellulose**

Une des hypothèses de travail de cette thèse se base sur l'effet protecteur que les extraits de bois fossiles pourraient exercer sur la biodégradation de la cellulose des bois et ce, par exemple, par l'inactivation des enzymes responsables de la dégradation de la cellulose. En effet, certains extraits ou composés phénoliques présents dans des bois résistant à la dégradation sont toxiques à certains champignons et autres microorganismes (Schultz and Nicholas, 2000; Pohjamo et al., 2003). Trois tests différents ont ainsi été réalisés afin de mettre en évidence l'importance du rôle des extraits de bois dans la préservation de la cellulose. Le premier test est un test *in vivo* de dégradation enzymatique des bois dont les composés extractibles ont été au préalable éliminés. Le deuxième test consiste en une simulation *in vitro* de la dégradation enzymatique de cellulose pure en présence d'extraits de bois. Le troisième test a été quant à lui réalisé en présence de microorganismes anaérobies facultatifs.



#### 4.1 Digestion enzymatique de bois avec et sans extraits (Test 1)

Afin de vérifier si la résistance de la cellulose, et donc des bois fossiles, à la dégradation est due à la présence des extraits dans les bois, ceux-ci ont été préalablement traités au cours d'une extraction benzène/éthanol/eau dans un dispositif soxhlet afin d'en éliminer tous les extraits (ASTM D1105-96, 2007).

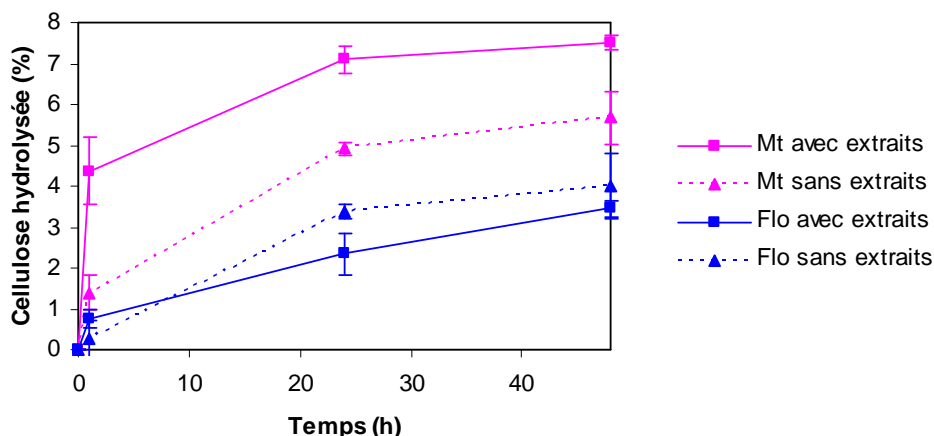
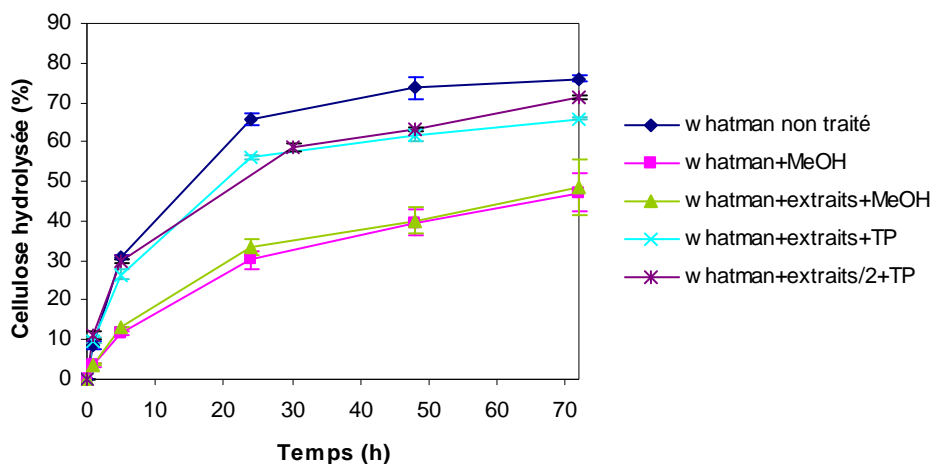


Figure 27 Evolution du taux d'hydrolyse de la matière cellulosique présente dans différents bois (*bois fossile de Florennes Flo* et *Metasequoia Mt*) avec et sans extraits suite à la dégradation par le mélange enzymatique (activité cellulolytique 352 mUI/ml)

La comparaison par rapport aux bois non-traités nous montre une diminution du taux d'hydrolyse dans le bois de *Metasequoia* tandis que celui de Florennes ne varie pas par rapport au témoin (Figure 27). Il est extrêmement difficile d'étudier *in vivo* l'impact d'un seul composé sur la bioaccessibilité de la cellulose. En effet, la probabilité que les composés susceptibles d'assurer la protection de la cellulose agissent par effets cumulés est particulièrement forte. Le fait d'éliminer les extraits dans les bois, puis de soumettre ceux-ci à une dégradation enzymatique, ne nous a pas permis de détecter le pourcentage d'inhibition que les extraits pourraient exercer. Ce résultat est tout à fait compréhensible si le phénomène d'effets cumulés, impliquant une action inhibitrice beaucoup plus importante d'un autre composé, est pris en compte. L'objectif étant de quantifier l'activité d'inhibition des extraits des bois, deux moyens indirects ont été développés au cours de ce chapitre.

## 4.2 Inhibition de l'activité enzymatique par les extraits de bois (Test 2)

Par rapport à des tests réalisés en présence de bactéries ou des champignons, ce deuxième test (*cf.* Section 4.3.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*) est un moyen rapide de vérifier *in vitro* le pouvoir protecteur des extraits de bois face aux enzymes cellulolytiques. Afin de vérifier si la cellulose reste accessible aux enzymes cellulolytiques sous l'effet protecteur des extraits de bois, un substrat pur de cellulose a été dégradé en présence d'extraits de bois fossile de Florennes. Un premier test a été réalisé en mettant en présence 50 mg de papier whatman n°1, 4 ml de mélange enzymatique et 0.5 ml d'extraits. Ces extraits sont obtenus par extraction benzène/éthanol de 2.5 g de bois fossile de Florennes (*cf.* Section 3.3 du chapitre *Matériels & Méthodes*), déshydratation et remise en suspension par la suite dans 7.5 ml du solvant choisi (méthanol 100 % ou tampon phosphate pH 5.5). Après homogénéisation des échantillons, ceux-ci sont incubés sous agitation à 40°C.



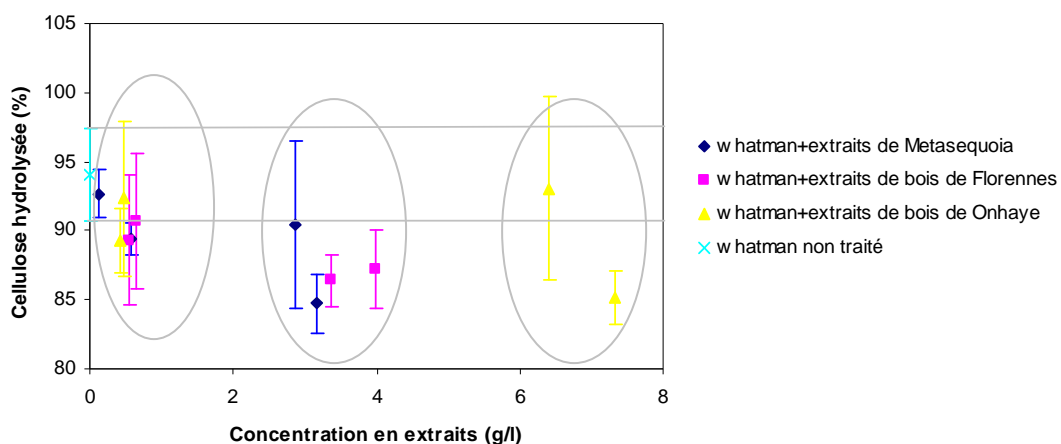
**Figure 28** Evolution du taux d'hydrolyse de la matière cellulosique présente dans du papier whatman suite à la dégradation par le mélange enzymatique (activité cellulolytique 292 mUI/ml) et 0.5 ml d'extraits de bois fossiles de Florennes repris dans du méthanol (MeOH) ou du tampon phosphate (TP).

La [figure 28](#) reprend les taux d'hydrolyse de la cellulose du papier whatman en présence des extraits du bois de Florennes solubilisé dans différents solvants. L'accessibilité de la cellulose diminue de 30 % lorsque le solvant est le méthanol. Toutefois, un témoin ne contenant que le méthanol, le papier whatman et le mélange enzymatique nous montre que la forte décroissance de l'activité enzymatique est liée à la présence du solvant organique.

Afin de vérifier cette explication, les extraits ont été suspendus dans un tampon phosphate pH 5.5, tampon constitutif du mélange enzymatique. La [figure 28](#) montre une inhibition de 10 % avec la concentration testée. L'inhibition importante obtenue préalablement était donc due à l'action combinée du solvant organique et des extraits.

Un deuxième test a été réalisé avec une concentration deux fois plus faible en extraits que lors du premier test. Dans ce cas, les extraits provoquent toujours une action inhibitrice mais plus limitée (5 %). Par conséquent, la résistance de la cellulose à la dégradation pourrait être due à la concentration en composés extractibles. Une répétition de l'expérience avec des concentrations définies en extraits ainsi que des extraits d'essences différentes a été réalisée afin de confirmer cette hypothèse.

Pour ce troisième test, le substrat (50 mg de papier whatman) a été mis en présence de 4 ml de mélange enzymatique et 0.5 (ou 0.25 dans le cas du bois de Onhaye) ml d'extraits dilués dans du tampon phosphate pH 5.5. Ces extraits proviennent de l'extraction benzène/éthanol des extraits des bois fossiles Florennes, Onhaye et *Metasequoia* mis en suspension dans 8.5 ml de tampon phosphate pH 5.5.



**Figure 29** Pourcentage de cellulose hydrolysée après 48 heures d'incubation du papier whatman en présence du mélange enzymatique (activité celluloytique 498 mUI/ml) et de différentes concentrations en extraits de bois

Au cours de cette expérience ([Figure 29](#)), les substrats de cellulose pure ont été mis en contact avec des concentrations en extraits proches et supérieures à celles présentes dans les bois naturels. La teneur en extraits dans le bois fossile de Florennes et *Metasequoia* est

respectivement de 5.3 % et 3.45 %. Le premier groupe de points correspond à des concentrations d'environ 5% (w/v) en extraits, soit des concentrations proches de celles dans les bois étudiés. Ce groupe ne présente pas de grande différence par rapport aux témoins. Il semblerait donc qu'à des concentrations proches de celles présentes dans la nature, les extraits de bois n'exercent pas d'inhibition de l'activité des cellulases. Le deuxième groupe de points (*Metasequoia* et bois fossile de Florennes) présente quant à lui des concentrations 4 fois supérieures à celles présentes dans la nature, soit environ 25% (w/v) en extraits et montre des signes d'inhibition vis-à-vis des cellulases. Cette observation est identique pour le dernier groupe (bois fossile d'Onhaye).

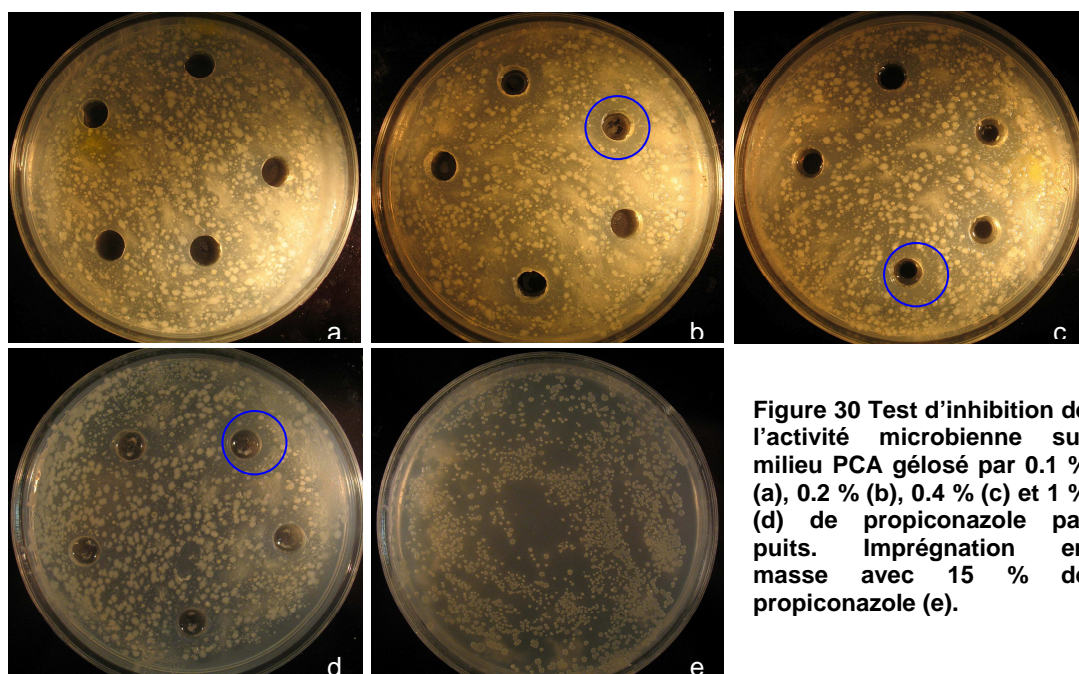
Ces résultats montrent une inhibition de l'activité des enzymes cellulolytiques comprise entre 3 et 7 %. Ce résultat peut signifier que des complexes enzymes/extraits se sont formés et empêchent une partie des enzymes de dégrader la cellulose ou que certains extraits se sont complexés sur la cellulose et empêchent les enzymes d'accéder à ces sites. Toutefois, la teneur en extrait, telle que présente dans la nature, ne semble pas être la cause principale de l'inhibition de la dégradation cellulosique. De plus, étant donné qu'aucune différence marquante n'est observée entre les résultats obtenus pour *Metasequoia* et les bois fossiles, nous pouvons supposer que la structure des composés constituant les extraits dans les bois fossiles n'a pas évolué.

#### **4.3 Inhibition de l'activité microbienne par les extraits de bois (Test 3)**

Ce deuxième test indirect d'inhibition (*cf.* Section 4.3.3 du chapitre *Matériels & Méthodes*) a été développé afin de vérifier si les extraits de bois ont une action inhibitrice sur le développement de bactéries habituellement impliquées dans les processus de biodégradation. Ce consortium de bactéries provient d'un bioréacteur de digestion anaérobie des boues activées d'une station d'épuration des eaux municipales (*cf.* Section 4.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*). Une culture sur milieu gélosé riche (*cf.* Section 4.4 du chapitre *Matériels & Méthodes*) a mis en évidence neuf types différents de microorganismes majoritaires en fonction des caractéristiques macroscopiques des colonies.

#### 4.3.1. Validation du test en présence d'un biocide

Afin de valider les tests d'inhibition de la croissance bactérienne par les extraits de bois, le test a tout d'abord été réalisé avec un biocide, le Xylamon, contenant un substrat actif appelé le propiconazole (Figure 30). Ce test se base dans un premier temps sur l'utilisation de puits creusés dans une gélose comme réservoir contenant les solutions du biocide à examiner. Les concentrations en principe actif, dilué dans de l'eau désionisée, testées sont 0.1 %, 0.2 %, 0.4 % et 1%. Dans un second temps, le biocide est imprégné sur toute la surface de la gélose à raison de 15 % de propiconazole (cf. Section 4.3.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*).

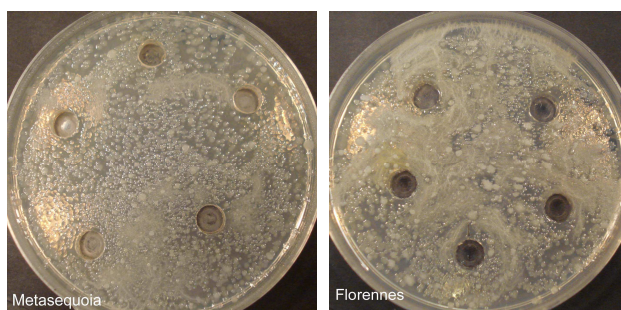


Pour cette expérience, le témoin positif, le propiconazole, joue correctement son rôle de témoin avec une inhibition de la croissance des microorganismes mise en évidence par des zones d'inhibition relatives autour de chaque puits (Figure 30, b-d). De faibles concentrations en propiconazole permettent d'inhiber le développement des bactéries bien que l'effet de celui-ci soit restreint par la diffusion limitée dans le milieu gélosé. Il semble toutefois qu'une imprégnation en masse du propiconazole à forte concentration (Figure 30, e) ne permet pas une inhibition totale de la croissance des microorganismes.

#### 4.3.2. Test avec les extraits de bois

La même expérience a été réalisée avec des extraits de bois. Les concentrations des solutions en extraits injectées dans les puits sont de 6 % pour le bois fossile de Florennes et 3.5 % pour *Metasequoia* (cf. Section 4.3.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*).

**Figure 31** Test d'inhibition de l'activité microbienne sur milieu PCA gélosé par des extraits de *Metasequoia* (3.5 %) et de bois fossile de Florennes (6 %)



La [figure 31](#) montre que les extraits de bois n'ont aucune action inhibitrice sur les microorganismes ensemencés et ce dans les concentrations en extrait proches de celles présentes dans les bois. Aucune zone d'inhibition n'apparaît comme sur la [figure 30](#). Toutefois, ces résultats sont à traiter avec un certain recul. En effet, ce test ne permet pas d'extrapoler les conditions réellement présentes dans la nature car il ne peut reproduire totalement les liaisons chimiques existant entre les extraits et la matrice du bois.

## 5. Influence de la lignine sur la bioaccessibilité de la cellulose

Les tests enzymatiques réalisés précédemment tendent à montrer que la cellulose des bois fossiles n'est plus biodisponible. Ce mécanisme de préservation sélective des polysaccharides pourrait être lié aux caractéristiques de la lignine. Cette dernière est en effet connue pour son action inhibitrice de la dégradation des polysaccharides (Barghoorn, 1952), probablement en les protégeant des hydrolases extracellulaires (Crawford, 1981). Les premières analyses montrent d'une part que les pourcentages de lignine de Klason (TAPPI, 1974) mesurés dans la plupart des échantillons fossiles se situent entre 40 et 60 % ([Tableau 10](#)). D'autre part, les analyses chimiques (dosage chimique de la lignine solubilisée) et physico-chimiques (RMN  $^{13}\text{C}$  de l'état solide) confirment les hypothèses développées précédemment, à savoir une modification de la structure ligneuse.

En règle générale, l'effet de la lignine sur la bioaccessibilité des polysaccharides des parois cellulaires est plutôt vu comme une restriction physique (Stinson and Ham, 1995), avec les molécules de lignine réduisant la surface spécifique accessible à la pénétration enzymatique et son activité (Haug, 1993). La lignine pourrait donc constituer un obstacle important à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose qu'il faut pouvoir surmonter soit par élimination, soit par modification de l'organisation structurale du complexe lignocellulosique.

Ce dernier chapitre de la thèse va tenter d'élucider l'influence des composés ligneux sur la non-biodégradabilité de la cellulose des bois fossiles. Trois parties vont être considérées. La première se concentre sur la caractérisation de la structure de la lignine des bois fossiles. La deuxième étudiera la biodégradabilité de la matière après élimination et/ou modification artificielle de la lignine. Enfin, la troisième partie se focalisera sur la caractéristique inhibiteur de certains monomères de la lignine.

### **5.1. Caractérisation de la structure de la lignine des bois fossiles de Florennes**

Au cours des expérimentations de digestion enzymatique et des analyses chimiques précédemment réalisées sur les bois fossiles de Florennes, il est apparu que la lignine de ces bois avait vraisemblablement subi des transformations chimiques. Par conséquent, une étude plus approfondie de la structure de la lignine au sein des bois fossiles de Florennes a été entreprise. Trois techniques spécifiques de caractérisation de la lignine ont été utilisées : la résonance magnétique nucléaire CPMAS  $^{13}\text{C}$  de l'état solide (CPMAS  $^{13}\text{C}$  RMN), la Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la chromatographie liquide avec analyse spectrophotométrique dans l'UV (280 nm) des composés d'oxydation de la lignine obtenus par une hydrolyse alcaline au CuO. L'analyse par FTIR des bois fossiles de Florennes et de *Metasequoia* a déjà été développée au point 1.3.2 et a montré des différences de structure de la lignine entre ces deux bois.

### 5.1.1. CPMAS $^{13}\text{C}$ RMN

L'examen des structures de bois fossile de Florennes par microscopie nous a révélé que le stade de fossilisation des bois était celui de la *peatification* ou turbification (*cf.* Section 1.1.2). Au cours de la turbification des bois, la lignine subit très peu d'altérations chimiques (Stout et al., 1988 ; Hatcher et al., 1989a). Par contre, lorsque la matière évolue vers une structure ligniteuse (étape préliminaire à la transformation en charbon), différentes études (Venkatesan et al., 1993 ; van Bergen et al., 1994 ; Orem et al. 1996 ; Hatcher and Clifford, 1997) ont montré que plusieurs transformations chimiques peuvent se dérouler au sein de la structure ligneuse. Les principales réactions sont décrites dans l'introduction de la thèse au point 3.2.

Une comparaison détaillée des spectres CPMAS  $^{13}\text{C}$  RMN du bois moderne de *Metasequoia* et du bois fossile de Florennes dans la région située entre 100 et 160 ppm, et à 56 ppm nous a fourni des indices importants sur les trois principales transformations chimiques subies par la lignine au cours de sa fossilisation.

- Réaction n°1 : Hydrolyse des groupements méthoxyles

L'aire des pics pour les atomes de carbone des différents composés organiques des bois actuels et fossiles est reprise dans le [tableau 19](#) comme le pourcentage de l'aire totale sous le spectre  $^{13}\text{C}$  RMN (représentant la totalité des carbones organiques dans les échantillons). Le nombre moyen de groupements méthoxyles et de substituants oxygénés (liens aryle-ether) par cycle aromatique ont été calculés en intégrant les pics à 56 ppm et 148 ppm, respectivement, en les normalisant à l'aire totale des carbones aromatiques (100 – 160 ppm) et en les multipliant par 6 (Bates and Hatcher, 1989). Il est également nécessaire d'ajuster les données en éliminant la superposition des signaux des carbones appartenant aux polysaccharides à 106 ppm (Atalla et al., 1988).



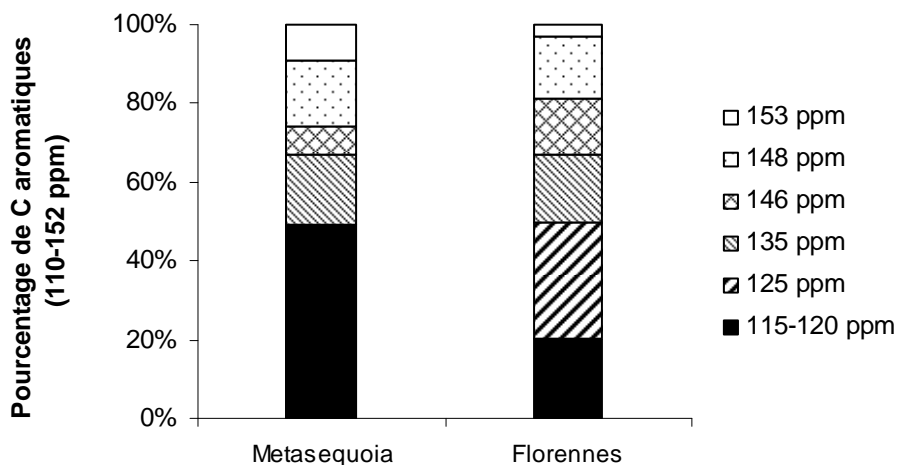
**Tableau 19 Distribution des carbones carbohydrates, aliphatiques et aromatiques dans les bois de *Metasequoia* et de Florennes (pourcentage de l'aire totale des carbones organiques)**

	<i>Metasequoia</i>	Bois fossile de Florennes
Carbones carbohydrates (%)	76.0	53.9
Carbones aliphatiques (%)	-	17.2
Carbones aromatiques (%)	19.5	24.0
-OCH <sub>3</sub> /cycle	1.4	1.2
Aryl-O/cycle	1.0	0.9

Bien qu'en des proportions différentes par rapport au bois moderne, la lignine du bois fossile de Florennes montre des signaux caractéristiques à 56 ppm pour les carbones méthoxyles et entre 100 - 160 ppm pour les structures aromatiques. Par comparaison à la lignine du *Metasequoia*, le nombre moyen de groupements méthoxyles par cycle aromatique (OCH<sub>3</sub>/cycle) diminue légèrement dans le bois fossile, indiquant un changement progressif dans la nature de la lignine (Tableau 19). D'après Hatcher et al. (1989a), cette perte en groupements méthoxyles peut être expliquée par des réactions de déméthylation ou déméthoxylation progressives de la lignine, résultant en des proportions croissantes de structures de type catéchol. Cependant, dans notre cas, étant donné que le nombre de substituants oxygénés par cycle (Aryl-O/cycle) ne varie pas significativement entre les bois modernes et fossiles (Tableau 19), la déméthoxylation ne semble pas jouer un rôle important dans l'altération de la lignine.

- Réaction n°2 : Clivage des liens  $\beta$ -O-4'

Les résonances à 153 et 148 ppm dans la région aromatique sont attribuables à des carbones aromatiques substitués par un oxygène (Nimz et al., 1981). Spécifiquement, elles sont dues aux carbones C-3 et C-4 des unités guaiacyles avec tous les liens  $\beta$ -O-4' (liens aryle-O) toujours intacts (Bates and Hatcher, 1989). Cette résonance subit un déplacement à 146 ppm lorsque les liens  $\beta$ -O-4' sont hydrolysés, entraînant ainsi la formation de phénols libres et une augmentation de l'intensité du signal à 146 ppm. Soulignons que la résonance à 146 ppm est également assignée aux Aryle-O-carbones dans les structures catéchols (Hatcher et al., 1989b).



**Figure 32** Distribution des carbones aromatiques caractéristiques de la lignine du bois moderne *Metasequoia* et du bois fossile de Florennes. Les pourcentages sont calculés en intégrant les aires des pics à 115-120 ppm, 125 ppm, 135 ppm, 146 ppm, 148 ppm et 153 ppm, et normalisés à l'aire totale des carbones aromatiques

La diminution de l'intensité relative des résonances à 153 et 148 ppm dans le bois fossile de Florennes (Figure 32) suggère que l'étendue des liens  $\beta$ -O-4' des monomères de la lignine s'appauvrit par rapport aux bois modernes. D'autre part, l'augmentation du signal à 146 ppm indique la formation de groupements phénoliques libres. Ces transformations résultent en la formation de structures catéchols absentes dans les gymnospermes modernes (Hatcher et al., 1989a-b), ce qui pourrait expliquer la non-réactivité de la lignine résiduelle du bois fossile au traitement au triéthylèneglycol (cf. Section 1.2.1).

- Réaction n°3 : Alkylation des structures catéchols

L'intensité des pics à 135 ppm correspond à la contribution des carbones C-1 des unités guaiacyles. Par comparaison au bois moderne de *Metasequoia*, la résonance à 135 ppm ne varie pas dans le spectre du bois fossile de Florennes, ce qui suggère que les liens C-1 alkyles ont été maintenus (Figure 32). Dans la lignine des gymnospermes modernes, le pic à 115 ppm résulte de la superposition d'un signal dominant à 115 ppm (C-2 et C-5 des unités guaiacyles) et un signal à 120 ppm (C-6 des mêmes structures) (Bates et al., 1991). Même si l'intégrité structurale de la lignine semble être fragilisée, la diminution de l'intensité de la résonance à 115-120 ppm et l'apparition d'une nouvelle résonance à 125 ppm

résultant d'un déplacement de la résonance à 120 ppm, indique que les structures guaiacyles condensées déjà présentes dans la lignine moderne sont également présentes dans la lignine du bois fossile. Toutefois, l'émergence de ce nouveau signal contenant aussi bien des composantes protonées et non protonées montre que d'autres types de liaisons se sont créés au sein de la lignine des bois fossiles.

### 5.1.2. Analyse des produits d'oxydation de la lignine

Une méthode relativement simple de caractérisation de la lignine est une dégradation oxydative en présence de CuO en milieu alcalin (Kögel and Bochter, 1985). Cette oxydation relativement douce mène premièrement à des phénols simples tandis que les structures ligneuses condensées ne sont pas attaquées.

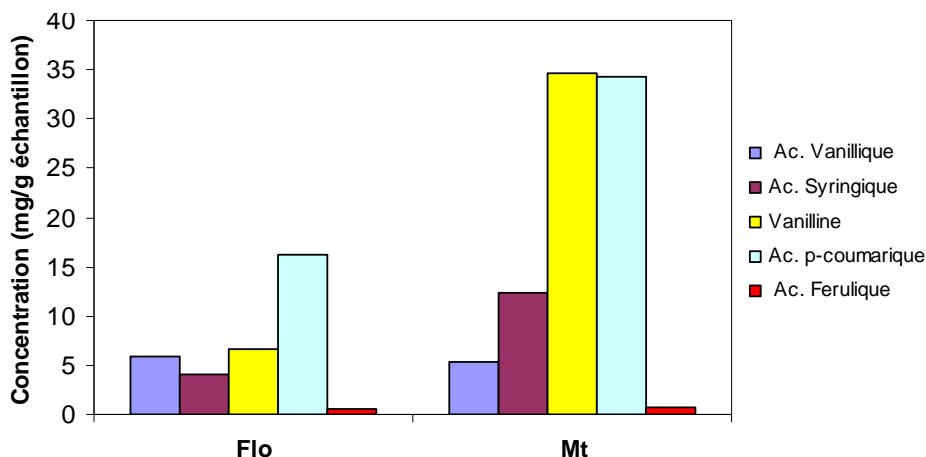


Figure 33 Produits d'oxydation de la lignine du bois fossile de Florennes (Flo) et de *Metasequoia* (Mt) après dégradation alcaline au CuO. Les résultats sont exprimés en milligramme de composé par gramme d'échantillon

La figure 33 nous montre que les structures non condensées habituellement présentes dans la lignine ont subi des modifications importantes dans le bois fossile de Florennes. En effet, les quantités d'acide syringique, de vanilline et d'acide *p*-coumarique libérables ont fortement diminué dans la lignine du bois fossile par comparaison à celle de *Metasequoia* (perte de 60%, 80% et 50% respectivement). La somme des composés phénoliques a été définie par Kögel (1986) comme l'addition des composés V (vanilline et acide vanillique), S (acide syringique) et C (acide *p*-coumarique et acide ferulique). Dans le cas des bois de Florennes et *Metasequoia*, elle équivaut à 33 et 87 mg/g respectivement. Comme l'oxydation n'attaque que les phénols simples et non les structures condensées et que des

quantités de phénols simples libérés sont plus faibles dans la lignine des bois fossiles, nous pouvons déduire qu'une partie assez importante (60%) des structures non condensées originelles de la lignine du bois fossile de Florennes a été éliminée ou transformée au cours du processus de fossilisation. Etant donné les résultats obtenus lors du dosage de la lignine dans les échantillons de bois (*cf.* Section 1.2), nous pouvons supposer que, toutes proportions respectées, les structures condensées de la lignine dans le bois fossile doivent être présentes en plus grande quantité que dans le bois moderne.

## **5.2. Essais de délignification et leur impact sur la bioaccessibilité de la cellulose**

Dans la Chapitre 3, nous avons observé un manque de biodisponibilité de la cellulose des bois fossiles et ce, malgré des expériences réalisées sur des substrats pour lesquels la surface accessible aux enzymes avait été augmentée par un traitement de broyage. Cependant, la lignine et d'autres composés phénoliques présents dans les parois cellulaires peuvent créer une barrière de protection à la dégradation enzymatique et bactérienne des polysaccharides (Sewalt et al., 1997 ; Zhang et al., 2007), barrière qu'il faut pouvoir surmonter soit par élimination, soit par modification de l'organisation structurale du complexe lignocellulosique. Ce phénomène a entraîné le développement technique de prétraitements physiques, chimiques et biochimiques capables de réduire ces effets inhibiteurs à des fins industrielles. Le [tableau 20](#) présente une liste non-exhaustive des différentes méthodes de prétraitement des matériaux lignocellulosiques.

**Tableau 20 Description des principaux traitements de pulping**

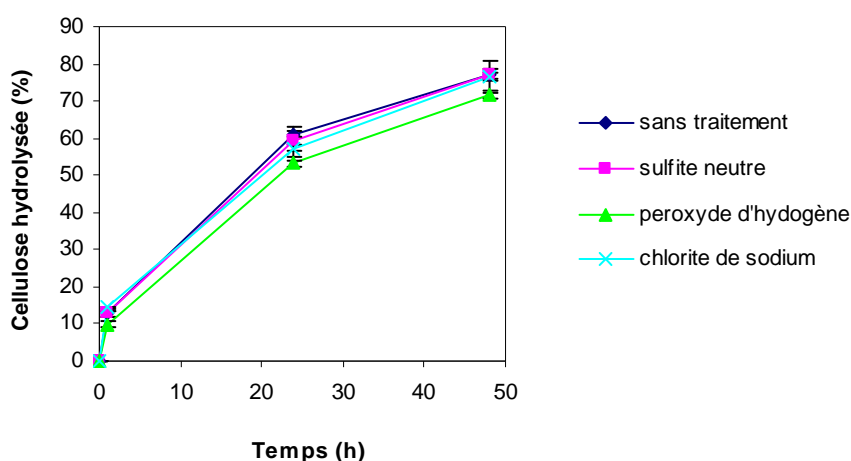
Méthode	Réactif	Référence
Traitement chimique	Kraft (NaOH, Na <sub>2</sub> S)	Baptista et al., 2008
	Sulfite (milieu acide)	Christov et al., 1998
	Bisulfite	Scott et al., 1995
	Sulfite (milieu alcalin)	Gumuskaya and Usta, 2006
	Soude (NaOH, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Jimenez et al., 2006
	Ethylèneglycol	Gharpuray et al., 1983
	O <sub>2</sub>	Negrutu et al., 1999
Traitement biochimique	Cl <sub>2</sub> , O <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub>	Mooney et al., 1998 Gould 1984 Binder et al., 1980
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Yaghoubi et al., 2008
	<i>Physisporinus rivulosus</i>	Hakala et al., 2005
Traitement physicochimique	<i>Trametes versicolor</i>	Archibald et al., 1997
	Entrainement à la vapeur	Cara et al., 2006

La sélection des traitements de délignification appliqués dans cette thèse a été réalisée sur la base de trois critères : la difficulté de mise en œuvre (en particulier pour les procédés suivants : Kraft, traitement à la soude, traitement biochimique), la perte en cellulose au cours du traitement (phénomène très marqué dans le cas des traitements au Cl<sub>2</sub> et O<sub>3</sub>) et la non-réactivité de la lignine des bois fossiles vis-à-vis des réactifs comme l'éthylèneglycol. Trois types de prétraitements ont donc été envisagés : la cuisson papetière au sulfite neutre, la délignification au peroxyde d'hydrogène et la délignification au chlorite de sodium.

L'objectif de ce chapitre est de déterminer si la structure de la lignine crée une barrière de protection importante à la dégradation enzymatique et quelle en est l'origine. Pour ce faire, des traitements de délignification ayant pour résultat la modification ou l'élimination de la structure ligneuse, ont été appliqués sur les bois étudiés. Afin de vérifier si ces modifications de structure ligneuse amélioreraient la bioaccessibilité de la cellulose, des tests enzymatiques ont ensuite été réalisés sur les bois. La détermination de l'origine de la barrière de protection exercée par la lignine nous a incités à déterminer les changements de structure survenus au cours des différents traitements de délignification et à établir une corrélation entre ces changements et la bioaccessibilité de la cellulose.

### 5.2.1. Validation des tests de délignification pour les tests ECD

Malgré une première sélection dans l'ensemble des traitements de délignification fournis par la littérature, aucune donnée n'a confirmé que les trois traitements sélectionnés ne modifient pas la structure du matériel cellulosique ou ne provoquent pas une diminution de la quantité de cellulose au sein des échantillons. Afin de valider la pertinence du choix des trois tests de délignification sélectionnés, des échantillons de cellulose pure (papier whatman n°1) délignifiés et non délignifiés ont été soumis à des tests enzymatiques. En effet,

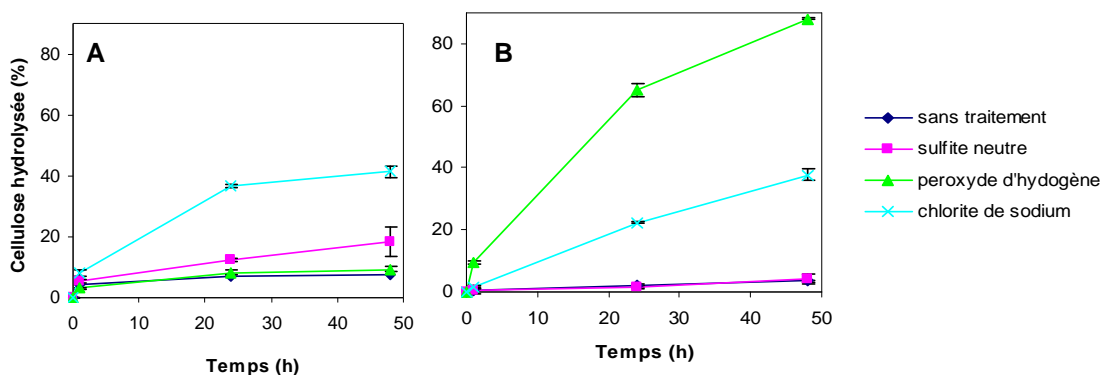


**Figure 34 Evolution du taux d'hydrolyse de la matière cellulosique présente dans du papier whatman traité et non traité par délignification suite à la dégradation par le mélange enzymatique**

Tous les échantillons montrent le même profil cinétique (Figure 34). Ce résultat nous permet de tirer trois conclusions. Premièrement, les différents traitements de délignification n'ont pas provoqué une diminution de la quantité de cellulose et donc, les variations du taux de cellulose hydrolysée dans les expériences sur les bois fossile ne pourront être imputées qu'à la lignine. Deuxièmement, ils n'ont pas provoqué de changements de structure de la cellulose qui modifient sa biodisponibilité. Troisièmement, bien que ces différentes hydrolyses enzymatiques aient été réalisées avec des mélanges enzymatiques présentant des activités cellulolytiques différentes, les résultats restent comparables avec un taux de dégradation de la cellulose similaire à chaque temps d'incubation.

### 5.2.2. Etude de la bioaccessibilité de la cellulose du bois fossile de Florennes après traitement de délignification

Afin de vérifier si l'accessibilité enzymatique de la cellulose est modifiée par les différents traitements de délignification (cf. Section 6.2 du chapitre *Matériels & Méthodes*), des hydrolyses enzymatiques ont été réalisées sur les échantillons délignifiés. Les échantillons non traités et traités au peroxyde d'hydrogène ont été hydrolysés avec un mélange enzymatique dont l'activité cellulolytique est de 283,3 mUI/ml. Ceux traités au sulfite neutre et au chlorite de sodium ont été hydrolysés avec un mélange enzymatique de 490,5 mUI/ml d'activité.



**Figure 35** Evolution du taux d'hydrolyse de la matière cellulosique présente dans des échantillons de *Metasequoia* (A) et de bois fossile de Florennes (B) traité et non traité suite à la dégradation par le mélange enzymatique

La [figure 35](#) nous montre que le traitement au sulfite neutre permet d'améliorer légèrement (20%) l'accessibilité de l'enzyme au substrat cellulosique du *Metasequoia* alors qu'il n'a aucun effet sur la digestibilité enzymatique du bois de Florennes. En effet, le profil d'hydrolyse enzymatique du bois de Florennes non traité et traité au sulfite neutre nous montre que cette cellulose est toujours peu biodisponible (à peine 3% après 48h d'hydrolyse) malgré le traitement de délignification.

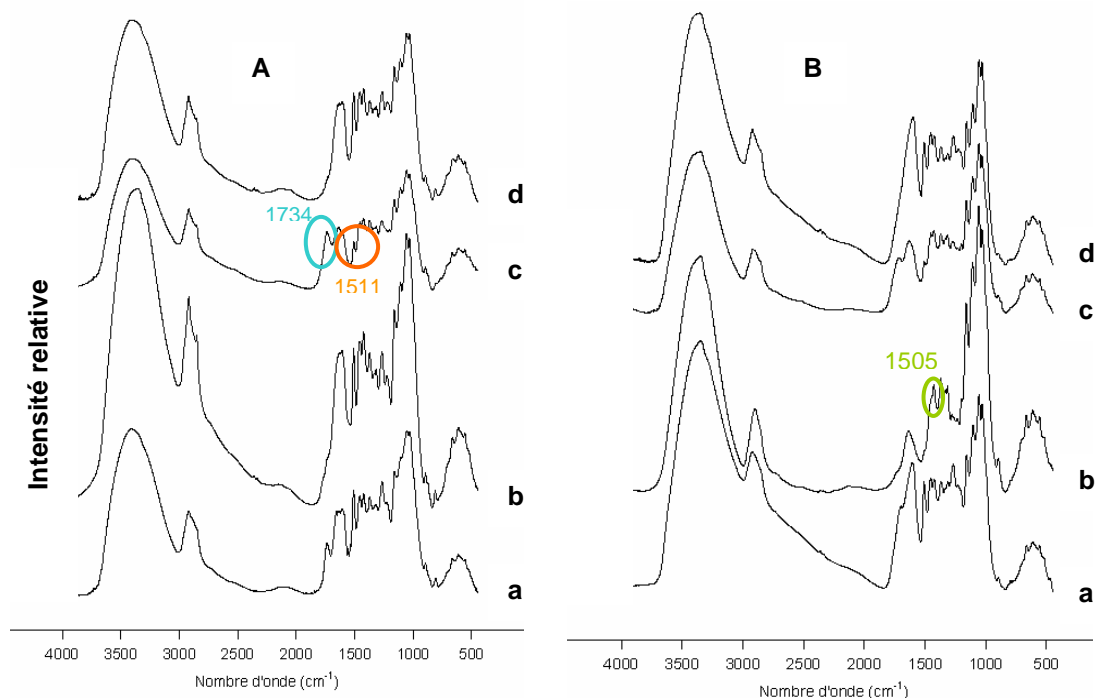
Le traitement le plus efficace pour le bois moderne est celui au chlorite de sodium pour lequel une augmentation de cellulose hydrolysable de 40 % est observée. Ce traitement a vraisemblablement provoqué des modifications importantes de structure au sein de la lignine ainsi qu'une élimination partielle de la lignine dans l'échantillon. Les modifications de structure de la lignine de *Metasequoia* ont été mises en évidence par les méthodes de caractérisation FTIR et HPLC, tandis que l'élimination a été confirmée par la mesure des pertes de masse lors des différents traitements de délignification (perte de masse de 15% lors du traitement au chlorite de sodium contre 5-10 % pour les deux autres traitements). Ce traitement a également augmenté la biodisponibilité du bois de Florennes (38% de cellulose hydrolysée). Ce résultat peut s'expliquer par une modification de la structure de la lignine et une destruction partielle de celle-ci au cours du traitement (perte de masse d'environ 40 % lors du traitement).

Le traitement au peroxyde d'hydrogène ne modifie pas quant à lui la biodisponibilité de la cellulose du *Metasequoia* : sa courbe se superpose avec celle de l'échantillon non traité. Par contre, ce traitement provoque une biodisponibilité du matériel cellulosique plus importante (88%) dans le bois fossile. Comme les pertes de masse obtenues suite à la délignification (perte de masse d'environ 60 %) et les hydrolyses enzymatiques l'ont montré, ce traitement a détruit presque totalement la lignine de l'échantillon facilitant ainsi la bioaccessibilité de sa cellulose. Les éventuelles modifications de structure de la cellulose et la lignine due aux différents traitements seront étudiées par la méthode de caractérisation des produits d'oxydation de la lignine suite à l'hydrolyse alcaline au CuO et par spectrométrie infrarouge.

### **5.2.3. Analyse de l'évolution des structures ligneuses du bois fossile de Florennes par FTIR et implication sur la bioaccessibilité de la cellulose**

L'application de traitements de délignification a provoqué des changements de structure au sein de la lignine qui ont amélioré la bioaccessibilité de la cellulose des bois. L'objectif de cette étude est d'établir une corrélation entre la structure de la lignine et la bioaccessibilité de cette cellulose, c'est-à-dire de comprendre quelles sous-structures ligneuses pourraient être impliquées dans ce phénomène.





**Figure 36** Comparaison des spectres FTIR du *Metasequoia* (A) et du bois fossile de Florennes (B) non délignifié (a), délignifié au peroxyde d'hydrogène (b), au chlorite de sodium (c), et au sulfite neutre (d)

Aucun changement de structure n'est constaté au sein de la structure ligneuse de *Metasequoia* et du bois de Florennes suite aux traitements de délignification au sulfite neutre (Figure 36, A et B). Alors que le traitement au peroxyde d'hydrogène n'a pas modifié la structure des biopolymères présents dans le bois moderne *Metasequoia*, le traitement au chlorite de sodium semble quant à lui avoir provoqué d'importantes modifications de structure au sein de la lignine. En effet, l'intensité de la bande d'absorption à  $1511\text{ cm}^{-1}$  diminue fortement au cours du traitement. Cela indique un changement significatif des vibrations C=C des noyaux aromatiques de la lignine (Pandey, 2005). Ce phénomène est accompagné d'une augmentation de l'intensité de la bande à  $1734\text{ cm}^{-1}$ , bande liée à la formation de nouvelles absorptions de groupements carbonyles.

Suite aux traitements au peroxyde d'hydrogène et au chlorite de sodium du bois fossile, une modification des structures au sein de la lignine et une perte d'intensité de certains signaux ( $1508$  et  $1465\text{ cm}^{-1}$ ) sont observées ce qui est confirmé par une augmentation des signaux ( $1152$  et  $1053\text{ cm}^{-1}$ ) associés à la cellulose des bois fossiles (Figure 36, B). D'après Faix

(1992), une augmentation des vibrations du squelette aromatique à  $1505\text{ cm}^{-1}$  pourrait être la conséquence de réactions de condensation au sein de la structure ligneuse. L'existence de telles structures serait confirmée par une forte absorption à  $1330\text{ cm}^{-1}$  et le déplacement des bandes à  $1245\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ . Dans le cas du bois fossile de Florennes, une diminution de l'intensité du signal à  $1505\text{ cm}^{-1}$  est observée ce qui, corrélé aux hypothèses de Faix, impliquerait une désagrégation des structures condensées. Ce postulat permettrait d'expliquer l'amélioration importante de la bioaccessibilité de la cellulose lors de ces deux traitements de délignification (cf. Section 5.2.2).

#### 5.2.4. Analyse de l'évolution des produits d'oxydation de la lignine du bois fossile de Florennes et implication sur la bioaccessibilité de la cellulose

La technique de spectrométrie infrarouge nous ayant fourni des informations sur la structure générale de la lignine, il nous manquait des informations sur les structures non condensées présentes dans la lignine. En effet, la présence de telles structures au sein de la lignine des bois fossiles pourrait constituer un début d'explication à la protection exercée par la lignine.

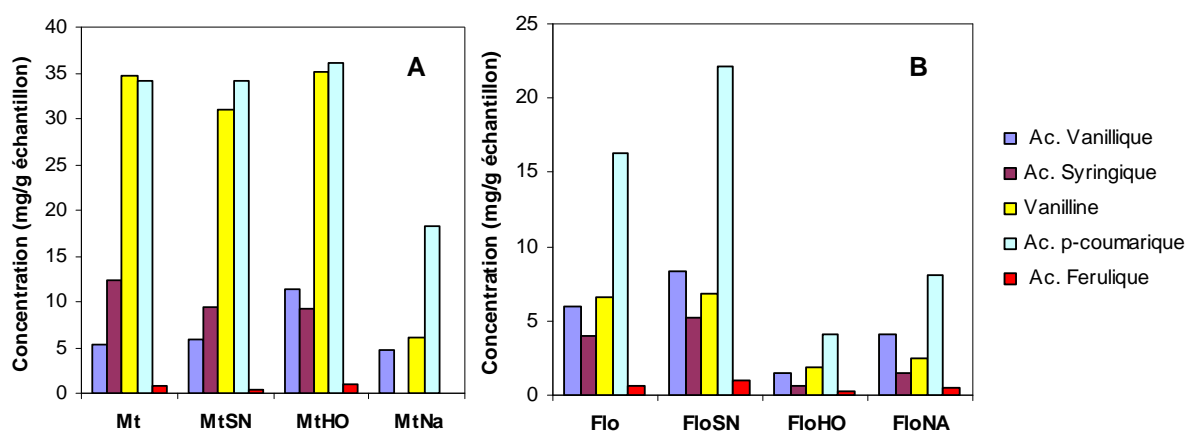
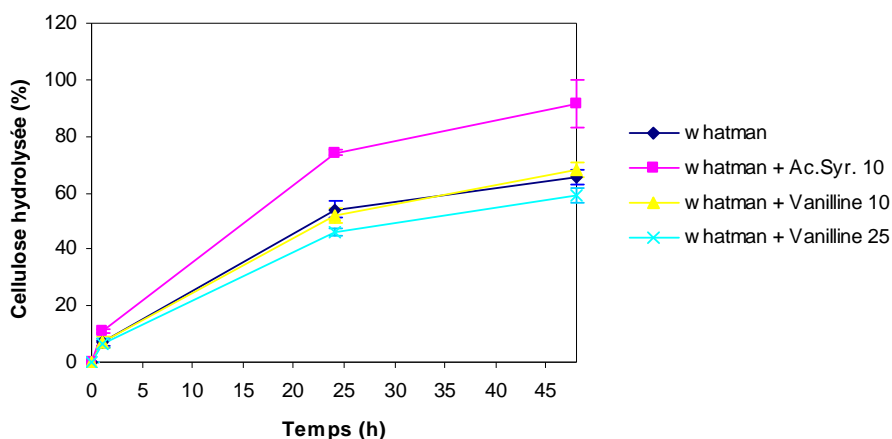


Figure 37 Produits d'oxydation de la lignine de *Metasequoia* (A) et du bois fossile de Florennes (B) non délignifiés (Mt, Flo) et délignifiés au sulfite neutre (SN), au peroxyde d'hydrogène (HO) et au chlorite de sodium (Na). Ces résultats ont été obtenus après dégradation alcaline au CuO et sont exprimés en milligramme de composé par gramme d'échantillon.

Dans le cas du *Metasequoia* (Figure 37, A), la vanilline et l'acide syringique semblent jouer un rôle important puisque plus leur concentration diminue dans l'échantillon et plus la cellulose de celui-ci est accessible aux enzymes. Par exemple, le traitement au chlorite provoque le plus de modifications de structure au sein de l'échantillon ce qui entraîne une biodisponibilité beaucoup plus importante de la cellulose. Dans le cas du bois fossile de Florennes (Figure 38, B), les concentrations des composés d'oxydation ont diminué fortement au cours des traitements au peroxyde d'hydrogène et au chlorite de sodium, ce qui pourrait expliquer l'augmentation importante de la bioaccessibilité de la cellulose de ces échantillons. Le traitement au sulfite pour lequel aucune variation de la quantité de cellulose hydrolysée n'avait été observée par rapport au témoin, n'a pas subi de modifications structurales au cours du traitement. Tous ces résultats montrent que plus des modifications structurales de la lignine sont importantes, plus l'hydrolyse enzymatique de la cellulose est favorisée.

### 5.3. Tests ECD *in vitro* sur des monomères de lignine

Une des hypothèses de travail de ce projet se base sur l'effet protecteur que la lignine de bois fossiles pourraient exercer sur la biodégradation de la cellulose des bois et ce, par exemple, par l'inactivation des enzymes responsables de la dégradation de la cellulose. Un moyen indirect et rapide de vérifier *in vitro* le caractère inhibiteur de la lignine de bois face aux enzymes cellulolytiques est d'incuber un substrat de cellulose pure en présence de monomères de lignine. Pour cette expérience, les monomères ont été sélectionnés en fonction des résultats obtenus dans la section 5.2.4, résultats pour lesquels l'élimination de certains monomères lors de la délignification pourrait favoriser la dégradation enzymatique de la cellulose des bois.



**Figure 38** Evolution du taux de cellulose hydrolysées d'un substrat de papier whatman mis en contact avec environ 10 mg d'acide syringique, 10 mg de vanilline et 25 mg de vanilline, et ce, pendant 48 heures d'incubation dans le mélange enzymatique (activité cellulolytique 321mUI/ml)

A partir d'une certaine concentration (25 mg de vanilline/50 mg de papier whatman dans 4 ml de mélange enzymatique), la vanilline a un effet inhibiteur sur la dégradation du mélange enzymatique (Figure 38). Un essai supplémentaire avec des concentrations supérieures en vanilline a révélé la même tendance. Par contre, l'acide syringique et l'acide p-coumarique ont un effet activateur.

## **Chapitre IV : Conclusions & Perspectives**

Ce projet de recherche s'articule autour de la découverte de fragments de bois fossiles du Miocène (20 millions d'années), ayant pratiquement l'aspect de bois récents, dans des karsts de l'Entre-Sambre-et-Meuse (ESEM, Belgique). Cette découverte soulève en effet de nombreuses questions quant à la préservation exceptionnelle de la matière organique les constituant et surtout l'origine de la résistance de celle-ci à toutes tentatives de dégradation par des microorganismes et des champignons. Ce phénomène de préservation est d'autant plus curieux qu'en règle générale, la plupart des phénomènes de fossilisation de la matière organique végétale favorisent la dégradation complète des polysaccharides après un court intervalle de temps géologique (Hedges et al., 1985). De plus, et pour mieux souligner la particularité de cette thèse, une des propriétés la plus connue et la plus largement exploitée des composés cellulosiques est leur capacité à se dégrader rapidement en présence d'une flore microbienne (Lynd et al., 2002). Ce travail de recherche s'inscrit donc dans le cadre de l'étude de la nature des biomolécules présentes dans ces bois fossiles de l'ESEM et plus particulièrement dans l'étude de la non-biodégradabilité de leur contenu lignocellulosique.

La première partie du travail nous a permis de cerner la nature exacte du matériel étudié. La caractérisation paléobotanique des bois fossiles de notre xylothèque a mis en évidence quatre types morphologiques différents : *Juniperoxylon pachyderma/Taxodioxylon gypsaceum*, *Pinuxylon*, *Piceoxylon pseudotsuga* et *Quercus robur*. Après de multiples recoupements, les bois de *Metasequoia*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii* (Douglas) et *Quercus robur* (Chêne) ont été choisis comme les essences actuelles les plus proches. Cette étude nous a également montré que le stade de fossilisation des fragments de bois de l'ESEM était celui de la turbification, c'est-à-dire un mode de fossilisation pour lequel très peu de modifications macroscopiques de la structure des tissus végétaux et de la nature des biomolécules présentes dans ces tissus sont constatées (Stout et al., 1989). Il n'a pas semblé nécessaire d'établir le stade de fossilisation des autres bois fossiles de la xylothèque. En effet, étant donné que le stade de fossilisation peut nous fournir une idée de l'évolution des structures au sein des bois fossiles, il a été uniquement déterminé dans le cas des bois de l'ESEM puisque seuls ceux-ci font l'objet d'une étude structurale approfondie. Ces premières découvertes nous ont permis de poursuivre sur les caractérisations chimiques, biochimiques et structurales pour lesquelles des points de comparaison s'avèrent nécessaire étant donné la disparité géologique et temporelle de nos échantillons.

Les caractérisations chimiques et physicochimiques nous ont révélé que la majorité des bois fossiles étudiés ne présentent aucune trace d'**hémicelluloses**. Ce résultat était attendu car en règle générale, les composantes hémicellulosiques sont les premières à être dégradées au cours du processus de fossilisation (Hatcher and Clifford, 1997). Leurs structures branchées et leurs faibles poids moléculaires peuvent justifier le caractère facilement hydrolysable de ces polysaccharides (Goldstein, 1991).

La **lignine** des bois fossiles présente quant à elle un comportement assez particulier. En effet, dans la majorité des cas étudiés, des teneurs très faibles en lignine sont détectées par rapport aux bois modernes. Cependant, des tests supplémentaires révèlent l'existence d'une pseudo-lignine, présente en des concentrations équivalentes à la fraction ligneuse, ayant vraisemblablement subi des transformations chimiques au cours de la turbification. Ces modifications structurales de la lignine sont confirmées au cours de l'analyse des bois fossiles de Florennes par résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide. La structure ligneuse a subi des réactions de déméthoxylation progressives confirmées par la diminution des groupements méthoxyles et le clivage des liens intermoléculaires  $\beta\text{-O-}4'$ . Ces transformations résultent en la formation de structures catéchols absentes dans les gymnospermes modernes (Hatcher et al., 1989b) et le maintien d'une certaine cohérence du système ligneux grâce aux liens alkyles toujours présents. Par ailleurs, une analyse de la condensation du réseau des structures de la pseudo-lignine des bois fossiles de Florennes a montré que les structures non condensées ont subi des modifications importantes (soit par élimination, soit par transformation en d'autres structures au cours de la fossilisation) et d'en déduire que les structures condensées sont présentes en plus grande quantité que dans le bois moderne. Si, en règle générale, la lignine est reconnue pour sa capacité à limiter physiquement la bioaccessibilité de la matière organique (Mooney et al., 1998 ; Zhang et al., 2007), nous pouvons émettre l'hypothèse qu'étant donné les modifications subies par la pseudo-lignine des bois fossiles de Florennes, celle-ci offrirait une plus grande protection face aux attaques des microorganismes par rapport à la lignine des essences actuelles. Toutefois, si ce raisonnement a été vérifié pour les bois fossiles de Florennes, il doit encore être validé pour l'ensemble des bois fossiles de la xylothèque.

Une des particularités des bois fossiles ayant entraîné cette étude est leur teneur en **cellulose**. En effet, la majorité des bois fossiles de la xylothèque présentent un taux de cellulose proche de celui de leurs homologues actuels. Or, très peu d'articles mentionnent la présence de cellulose résiduelle dans des bois fossiles (Moers et al., 1994 ; Kuder and Kruge, 1998) et selon de nombreuses études (Stout et al., 1988 ; Staccioli et al., 1997 ; Palanti et al., 2004), l'étape biochimique initiale de la transformation des matières cellulosiques est caractérisée par une réduction significative en cellulose qui, après un très court intervalle de temps géologique, est à son tour complètement dégradée. L'analyse structurale de certains bois fossiles de la xylothèque par résonance magnétique nucléaire  $^{13}\text{C}$  de l'état solide a montré que les polysaccharides présents au sein de ces bois ont conservés une structure similaire à celle de la cellulose des bois contemporains avec toutefois une légère dégradation de celle-ci avec le temps.

La deuxième particularité des bois fossiles a été révélée au cours de la caractérisation biochimique. Celle-ci a permis d'évaluer la réactivité biologique (**biodisponibilité**) de la cellulose encore présente dans les bois fossiles à l'aide de trois tests. Ces trois tests, réalisés essentiellement sur les bois fossiles de l'ESEM et en partie sur les autres bois fossiles de la xylothèque, ont montré que la cellulose n'est plus biodisponible dans des conditions aussi bien aérobies qu'anaérobies. Cette « anomalie » est d'autant plus frappante que le taux de cellulose de ces bois est important. Ce phénomène de non-biodégradation de la cellulose des bois fossiles, ou des bois en général, n'a jamais été mentionnée dans la littérature et ce dans la limite de nos recherches bibliographiques. Toutefois, un parallèle assez intéressant a pu être établi avec une fraction cellulosique récalcitrante enfouie dans des centres d'enfouissement technique (Rodriguez et al., 2005). Cette étude n'établit toutefois pas les raisons de l'inaccessibilité de la matière organique. Ainsi l'étude de la biodégradabilité de la cellulose des bois fossiles permettrait d'extrapoler les processus biologiques et physicochimiques pour les déchets enfouis dans les centres d'enfouissement technique. Les pistes avancées pour expliquer cette absence de biodisponibilité sont la protection exercée par l'environnement immédiat des bois fossiles et la présence d'une cellulose fossile rétro-inhibitrice. D'autre part, des modifications physicochimiques des composantes enrobant les fibres de cellulose pourraient également avoir eu lieu, comme le suggèrent certaines de nos observations, et renforceraient la protection de la cellulose contre les attaques des microorganismes.



Concernant **l'étude des conditions naturelles de fossilisation** des bois fossiles, nous nous sommes demandé si les conditions d'enfouissement, différentes de celles qui ont régné au cours du Miocène, auraient pu influencer la dégradation de la cellulose des bois. L'étude des paramètres relatifs aux sédiments hôtes (humidité, imperméabilité, pH, cations échangeables,...) a montré que les matrices enveloppant ces bois fossiles ne sont pas à l'origine de la préservation de la cellulose. Au contraire, ces conditions sont telles qu'elles auraient dû favoriser la dégradation des polysaccharides ou la minéralisation en conditions aérobies et anaérobies. En effet, même si les conditions environnementales actuelles du site de Florennes sont oxydantes, une colonisation des bois par la microflore environnante aurait pu se dérouler au cours de l'exploitation de la carrière de Florennes. De plus, étant donné que l'environnement présent au cours du Miocène était vraisemblablement acide (De Putter et al., 2002), celui-ci aurait pu favoriser l'activité des microorganismes présents dans les sols.

Bien que l'environnement géologique ne soit pas à l'origine de la préservation de la cellulose des bois fossiles de Florennes, il a pu exercer une certaine influence. Les bois de l'ESEM en constituent un parfait exemple. Les bois de Florennes et d'Onhaye, prélevés dans des poches karstiques, proviennent du même type de sédiments. Or les analyses paléobotaniques et chimiques ont montré que ces deux bois avaient subi des modifications de structure différentes. Ce résultat indique que les bois d'Onhaye ont subi des modifications pré-enfouissement et que l'environnement géologique a maintenu les bois dans l'état de conservation où ils sont. Un deuxième exemple tout aussi frappant est celui des bois de Dunarobba. Celui-ci est en effet issu du même type de sédiments que les bois de Florennes avec toutefois la formation d'une poche karstique dans ce dernier cas et uniquement la superposition de couches de sédiments pour Dunarobba. Or la cellulose n'a pas été conservée dans les bois de Dunarobba. La différence entre les formations géologiques de ces deux sites a pu restreindre la quantité d'eau circulant autour des sédiments dans le cas de Florennes et ainsi faciliter la préservation des bois fossiles. Bien que des formations karstiques identiques à celles de l'ESEM existent en Belgique et en Europe, rien ne garantit que les débris organiques qui y sont enfouis présentent un état de préservation macroscopique et/ou biochimique similaire aux bois de Florennes. De plus, dans le cas des bois de Florennes, étant donné les légères modifications de structure de la lignine par rapport aux phénomènes habituels de fossilisation impliquant la coalification de

la matière organique, nous pouvons considérer que les altérations pré-enfouissement sont beaucoup moins importantes que les altérations post-enfouissement.

Il n'existe à l'heure actuelle aucune étude définissant les critères de minéralisation ou de transformation à un stade plus avancé de la matière organique en charbon. Or les altérations biochimiques ou géochimiques sont influencées par des paramètres tels que la nature des fluides circulants, le potentiel d'oxydoréduction, la température, la pression, la concentration en ions,... Malgré les résultats recueillis au cours de cette étude, aucune comparaison n'a donc pu être établie avec la littérature et les conclusions présentées dans ce paragraphe reposent essentiellement sur des spéculations.

Face au problème posé par la non-biodégradation des celluloses fossiles, une autre explication envisagée serait un manque de digestibilité pour les enzymes hydrolytiques suite à **des modifications des propriétés physico-chimiques de la cellulose** au cours du temps. Une structure de départ différente ou une modification de la structure originale de la cellulose pourrait donc être à la base de sa non-biodégradabilité. Au cours de cette étude, l'impact de la cristallinité (et autres paramètres associés) et de la morphologie des fibres sur le taux d'hydrolyse de la cellulose fossile a été investiguée.

Au sein des systèmes non lignocellulosiques, l'analyse des indices de cristallinité des différentes poudres de celluloses commerciales et des profils de digestibilité correspondants ont confirmé qu'une **cristallinité** importante influence négativement la digestibilité. Cependant, les fibres végétales (chanvre, coton, lin) ne suivent pas cette tendance générale ce qui signifie que d'autres paramètres structuraux doivent également être pris en compte pour expliquer les différentes affinités pour ces substrats. La taille des cristallites ne semble pas constituer un paramètre critique reflétant la bioaccessibilité des celluloses. Une modification du réseau cristallin engendre quant à elle une amélioration de la biodégradabilité de la cellulose. Toutefois, cette conclusion est à nuancer car l'ordre de digestibilité des substrats celluloses ne concorde pas avec l'évolution du degré de cristallinité. En effet, les traitements de mercerisation ou de régénération ont provoqué un réarrangement du réseau cristallin et des liaisons hydrogène. Ces modifications ont permis d'obtenir des poudres de cellulose beaucoup plus accessibles aux enzymes en augmentant la proportion de zones amorphes plus facilement assimilées. Cependant, les différences d'évolution dans les profils de concentration ne trouvent pas leur justification dans les

degrés de cristallinité mesurés. L'explication d'un tel comportement peut trouver sa source dans la nature même des traitements appliqués qui ont provoqué non seulement des modifications du réseau cristallin mais également des modifications morphologiques ou d'autres paramètres tels que degré de polymérisation. En ce qui concerne l'influence exercée par les allomorphes  $I_{\alpha}$  et  $I_{\beta}$ , phases distinctes des nanodomains cristallins de la cellulose, sur la digestibilité, celle-ci ne semble pas être liée à la composition des deux phases cristallines  $I_{\alpha}$  et  $I_{\beta}$  pour les échantillons de celluloses commerciales étudiées. Au sein des systèmes lignocellulosiques, la cristallinité et les autres paramètres associés ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'inhibition de la biodégradation de la cellulose. En effet, la cellulose des bois fossiles de différentes essences présente une structure cristalline analogue à celle des bois actuels et n'a donc pas subi de modifications de sa structure au cours de la fossilisation. Or les bois actuels sont constitués d'une cellulose capable d'être dégradée par les microorganismes. Toutefois, étant donné que la cristallinité a une légère influence sur la biodégradabilité des celluloses commerciales, rien ne nous permet d'affirmer que ça n'est pas le cas dans les bois fossiles malgré les résultats obtenus. En effet, pour des substrats aussi complexes que les bois, son influence doit être diminuée par la présence d'autres paramètres d'inhibition tels que la lignine ou les extraits.

La **morphologie des particules** ne constitue pas un paramètre affectant significativement les taux d'hydrolyse enzymatique des échantillons de celluloses commerciales étudiées. Toutefois, l'impact de la surface spécifique totale accessible n'a pas été testé. Cette dernière, contrairement à la surface déterminée au cours de ce travail, prend en compte la surface spécifique externe (liée à la forme et la taille des particules) et la surface spécifique interne (liée à la capillarité des fibres) des particules de cellulose (Lee and Fan, 1983). Or, la surface spécifique interne est fortement influencée par la présence d'eau et constituerait un facteur important déterminant le taux de digestion des celluloses pures par des enzymes hydrolytiques (Thonart et al., 1979 ; Weimer et al., 1990). Ces analyses pourraient faire l'objet de travaux ultérieurs. L'accessibilité de la cellulose des bois fossiles semble quant à elle peu affectée par l'augmentation de la surface spécifique des échantillons. Cela est probablement dû à la nature hétérogène de ces matériaux et la contribution des autres composantes comme la lignine. Par ailleurs, la technique utilisée pour vérifier l'impact de la surface spécifique dans le cas des bois fossiles est assez élémentaire. Des techniques comme la porosimétrie au mercure et la physisorption d'azote permettraient de déterminer

plus précisément la distribution des propriétés morphologiques des microstructures présentes.

En conclusion, les techniques utilisées au cours de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence des modifications structurales de la cellulose des bois fossiles. Le bois constitue en effet un substrat très complexe pour lequel il est impossible d'extraire les polysaccharides sans aucune certitude quant aux modifications apportées au cours de leur isolation. Toutefois, la technique de pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS) devrait nous permettre de pallier à ce problème. Cette technique de détection extrêmement sensible nous permettrait de détecter des modifications structurales telles que la dépolymérisation de la cellulose, la présence de résidus polysaccharidiques liés à la présence de microorganismes,... (Yang et al., 2005). Ces analyses pourraient également nous fournir des indications sur les modifications structurales pré-enfouissement ainsi sur la présence d'une activité microbienne au cours des étapes initiales de la turbification. Si les transformations des structures polysaccharidiques détectées par Py-GC-MS dans les bois de l'ESEM se recourent avec celles des autres bois fossiles de la xylothèque, cela suggère que les modifications structurales de la cellulose pourraient être à la base de sa préservation. En effet, on peut concevoir qu'un tel phénomène mène à une non reconnaissance des substrats cellulose par les microorganismes.

Etant donné que l'étude des propriétés physicochimiques de la cellulose des bois fossiles n'a pu expliquer l'inhibition importante de la biodégradation de celle-ci, nous nous sommes penchés sur l'effet protecteur exercé par les composés enrobant les microfibrilles de cellulose. Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur les **composés extractibles**. En effet, certains extraits ou composés phénoliques sont souvent mentionnés dans la littérature comme étant toxiques à certains champignons et autres microorganismes (Rättö et al, 2004 ; Nemli et al., 2006). Il est extrêmement difficile d'étudier *in vivo* l'impact d'un seul composé sur la bioaccessibilité de la cellulose. En effet, la probabilité que les composés susceptibles d'assurer la protection de la cellulose agissent par effets cumulés est particulièrement forte. Le fait d'éliminer les extraits dans les bois, puis de soumettre ceux-ci à une dégradation enzymatique, ne nous a pas permis de détecter le pourcentage d'inhibition que les extraits pourraient exercer. Ce résultat est tout à fait compréhensible si le phénomène d'effets cumulés, impliquant une action inhibitrice beaucoup plus importante

d'un autre composé, est pris en compte. Une simulation *in vitro* de la dégradation enzymatique de cellulose pure en présence d'extraits de bois, a révélé quant à elle une légère inhibition de l'activité des enzymes cellulolytiques. Ce résultat peut signifier que des complexes enzymes/extraits se sont formés et empêchent une partie des enzymes de dégrader la cellulose ou que certains extraits se sont complexés sur la cellulose et empêchent les enzymes d'accéder à ces sites. Toutefois, la teneur en extrait, telle que présente dans la nature, ne semble pas être la cause principale de l'inhibition de la dégradation cellulosique. De plus, étant donné qu'aucune différence marquante n'est observée entre les résultats obtenus pour *Metasequoia* et les bois fossiles, nous pouvons supposer que la structure des composés constituant les extraits dans les bois fossiles n'a pas évolué et ne peut donc pas expliquer la différence de résistance de la cellulose des bois fossiles et actuels à la biodégradation. Un deuxième test *in vitro* d'inhibition a montré que les extraits de bois n'exercent pas une action inhibitrice flagrante sur le développement de bactéries habituellement impliquées dans les processus de biodégradation. Toutefois, un inconvénient majeur des deux tests *in vitro* réalisés au cours de ces recherches est que la plupart des composés testés, même si certains possèdent une faible capacité d'inhibition des enzymes cellulolytiques, ne sont pas liés chimiquement à la matrice du bois et peuvent se dissocier de leur support au cours des tests.

Cette réflexion nous a incités à envisager un dernier test *in vitro* qui, s'il ne reproduit pas les liaisons naturellement existantes entre les extraits et les tissus végétaux, évite l'inconvénient mentionné ci-dessus. Ce test ou *soil block decay test* (EN 113, 1980) permet de déterminer le seuil d'efficacité des produits de préservation imprégnant dans tout leur volume des éprouvettes de bois exposées ensuite à des cultures posées sur milieu gélosé de champignons basidiomycètes. Des essais préliminaires ne fournissent pas à ce jour des résultats reproductibles aussi bien sur des échantillons non traités que des échantillons traités avec un biocide commercial. Le mode opératoire développé au cours de ces expériences doit encore être amélioré du point de vue de la sensibilité des mesures. Ce test constitue, de notre point de vue, la dernière piste envisagée capable de mettre en évidence l'effet inhibiteur exercé par les extraits de bois fossiles. Notre propos est néanmoins à nuancer car les composés extractibles testés au cours de nos recherches ne représentent qu'une fraction de l'ensemble des extraits présents dans les bois. Afin d'isoler d'autres molécules bioactives, des solvants organiques d'extraction de polarité différente pourraient être testés. Si ces composés présentent un caractère inhibiteur plus marqué vis-à-vis de la

biodégradation de la cellulose, une détermination de la nature et de la structure des extraits présents serait particulièrement intéressante dans la cadre des recherches sur de nouveaux produits de préservation naturels des bois susceptibles de remplacer les produits de traitements usuels souvent nuisibles à l'environnement.

La lignine ou plutôt **la pseudo-lignine constitue le facteur prépondérant** dans le procédé de non-biodégradation de la cellulose des bois fossiles. Les modifications du système ligneux survenues au cours de la fossilisation semblent en effet avoir conféré au bois la capacité de lutter contre toutes attaques de microorganismes. Ce phénomène a été mis en évidence par le biais de traitements de délignification ayant pour résultat la modification et/ou l'élimination d'une fraction de la structure ligneuse au sein des bois fossiles. La détermination précise de l'origine de la barrière de protection exercée par la lignine nous a en effet incités à déterminer les changements de structure survenus au cours de ces différents traitements de délignification et à établir une corrélation entre ces changements et la bioaccessibilité de la cellulose. Le fait d'avoir une structure de départ différente engendre des réactions différentes vis-à-vis des traitements. Les modifications apportées créent à leur tour des structures ligneuses différentes de celles de départ et induisent par extension un accès différent au substrat cellulosique. Ce raisonnement permet d'expliquer les différences de biodisponibilité de la cellulose constatées pour les bois fossile et moderne au cours des différents traitements de délignification. Concrètement, les traitements au chlorite de sodium et au peroxyde d'hydrogène se sont avérés les plus efficaces pour le bois moderne et pour le bois fossile respectivement. Dans le cas du bois moderne, l'amélioration de la bioaccessibilité trouve son origine dans les importantes modifications de la structure ligneuse au cours du traitement de délignification dont un changement significatif des vibrations C=C des noyaux aromatiques de la lignine et la formation de nouveaux groupements carbonyles. Par ailleurs, la présence de groupements spécifiques tels que la vanilline n'est pas une piste à négliger. En effet, l'élimination de ces groupements au sein de la structure ligneuse du bois moderne provoque une amélioration de la biodigestibilité de la cellulose. Une simulation *in vitro* de dégradation enzymatique de cellulose pure en présence de vanilline corrobore également ce résultat. Ce comportement pourrait être dû à une réactivité intrinsèque plus grande des noyaux aromatiques substitués par des liaisons carbonyles ou à leur localisation ou mode de liaison au sein de la structure ligneuse. Une hypothèse similaire avait déjà été émise sur les unités syringyles constitutives de la lignine des angiospermes (Goni et al., 1993). Dans le cas du bois fossile, la perte d'intensité de

certaines signaux observée au cours de nos investigations, corrélée aux hypothèses de Faix (1992), impliquerait une désagrégation des structures condensées.

Ce postulat, associé à la diminution drastique des structures non-condensées, permettrait d'expliquer l'amélioration importante de la bioaccessibilité de la cellulose lors de ce traitement de délignification. Si nous poussons plus loin notre raisonnement, **la nature ou la proportion des liens intermoléculaires** dans la structure ligneuse semble constituer la clé de la protection exercée par la pseudo-lignine. En effet, l'absence partielle de liaisons intermoléculaires  $\beta$ -O-4' dans la pseudo-lignine n'empêche pas l'inhibition et leur quasi élimination de la structure ligneuse après délignification ne semble pas être liée à l'augmentation de la bioaccessibilité des substrats cellulosiques. Par contre, la pseudo-lignine présente initialement dans les bois fossiles est très riche en structures condensées (liaisons intermoléculaires 4-O-5' , 5-5' et  $\beta$ -5' ) dont la désagrégation, obtenue après traitement de délignification, permet de vaincre l'inhibition de la cellulose. Néanmoins, si les traitements de délignification ont accru la biodisponibilité de la cellulose des bois fossiles, nous ne pouvons exclure le fait qu'en plus d'avoir affecté la structure ligneuse, ils aient également modifié d'autres paramètres structuraux dans les bois. Ces modifications pourraient alors être en partie à la base de l'efficacité des traitements utilisés. Ce raisonnement pourrait entre autres s'appliquer au bois moderne pour lequel l'application de deux traitements de délignification différents a provoqué une amélioration de la biodisponibilité de la cellulose dans un cas mais pas dans l'autre. Ce phénomène aurait pu passer inaperçu si l'analyse des structures n'avait révélé qu'aucun changement structurel de la structure ligneuse n'avait eu lieu.

En conclusion, la méthodologie développée au cours de cette recherche pour mettre en évidence l'action inhibitrice exercée par la lignine s'est révélée appropriée. Toutefois, afin d'améliorer l'étude de l'évolution des structures ligneuses au cours des traitements de délignification et de digestions enzymatiques des bois, il conviendrait de faire appel à une technique plus précise d'analyse des modifications structurales telle que la Py-GC-MS. De plus, afin de s'assurer que des modifications structurales, autres que celles apportées à la lignine, ne sont pas en partie à la base de l'efficacité des traitements utilisés, il serait utile de définir une série de paramètres structuraux à contrôler après chaque traitement et de corrélérer leur fluctuation avec l'efficacité des traitements. En outre, pour renforcer

statistiquement les conclusions formulées jusqu'à présent, il serait très intéressant d'étendre notre étude à l'ensemble des bois fossiles de la xylothèque qui, pour la majorité d'entre eux, possèdent une cellulose non-biodisponible. Un suivi de l'évolution de la structure ligneuse au cours de traitements de délignification identiques à ceux appliqués aux bois de Florennes, nous permettrait de déterminer si la protection exercée par la pseudo-lignine des bois de Florennes constitue ou non une exception. S'il s'avère que ce phénomène ne représente pas un cas isolé, la reproduction des transformations structurales présentes au sein de la pseudo-lignine des bois fossiles pourrait se révéler très utile dans des domaines d'application tels que les bois de construction. Dans un contexte de développement durable, la mise au point d'un tel procédé, pourrait également représenter une nouvelle approche dans les recherches sur les bioessences. En effet, la modification de la composition ligneuse, à l'aide du génie chimique par exemple, permettrait une bioaccessibilité importante de la cellulose sans avoir recours à des prétraitements coûteux.

Et voilà, notre fabuleuse aventure dans le monde des bois fossiles s'achève ici. Notre approche pluridisciplinaire du phénomène de non-biodégradabilité de la cellulose présente dans ces bois fossiles nous a permis de résoudre cette étrange énigme de la Nature et de proposer de nouvelles approches pour encore mieux cerner ce curieux comportement. Que dire de plus à part « *To be continued...* »



## **Chapitre V : Bibliographie**

- Adams, G.A., Bishop, C.T., (1953) Polysaccharides associated with alpha-cellulose. *Nature*, 172, 28-29.
- ADRIANOR, Cellulose microcristalline [en ligne]. Disponible sur : < [http://www.adrianor.com/adrianor/lesdossierstechniquesCEAI\\_fichiers/dérivésdecellulose.pdf](http://www.adrianor.com/adrianor/lesdossierstechniquesCEAI_fichiers/dérivésdecellulose.pdf) > (consulté le 8 juillet 2009).
- Alef, K., Nannipieri, P., (1995) Methods in applied soil microbiology and biochemistry, pp. 576. Academic Press.
- Allard, B., (2005) A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit. Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions. *Geoderma*, 130, 77-96.
- Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L., Cortassa, S., (2001) I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18(3), 239-254.
- Archibald, F.S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M.G., Reid, I.D., (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53, 215-236.
- ASTM, (2007) D1105 - 96. Standard Test Method for preparation of extractive-free wood.
- Atalla, M., Serra, R.G., Vassallo, A.M., Wilson, M.A., (1988) Structure of ancient buried wood from *Phyllocladus trichomanoides*. *Organic Geochemistry*, 12, 235-244.
- Azaroff, L.V., Buerger, M.J., (1958) *The powder method in x-ray crystallography*. McGraw-Hill.
- Baptista, C., Robert, D., Duarte, A.P., (2008) Relationship between lignin structure and delignification degree in *Pinus pinaster* kraft pulps. *Bioresource Technology*, 99(7), 2349-2356.
- Barghoorn, E.S., (1952) Degradation of plant tissues in organic sediments. *Journal of Sedimentary petrology*, 22, 34-41.
- Barlaz, M.A., Ham, R.K., Schaefer, D.M., (1990) Methane production from municipal refuse : a review of enhancement techniques and microbial dynamics. *Critical Reviews in Environmental Control*, 19(6), 557-584.
- Bateman, R.M., (1991) Palaeoecology, *Plant Fossils in Geological Investigation : The Palaeozoic*, pp. 34-116, Horwood, Chichester.
- Bates, A.L., Hatcher, P.G., (1989) Solid-state <sup>13</sup>C NMR studies of a large fossil gymnosperm from the Yallourn Open Cut, Latrobe Valley, Australia. *Organic Geochemistry*, 14(6), 609-617.

- Bates, A.L., Hatcher, P.G., Lerch, I., Harry E., Cecil, C.B., Neuzil, S.G., Supardi, (1991) Studies of a peatified angiosperm log cross section from Indonesia by nuclear magnetic resonance spectroscopy and analytical pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 17(1), 37-45.
- Beguín, P., Aubert, J.P., (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, 13(1), 25-58.
- Benvegnù, F., Brondi, A., Polizzano, C., (1989) *Natural analogues and evidence of long-term isolation capacity of clays occurring in Italy. Contribution to the demonstration of geological disposal reliability of long-lived wastes in clay.* Commission of the European Communities, Luxembourg.
- Berrocal, M.J., Rodriguez, J., Ball, A.S., Pérez-Leblic, M.I., Arias, M.E., (1997) Solubilisation and mineralisation of [14C]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 379-384.
- Binder, A., Pelloni, L., Fiechter, A., (1980) Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability *Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 1-5.
- Biondi, E., (1982) "*Taxodioxydon gypsaceum*" (Göbber) Kräusel fossil wood in the Miocene in central Italy. *Giornale Botanico Italiano*, 116, 227-233.
- Braize, D., (1988) *Guide des analyses courantes en pédologie.* Institut National de la recherche agronomique, Paris.
- Brantner, A., Pfeiffer, K.P., Brantner, H., (1994) Applicability of diffusion methods required by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. *Pharmazie*, 49, 512-516.
- Calembert, L., (1948) Observations sur les dépôts tertiaires lacustres de La Triche (Andenne) et des régions voisines. *Annales de la Société Géologique de Belgique*, 22, 115-147.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J., (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 10324-10330.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M.J., Castro, E., (2006) Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry*, 41(2), 423-429.
- CEN/TS15083-1, (2004) Durability of wood and wood-based products - Determination of the natural durability of solid wood against wood-destroying fungi, test methods - Part 1 : Basidiomycetes, pp. 1-26. CEN/TC 38, AFNOR.
- Choi, J.H., Kim, H.S., Jung, M.J., Choi, J.S., (2001) (+)-catechin, an antioxidant principle from the leaves of *Pinus densiflora* that acts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Journal of Natural Products Science*, 7, 1-4.

- Christov, L.P., Akhtar, M., Prior, B.A., (1998) The potential of biosulfite pulping in dissolving pulp production. *Polymer Degradation and Stability*, 23(1-2), 70-74.
- Colom, X., Carrillo, F., (2002) Crystallinity changes in lyocell and viscose-type fibres by caustic treatment. *European Polymer Journal*, 38(11), 2225-2230.
- Comans, R.N.J., Filius, J., van Zomeren, A., van der Sloot, H.A., (2000) Karakterisering organische stof : haalbaarheidstudie naar genormaliseerde methoden voor de bepaling van beschikbaarheid en rol van organische stof in grond, afval en bouwstoffen m.b.t. verhoging van de uitloging van slecht water oplosbare verontreinigingen. Netherlands Energy Research Foundation ECN.
- Crawford, R.L., (1981) *Lignin biodegradation and transformation*. John Wiley & Sons, New-York.
- Creber, G.T., Chaloner, W.G., (1984) Influence of environmental factors on the wood structure of living and fossil trees. *Botanical Review*, 50, 357-448.
- Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Le Petit, J., (2002) Endoglucanase and [beta]-glycosidase activities in an evergreen oak litter: annual variation and regulating factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1111-1120.
- De Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 795-811.
- De Putter, T., André, L., Bernard, A., Dupuis, C., Jedwab, J., Nicaise, D., Perruchot, A., (2002) Trace element (Th, U, Pb, REE) behaviour in a cryptokarstic halloysite and kaolinite deposit from Southern Belgium: importance of "accessory" mineral formation for radioactive pollutant trapping *Applied Geochemistry*, 17(10), 1313-1328.
- De Putter, T., Roche, M., Dupuis, C., Fairon-Demaret, M., Nicaise, D., Roblain, D., Thonart, P., (1996) Taphocoenosis of Miocene taxodiaceous wood from the Entre-Sambre-et-Meuse cryptokarsts (southern Belgium). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen*, 202(2), 259-268.
- Desmons, P., (1987) Optimisation de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en fonction de la composition du complexe cellulolytique et des caractéristiques du substrat. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux., Gembloux.
- Edwards, C.S., (1973) Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24, 381-388.
- EN113, (1980) Détermination du seuil d'efficacité contre les champignons basidiomycetes lignivores cultivés sur milieu gélosé, pp. 1-26. Comité Européen de Normalisation, Bruxelles.
- Eriksson, T., Borjesson, J., Tjerneld, F., (2002) Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 353-364.

- Evans, P.D., Creffield, J.W., Conroy, J.S.G., Barry, S.C., (1997) Natural durability and physical properties of particleboard composed of White Cypress Pine and Radiate Pine. *Forest Products Journal*, 47(6), 87-94.
- Fairon-Demaret, M., (1992) A propos de la découverte de Juniperoxylon pachyderma (Göppert) Krausel 1949 dans le tertiaire de Bioul (Entre-Sambre-et Meuse). *Annales de la Société Géologique de Belgique*, 115(1), 333-339.
- Faix, O., (1992) Fourier transform infrared spectroscopy. In: S.Y. Lin, C.W. Dence (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*, pp. 83-109. Springer, Berlin.
- Fan, L.T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H., (1980) Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 177-199.
- Fengel, D., (1991) Aging and fossilization of wood and its components. *Wood Science and Technology*, 25, 153-177.
- Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J., (2000) Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresource Technology*, 74(3), 201-212.
- Figueiral, I., Mosbrugger, V., Rowe, N.P., Ashraf, A.R., Utescher, T., Jones, T.P., (1999) The Miocene peat-forming vegetation of northwestern Germany: an analysis of wood remains and comparison with previous palynological interpretations. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 104(3-4), 239-266.
- Garrett, R., Grisham, C., (2000) *Biochimie*. De Boeck Université, Paris.
- Gerards, T., Gerienne, P., (2003) Etude comparative au microscope électronique à balayage du xylème secondaire de Gymnospermes et Angiospermes actuelles avant et après carbonisation contrôlée. Résultats préliminaires. In: *Treizième colloque de l'organisation francophone de paléobotanique*, pp. 17-21, Nantes.
- Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., Fan, L.T., (1983) Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 157-172.
- Gilardi, G., Abis, L., Cass, A.E.G., (1995) Carbon-13 CP/MAS solid-state NMR and FT-IR spectroscopy of wood cell wall biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 268-275.
- Gold, M.H., Youngs, H.L., Sollewijn Gelpke, M.D., (2000) Manganese peroxidase. In: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal ions biological systems*, pp. 559-587. Marcel Dekker, New York.
- Goldstein, I.S., (1991) Overview of the chemical composition of wood. In: M. Lewin, I.S. Goldstein (Eds.), *Wood structure and composition*, 11, *International Fiber Science and Technology Series*, pp. 1-5. Marcel Decker, Inc., New York.

- Goni, M.A., Nelson, B., Blanchette, R.A., Hedges, J.I., (1993) Fungal degradation of wood lignins : geochemical perspectives from CuO-derived phenolic dimers and monomers. *Geochemica and Cosmochemica Acta*, 57, 3985-4002.
- Goring, H.K., Van Soest, P.J., (1970) Forage fibre analysis. In: A.R. Service (Ed.), *Agricultural Handbook*, 379, pp. 1-20. U.S. Department of agricultural Jacket, Washington D.C.
- Gothan, W., (1905) *Zur Anatomie lebender und fossiler Gymnospermen-Hölzer*. Abh. Preuss. geol. landesanst, Berlin.
- Gould, J.M., (1984) Alkaline peroxide delignification of agricultural. residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 46-52.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C., Barrière, Y., (2004) Genetic and molecular basis of grass cell-wall digestibility. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *C.R. Biologies*, 327, 455-465.
- Greguss, P., (1955) *Identification of living gymnosperms on the basis of xyotomy*. Akademia Kiado Budapest, Budapest.
- Gumuskaya, E., Usta, M., (2006) Dependence of chemical and crystalline structure of alkali sulfite pulp on cooking temperature and time. *Polymer Degradation and Stability*, 65(4), 461-468.
- Hakala, T.K., Lundell, T., Galkin, S., Majjala, P., Kalkkinen, N., Katakka, A., (2005) Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selctive white-rot fungi *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 461-468.
- Hatakka, A., (2004) Biodegradation of lignin. In: M. Hofrichter, A. Steinbüchel (Eds.), *Lignin, Humic substances and coal*, pp. 129-167. Wiley-VCH.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Szeverenyi, N., Maciel, G.E., (1982) Nuclear magnetic resonance studies of ancient buried wood--II. Observations on the origin of coal from lignite to bituminous coal. *Organic Geochemistry*, 4(1), 9-18.
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J., (1997) The organic geochemistry of coal: from plant materials to coal. *Org. Geochem.*, 27(5/6), 251-274.
- Hatcher, P.G., Lerch, H.E., Verheyen, T.V., (1989a) Organic geochemical studies of the transformation of gymnospermous xylem during peatification and coalification to subbituminous coal. *International Journal of Coal Geology*, 13, 65-97.
- Hatcher, P.G., Lerch, H.E., Verheyen, T.V., (1990) Organic geochemical studies of the transformation of gymnospermous xylem during peatification and coalification to subbituminous coal. *International Journal of Coal Geology*, 16, 193-196.

- Hatcher, P.G., Lerch, I., Harry E., Bates, A.L., Verheyen, T.V., (1989b) Solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of coalified gymnosperm xylem tissue from Australian brown coals. *Organic Geochemistry*, 14(2), 145-155.
- Hatcher, P.G., Pan, V.H., Maciel, G.E., (1999) Solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance of fossil plants and spores. In: T.P. Jones, N.P. Rowe (Eds.), *Fossil Plants and Spores: modern techniques*, pp. 149-155. Geological Society, London.
- Hatcher, P.G., Wenzel, K.A., Cody, G.D., (1994) Coalification reactions of vitrinite derived from coalified wood. *American Chemical Society*, chap.8, 112-135.
- Haug, R.T., (1993) *The practical handbook of compost engineering*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl.
- Hayashi, N., Sugiyama, J., Okano, T., Ishihara, M., (1998) The enzymatic susceptibility of cellulose microfibrils of the algal-bacterial type and the cotton-ramie type. *Carbohydrate Research*, 305(2), 261-269.
- Hedges, J.I., Cowie, G.L., Ertel, J.R., (1985) Degradation of carbohydrates and lignins in buried woods. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49, 701-711.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., (1982) Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxidation products. *analytical chemistry*, 54, 174-178.
- Hendershot, W.H., Duquette, M., (1986) A simple barium chloride method for determining cation exchange capacity and exchangeable cations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50, 605-608.
- Holmgren, A., (2008) Biochemical control aspects in lignin polymerization. In: *Department of fiber and polymer technology*, pp. 60. Royal Institute of Technology, Stockholm.
- Horwood, E., (1991) *Plant fossils in geological investigation - the palaeozoic*. Ellis Horwood Ltd, Chicester.
- Hult, E.-L., Liitia, T., Maunu, S.L., Hortling, B., Iversen, T., (2002) A CP/MAS <sup>13</sup>C-NMR study of cellulose structure on the surface of refined kraft pulp fibers. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 231-234.
- Jimenez, L., Angulo, V., Ramos, E., De la Torre, M.J., Ferrer, J.L., (2006) Comparison of various pulping processes for producing pulp from vine shoots. *Industrial Crops and Products*, 23(2), 122-130.
- Johansson, M.-B., Kögel, I., Zech, W., (1986) Changes in the lignin fraction of spruce and pine needle litter during decomposition as studied by some chemical methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(6), 611-619.
- Kamdem, D.P., (1994) Fungal decay resistance of aspen blocks treated with heartwood extracts. *Forest Products Journal*, 44(1), 30-32.

- Kirk, T.K., Cullen, D., (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: R.A. Young, M. Akhtar (Eds.), *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*, pp. 273-307. John Wiley & Sons, Inc., New-York.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L., (1987) Enzymatic "combustion" : the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-505.
- Kögel, I., (1986) Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(6), 589-594.
- Kögel, I., Bochter, R., (1985) Characterization of lignin in forest humus layers by high-performance liquid chromatography of cupric oxide oxidation products. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(5), 637-640.
- Koivula, N., Hänninen, K., (2001) Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stage of humification. *Chemosphere*, 44, 271-279.
- Kono, H., Yunoki, S., Shikano, T., Fujiwara, M., Erata, T., Takai, M., (2002) CP/MAS <sup>13</sup>C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectrum of the native cellulose. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 7506-7511.
- Krassig, H.A., (1996) *Cellulose structure, accessibility, and reactivity*. Gordon and Breach Science.
- Kräusel, R., (1949) Die fossile Koniferenhölzer, II Teil: Kritische Untersuchungen zur diagnostic lebender und fossiler Koniferenhölzer. *Palaeontographica B*, 89, 83-203.
- Kuder, T., Kruge, M.A., (1998) Preservation of biomolecules in sub-fossil plants from raised peat bogs — a potential paleoenvironmental proxy *Organic Geochemistry*, 29(5-7), 1355-1368.
- Kumar, V., de la Luz Reus-Medina, M., Yang, D., (2002) Preparation, characterization, and tableting properties of a new cellulose-based pharmaceutical aid. *International Journal of Pharmaceutics*, 235(1-2), 129-140.
- Lechien, V., Rodriguez, C., Ongena, M., Hiligsmann, S., Rulmont, A., Thonart, P., (2006) Physicochemical and biochemical characterization of non-biodegradable cellulose in Miocene gymnosperm wood from the Entre-Sambre-et-Meuse, Southern Belgium. *Organic Geochemistry*, 37, 1465-1476.
- Lee, Y.H., Fan, L.T., (1982) Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose: Analysis of the Initial Rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(11), 2383-2406.
- Lee, Y.H., Fan, L.T., (1983) Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose: (II) Analysis of Extended Hydrolysis Times. *Biotechnology and Bioengineering*, 939-966.



- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wotjas-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J., (1999) Biodegradation of Lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175-185.
- Liitia, T., Maunu, S.L., Hortling, B., (2000) Solid state NMR studies on cellulose crystallinity in fines and bulk fibres separated from refined kraft pulp. *Holzforschung*, 54, 618-624.
- Liitia, T., Maunu, S.L., Sipila, J., Hortling, B., (2002) Application of solid-state<sup>13</sup>C NMR spectroscopy and dipolar dephasing technique to determine the extent of condensation in technical lignins. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 21, 171-186.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577.
- Malutan, T., Ciovisa, S., Rozmarin, E., (1999) Some aspects regarding characterization of celluloses by physico-chemical methods. In: *Proceedings of 12th International Symposium, Iasi*, pp. 126-131.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., (1976) Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 21-33.
- Mantani, N., Imanishi, N., Kawamata, H., Terasawa, K., Ochiai, H., (2001) Inhibitory effect of (+)-catechin on the growth of influenza A7PR/8 virus in MDCK cells. *Planta Medica*, 67, 240-243.
- Moers, M.E.C., De Leeuw, J.W., Baas, M., (1994) Origin and diagenesis of carbohydrates in ancient sediments. *Org. Geochem.*, 21(10/11), 1093-1106.
- Mohammed-Ziegler, I., Holmgren, A., Forsling, W., Lindberg, M., Ranheimer, M., (2004) Mechanism of the adsorption process of pinosylvin and some polyhydroxybenzenes onto the structure of lignin. *Vibrational Spectroscopy*, 36, 65-72.
- Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy, M.G., Saddler, J.N., (1998) The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, 64(2), 113-119.
- Nanny, M.A., Ratasuk, N., (2002) Characterization and comparison of hydrophobic neutral and hydrophobic acid dissolved organic carbon isolated from three municipal landfill leachates. *Water Research*, 36, 1572-1584.
- Negrutu, C., Gavrilescu, D., Malutan, T., (1999) Oxygen delignification of softwood kraft pulp. Some characteristics of dissolved lignin. In: *Proceedings of the 12th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry*, pp. 68-73, Iasi, Romania.

- Nemli, G., Gezer, E.D., Yildiz, S., Temiz, A., Aydin, A., (2006) Evaluation of the mechanical, physical properties and decay resistance of particleboard made from particles impregnated with *Pinus brutia* bark extractives. *Bioresource Technology*, 97(16), 2059-2064.
- Nicaise, D., (1998) L'halloysite des cryptokarsts néogènes de l'Entre-Sambre-et-Meuse (Belgique) : synthèse géologique, minéralogique et géochimique. Université de Paris-Sud U.F.R Scientifique d'Orsay., Orsay.
- Nimz, H., Rober, D., Faix, O., Nemr, M., (1981) Carbon-13 NMR spectra of lignin. Structural differences between lignins of hardwoods, softwoods, grasses and compression wood. *Holzforschung*, 35, 16-26.
- OIV, Résolution OENO 9/2002 [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.oiv.int> > (consulté le 8 juillet 2009).
- Opsahl, S., Benner, R., (1999) Characterization of carbohydrates during early diagenesis of five vascular plant tissues. *Organic Geochemistry*, 30(1), 83-94.
- Orem, W.H., Neuzil, S.G., Lerch, H.E., Cecil, C.B., (1996) Experimental early-stage coalification of a peat sample and a peatified wood sample from Indonesia. *Organic Geochemistry*, 24(2), 111-125.
- Palanti, S., Susco, D., Torniai, A.M., (2004) The resistance of Dunarobba fossil forest wood to decay fungi and insect colonization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53(2), 89-92.
- Palmowski, L.M., Müller, J.A., (2003) Anaerobic degradation of organic materials-significance of the substrate surface area. *Water Science and Technology*, 47, 231-238.
- Pandey, K.K., (2005) A note on the influence of extractives on the photo-discoloration and photo-degradation of wood. *Polymer Degradation and Stability*, 87(2), 375-379.
- Pandey, K.K., Pitman, A.J., (2003) FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(3), 151-160.
- Paquot, M., Thonart, P., (1982) Hydrolyse enzymatique de la cellulose régénérée. *Holzforschung*, 36(4), 177-181.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J., (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin : an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- Perez, S., Mazeau, K., (2005) Conformations, structures, and morphologies of celluloses. In: S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides : structural diversity and functional versatility*, pp. 41-68. Dekker, M., New York.

- Pettersen, R.C., Schwandt, V.H., (1991) Wood sugar analysis by anion chromatography. *Journal of wood chemistry and technology*, 11(4), 495-501.
- Philippe, M., Contini, D., Méon, H., (1992) The Longemaison "Purbeckian" lignite (Doubs, French Jura) is neogene in age, according to paleobotanical investigation. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 314(2), 359-364.
- Philippe, M., Giret, A., Jordan, G.J., (1998) Tertiary and Quaternary fossil wood from Kerguelen (southern Indian Ocean). *Earth & Planetary Sciences*, 326, 901-906.
- Pohjamo, S.P., Hemming, J.E., Willfor, S.M., Reunanen, M.H.T., Holmbom, B.R., (2003) Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*, 63(2), 165-169.
- Ramos, L.P., Nazhad, M.M., Saddler, J.N., (1993) Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 821-831.
- Rättö, M., Ritschkoff, A.-C., Viikari, L., (2004) Enzymatically polymerized phenolic compounds as wood preservatives. *Holzforschung*, 58, 440-445.
- Raven, P., Evert, R.F., Eickhorn, S.E., (2000) *Biologie végétale*. De Boeck Université.
- Roberts, J., (1996) *Understanding soil mechanics*. Delmar Publishers, United States of America.
- Rodriguez, C., (2005) Activité biologique dans les centres d'enfouissement technique de déchets ménagers : biodisponibilité de la cellulose et modélisation. Thèse de doctorat, pp. 147. *Centre Wallon de Biologie Industrielle*, Université de Liège, Liège, Belgium.
- Rodriguez, C., Hiligsmann, S., Ongena, M., Charlier, R., Thonart, P., (2005) Development of an enzymatic assay for the determination of cellulose bioavailability in municipal solid waste. *Biodegradation*, 16, 415-422.
- Rowland, A.P., Roberts, J.D., (1999) Evaluation of lignin and lignin-nitrogen fractionation following alternative detergent fiber pre-treatment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(1-2), 279-292.
- Rye, C.S., Withers, S.G., (2000) Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(5), 573-580.
- Schoch, W., Heller, I., Schweingruber, F.H., Kienast, F., (2004) Wood anatomy of central European species. *Online version* : [www.woodanatomy.ch](http://www.woodanatomy.ch).
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., (2000) Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54(1), 47-52.
- Schwarz, W.H., (2001) The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 634-649.

- Scott, G.M., Akhtar, M., Lentz, M., (1995) Fungal pretreatment of wood chips for sulfite pulping In: *Proceedings of the 1995 TAPPI Pulping conference, Book 1*, pp. 355-361. Tappi Press, Chicago, IL. Atlanta, GA.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., (1959) An empirical method for estimating the degree of cristallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29, 786-794.
- Sewalt, V.J.H., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Acharya, S., Baron, V.S., (1997) Lignin impact on fiber degradation. IV. Enzymatic saccharification and in vitro digestibility of alfalfa and grasses following selective solvent delignification. *Bioresource Technology*, 61(3), 199-206.
- Sigma-aldrich, Cellulose fibers medium & a-cellulose fibers [en ligne]. Disponible sur : <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog>> (consulté le 8 juillet 2009).
- Staccioli, G., Stasiuk, L.D., Mcmillan, N.J., (1997) Assessment of carboxyl groups of some Canadian Arctic fossil woods to evaluate their degradation. *Organic Geochemistry*, 27(718), 561-565.
- Stenius, P., (2000) *Forest Products Chemistry*. Fapet Oy, Helsinki, Finland.
- Stewart, C.M., Foster, R.C., (1976) X-Ray diffraction studies related to forest products research. *Appita*, 29(6), 440-448.
- Stinson, J.A., Ham, R.K., (1995) Effect of lignin on the anaerobic decomposition of cellulose as determined through the use of a biochemical methane potential method. *Environmental Science and Technology*, 29(9), 2305-2310.
- Stockmans, F., Vanhoorne, R., (1954) Etude botanique du gisement de tourbe de la région de Pervijze (plaine maritime belge). *Mémoire de l'Institut Royal des sciences naturelles de Belgique*, 130, 1-144.
- Stockmans, F., Willièrè, Y., (1934) Notes sur des bois fossiles récoltés en Belgique. *Bulletin du Musée royal d'Histoire naturelle de Belgique*, 10(11), 1-8.
- Stout, S.A., Boon, J.J., Spackman, W., (1988) Molecular aspects of the peatification and early coalification of angiosperm and gymnosperm woods. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(2), 405-414.
- Stout, S.A., Spackman, W., Boon, J.J., Kistemaker, P.G., Bensley, D.F., (1989) Correlations between the microscopic and chemical changes in wood during peatification and early coalification : a canonical variant study. *International Journal of Coal Geology*, 13, 41-64.
- TAPPI, (1974) Standard T222. Acid insoluble lignin in wood and pulp, *Tappi Test methods. Standards Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, Atlanta, GA.
- Teichmuller, M., (1975) Origin of the petrographic constituents of coal. In: G. Borntraeger (Ed.), *Stach's textbook of coal petrology*, pp. 176-238.

- Thonart, P., Paquot, M., Mottet, A., (1979) Hydrolyse enzymatique de pâtes de papeterie. Influence des traitements mécaniques. *Holzforschung*, 33, 197-202.
- Université-du-Maine, Fibres végétales [en ligne]. Disponible sur : < [http://subaru.univ-lemans.fr/enseignement/biologie/01/CoursBV1/A-Introduction/Fibres\\_vegetales.html](http://subaru.univ-lemans.fr/enseignement/biologie/01/CoursBV1/A-Introduction/Fibres_vegetales.html) > (consulté le 8 juillet 2009).
- USDA, (United States Department of Agriculture). Soil Quality Indicators : pH [en ligne]. Disponible sur : < <http://soils.usda.gov/sqi/publications/files/indicate.pdf> > (consulté le 21/07/09).
- Van Bergen, P.F., Collinson, M.E., Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw, J.W., (1994) Chemical and microscopic characterization of outer seed coats of fossil and extant water plants. *Grana Suppl.*, 1, 18-30.
- Van Bergen, P.F., Collinsons, M.E., Briggs, D.E.G., De Leeuw, J.W., Scott, A.C., Evershed, R.P., Finch, P., (1995) Resistant biomacromolecules in the fossils record. *Acta Bot. Neert.*, 44, 319-342.
- Van der Burgh, J., (1973) Hölzer der niederrheinischen Braunkohlenformation, 2. Hölzer der Braunkohlengruben "Maria Theresa" zu Herzogenrath, "Zukunft West" zu Eschweiler und "Victor" (Zülpich Mitte) zu Zülpich. Nebst einer systematisch-anatomischen Bearbeitung der Gattung Pinus L. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 15, 73-275.
- Van Der Burgh, J., Meijer, J.J.F., (1996) *Taxodioxydon gypsaceum* and its botanical affinities. *Current Science*, 70(5), 373-378.
- Van Soest, P.J., (1994) *The nutritional ecology of the ruminant. 2nd edition*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Venkatesan, M.I., Ohta, K., Stout, S.A., Steinberg, S., Oudin, J.L., (1993) Diagenetic trends of lignin phenols in Mahakam Delta coals : correlation between laboratory simulation and natural samples. *Organic Geochemistry*, 20, 463-473.
- Vicuna, R., (1988) Bacterial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 646-655.
- Vietor, R.J., Mazeau, K., Lakin, M., Pérez, S., (2000) A priori crystal structure prediction of native cellulose. *Biopolymers*, 54(5), 342-354.
- Wang, Y.-S., Byrd, C.S., Barlaz, M.A., (1994) Anaerobic biodegradability of cellulose and hemicellulose in excavated refuse samples using a biochemical methane potential assay. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 147-153.
- Weimer, P.J., Lopez-Guisa, J.M., French, A.D., (1990) Effect of cellulose fine structure on kinetics of its digestion by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Applied And Environmental Microbiology*, 56(8), 2421-2429.

- Wickholm, K., Larsson, P.T., Iversen, T., (1998) Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 312(3), 123-129.
- Yaghoubi, K., Pazouki, M., Shojaosadati, S.A., (2008) Variable optimization for biopulping of agricultural residues by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Bioresource Technology*, 99(10), 4321-4328.
- Yang, H., Huang, Y., Leng, Q., LePage, B.A., Williams, C.J., (2005) Biomolecular preservation of Tertiary Metasequoia Fossil Lagerstätten revealed by comparative pyrolysis analysis. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 134(3-4), 237-256.
- Young, L.Y., Frazer, A.C., (1987) The fate of lignin and ligni-derived compounds in anaerobic environments. *Geomicrobiology Journal*, 5(3-4), 261-293.
- Zhang, X., Yu, H., Huang, H., Liu, Y., (2007) Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(3), 159-164.

## **Annexes**

## Lexique

*Argile* : Roche sédimentaire, composée pour une large part de minéraux spécifiques, silicates en général d'aluminium, plus ou moins hydratés

*Basalte* : Roche noire d'origine volcanique

*Calcaire* : Roche sédimentaire formée essentiellement de carbonate de calcium

*Carbonifère* : Ere géologique (entre 365 et 290 millions d'années)

*Carbonification/carbonisation*: Processus par lequel les débris végétaux présents dans la tourbe sont transformés en l'absence partielle d'oxygène et sous l'influence de la température et la pression, en charbon

*Déconvolution* : Reconstruction du spectre RMN expérimental en courbes lorentziennes

*Diagenèse* : Ensemble des phénomènes physico-chimiques transformant un sédiment frais en une roche cohérente

*Diagénétique* : Relatif à la diagenèse, à l'ensemble des phénomènes de consolidation d'un dépôt sédimentaire

*Karst* : Ensemble des formes superficielles et souterraines résultant de la dissolution de roches carbonatées

*Lithologie* : Etude des formations rocheuses

*Lignite* : Roche combustible provenant de la décomposition incomplète de débris végétaux

*Lignitification* : Processus de transformation de la tourbe impliquant l'oxydation de la matière organique suivi par des déméthoxylations, des déméthylations et des réactions de condensation de celle-ci

*Miocène* : Quatrième époque géologique du Tertiaire (entre 24 à 5 millions d'années)

*Moraine* : Relief constitué de l'accumulation de sédiments détachés d'un glacier ou entraînés et déposés par celui-ci

*Perminéralisation* : Processus de fossilisation se produisant après l'enfouissement, quand les espaces vides situés à l'intérieur du végétal se remplissent d'eaux souterraines riches en minéraux et que ces minéraux précipitent en comblant les espaces vides

*Pétrification* : Processus de fossilisation au cours duquel la matière organique des végétaux est remplacée par des minéraux cristallisés

*Pléistocène* : Première période de l'ère Quaternaire

*Pliocène* : Période correspondant à la fin de l'ère Tertiaire

*Quaternaire* : Ere géologique ayant débuté il y a 25 millions d'années (fin du Tertiaire jusqu'à nos jours)



*Sédiment* : Dépôt produit par accumulation de matières dissoutes ou en suspension dans l'air, l'eau ou la glace

*Surincombante* : Qui est étendu par dessus

*Taxodiaceae* : Sous-famille des Cupressacées

*Taxonomie* : Science des lois de la classification

*Tertiaire* : Ere géologique (entre 65 et 2.5 millions d'années) caractérisée par le surgissement des grands systèmes montagneux, la disparition des grands reptiles et l'épanouissement des mammifères

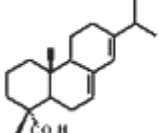
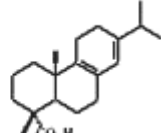
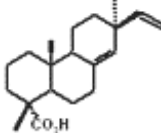
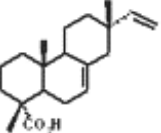
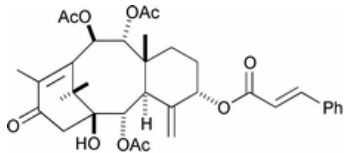
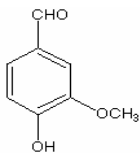
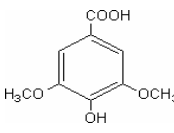
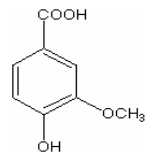
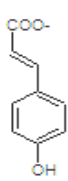
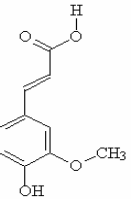
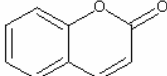
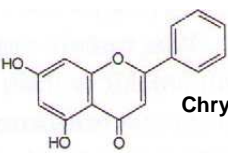
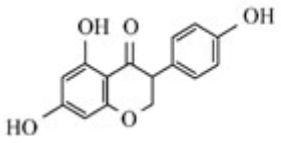
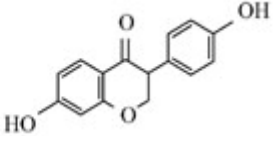
*Tourbe* : Matière brune compacte qui renferme de nombreux vestiges de lignites xyloïdes et parfois des fragments de tronc dont le diamètre atteint 1.5 m

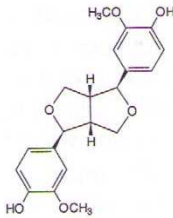
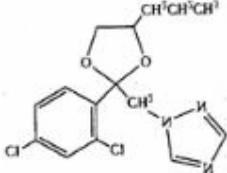
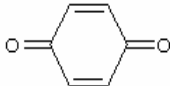
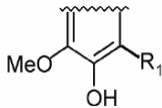
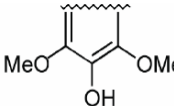
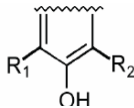
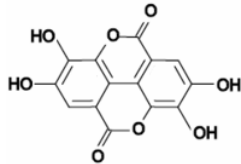
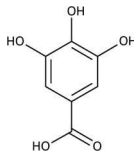
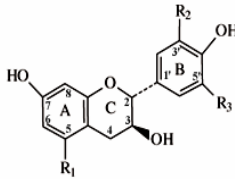
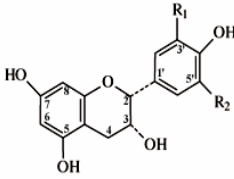
*Turbification* : Processus de constitution d'une tourbière ; processus de décomposition des débris végétaux sous l'action de bactéries et de champignons, en milieu humide et à l'abri de l'air

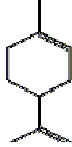




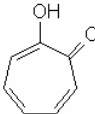
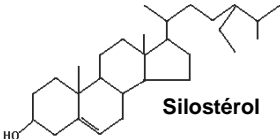
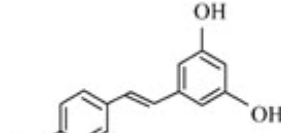
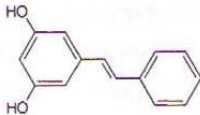
*Xylème secondaire* (appelé familièrement le bois) : système de canaux à l'intérieur des plantes permettant la montée de la sève (eau, sels minéraux).

*Xyloïde* : ressemblant au bois

## Lexique des structures chimiques

<b>Acides résiniques</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>acide abiétique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide palustrique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide pimarique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide isopimarique</p> </div> </div>
<b>Alcaloïdes</b>	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <b>Taxine</b> </div> </div>
<b>Composés d'oxydation de la lignine</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>vanilline</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide syringique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide vanillique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide p-coumarique</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>acide ferulique</p> </div> </div>
<b>Coumarine s</b>	<div style="text-align: center;">  </div>
<b>Flavonoïde s</b>	<div style="text-align: center;">  <p><b>Chrysin</b></p> </div>
<b>Isoflavones</b>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>Genisteine</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Daidzeine</b></p> </div> </div>

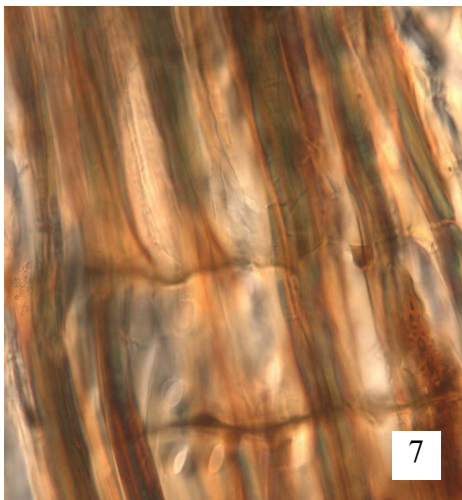
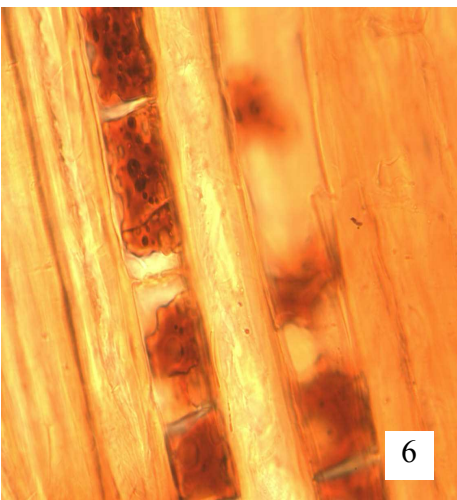
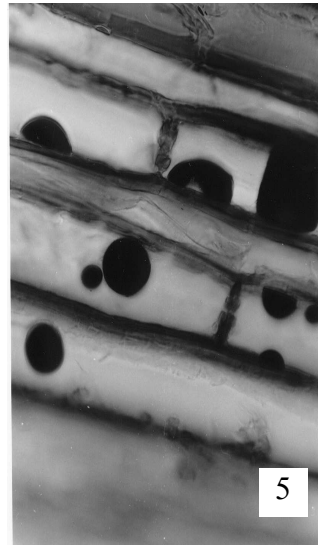
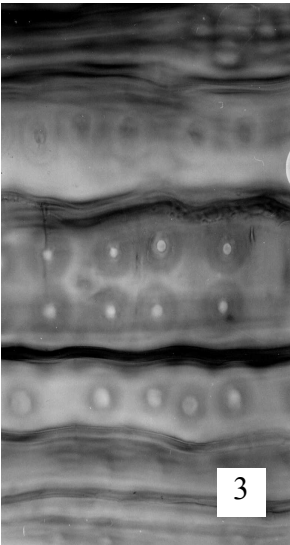
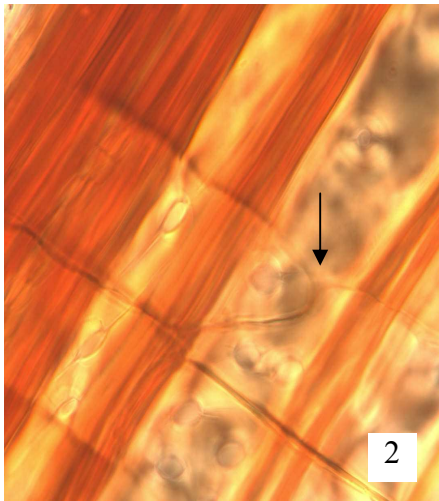
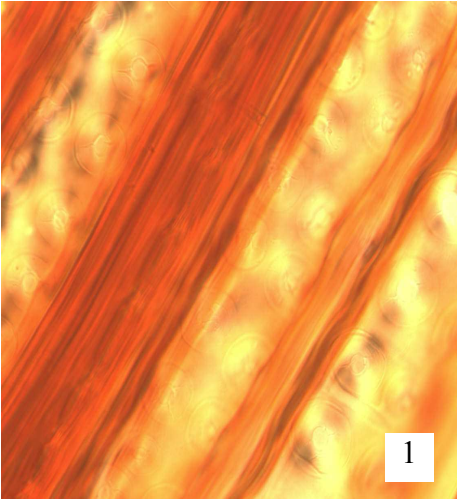
Lignans	 <p style="text-align: center;"><b>Pinoresinol</b></p>
Propiconazole	
Quinones	
Résidus aromatiques de la lignine	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>Unité guaiacyle</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Unité syringyle</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>Unité p-hydroxyphényle</b></p> </div> </div> <p style="text-align: right;">R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H ou lignine</p>
Tannins hydrolysables	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p><b>acide ellagique</b></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>acide gallique</b></p> </div> </div>
Tannins condensés	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div> <p style="text-align: right;">     R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H; Catechin      R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; Gallocatechin      R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H; Afzelechin      R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH; Fisetinidol      R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; Robinetinidol   </p> <p style="text-align: right;">     R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H; Epicatechin      R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; Epiafzelechin      R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH; Epigallocatechin   </p>

<p><b>Terpénoïdes</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>limonène</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>α pinène</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>γ terpinène</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>β pinène</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>linalool</p> </div> </div>
<p><b>Tropolones</b></p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p><b>Stéroïdes</b></p>	<div style="text-align: center;">  <p>Silostérol</p> </div>
<p><b>Stilbènes</b></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Resveratrol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Pinosylvine</p> </div> </div>

## *Planches photographiques*

### **Planche 1**

1. ANDENNE : Section radiale ( x 640) : trachéides avec grandes punctuations aréolées bisériées opposées, présence de barres de Sanio
2. ANDENNE : Section radiale (x 640) : indentures
3. FLORENNES : Section radiale (x 660) : punctuations aréolées des trachéides
4. FLORENNES : Section tangentielle (x 660) : parois verticales de parenchyme de rayon avec localement des épaisissements dits junipéroïdes
5. FLORENNES : Section tangentielle (x 660) : parenchyme vertical diffus, contenant des restes (résines, tannins) colorés
6. KERGUELEN : Section tangentielle (x 640) : parenchyme axial abondant avec remplissage brunâtre
7. KERGUELEN : Section radiale (x 640) : punctuations de champs de croisement cupressoïdes



## Planche 2

1. LAMPERNISSE : Section tangentielle (x 640) : canaux résinifères
2. LAMPERNISSE : Section Radiale (x 640) : ponctuations de champs de croisement pinoïdes
3. MAASMECHELEN : Section tangentielle (x 640) : épaisissements spirales fins, inclinés de  $10^\circ$  à  $25^\circ$  par rapport à la verticale

