

# THESE

pour l'obtention du Grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS  
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac N°523

Secteur de Recherche : **Chimie Organique, minérale, industrielle**

Présentée par :

**Céline ESTOURNEL-PELARDY**

Ingénieur ENSCCF

\*\*\*\*\*

## **Etude de la structure moléculaire de la matière organique des sols. Nouvelles stratégies de dégradation chimique**

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse : André AMBLÈS, Professeur, Université de Poitiers

Co-directeur de Thèse : Laurent GRASSET, Maître de Conférences, Université de Poitiers

\*\*\*\*\*

Soutenue le 21 octobre 2011 devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

### **JURY**

Vincent GROSSI, Directeur de Recherche CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1	<i>Président</i>
Sylvie DERENNE, Directeur de Recherche CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris	<i>Rapporteur</i>
Philippe SCHAEFFER, Directeur de Recherche CNRS, Institut de Chimie de Strasbourg	<i>Rapporteur</i>
Pierre FAURE, Chargé de Recherche CNRS, Université Henri Poincaré de Nancy	<i>Examineur</i>
André AMBLÈS, Professeur, Université de Poitiers	<i>Examineur</i>
Laurent GRASSET, Maître de Conférences, Université de Poitiers	<i>Examineur</i>



*Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe de Géochimie Organique du laboratoire Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles, UMR-CNRS 6514, de l'Université de Poitiers. Cette thèse, dirigée par le professeur André Amblès et le Docteur Laurent Grasset, a bénéficié du soutien financier du Ministère de la Recherche.*

*En préambule de ce mémoire de thèse, je tiens à remercier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail.*

*Monsieur André Amblès, Professeur à l'Université de Poitiers, pour son accueil dans son laboratoire et pour avoir suivi l'avancement de ce travail.*

*Monsieur Vincent Grossi, Directeur de recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Madame Sylvie Derenne, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris et Monsieur Philippe Schaeffer, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut de Chimie de Strasbourg, pour avoir accepté de juger et commenter ce travail.*

*Monsieur Pierre Faure, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré de Nancy, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.*

*Monsieur Laurent Grasset, Maître de Conférences à l'Université de Poitiers, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils avisés. J'ai ainsi pu mener ce travail dans le meilleur environnement possible.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement l'ensemble des permanents du laboratoire pour leurs conseils et les bons moments passés ensemble.*

*Il m'est impossible d'oublier tout ceux qui ont contribué, par leur bonne humeur et leur amitié, à ces trois années : les doctorants géochimistes (Marie-Anne, Hervé, David et Yohan), les organiciens (Marion, Vanessa, Nathalie, Jean, Thibaut et Guillaume) et ceux des autres équipes (Ana-Sofia, Maxime, Thibaut, Alexandre, Rodolphe, Julien, Mario, Benoit) ; les postdocs (Sandrine, Marco, Christophe) ; les stagiaires et plus particulièrement Lucie ;*

*Céline ; Françoise et tous ceux que j'ai côtoyé au cours de cette thèse. Merci à tous pour ces bons moments passés ensemble autour d'un repas, d'un thé ou d'un pain au chocolat...*

*Je terminerai en remerciant mes parents, mes soeurs et tous mes proches, pour leur soutien au quotidien et tout l'amour qu'ils me donnent, et enfin Florian, pour sa présence à mes côtés et le bonheur qu'il m'apporte chaque jour.*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA MATIERE ORGANIQUE DES SOLS ET LES TECHNIQUES D'ANALYSES EMPLOYEES POUR SON ETUDE.....</b>	<b>21</b>
<b>I - Généralités sur la matière organique des sols.....</b>	<b>23</b>
I. 1 - Les molécules biologiques.....	23
I. 1. 1 - Les protéines.....	23
I. 1. 2 - Les polysaccharides.....	24
I. 1. 2. a - La cellulose.....	24
I. 1. 2. b - Les polysaccharides non cellulosiques.....	25
I. 1. 3 - La lignine.....	25
I. 1. 4 - Les tannins.....	27
I. 1. 4. a - Les tannins condensés.....	28
I. 1. 4. b - Les tannins hydrolysables.....	28
I. 1. 5 - Les lipides, la cutine et la subérine.....	29
I. 1. 5. a - Les lipides.....	29
I. 1. 5. b - La cutine.....	29
I. 1. 5. c - La subérine.....	30
I. 2 - Les substances humiques.....	31
<b>II - Analyse de la matière organique présente dans les sols.....</b>	<b>32</b>
II. 1 - Analyses spectroscopiques.....	32
II. 1. 1 - La spectroscopie infrarouge.....	32
II. 1. 2 - La résonance magnétique nucléaire.....	34
II. 1. 3 - La résonance de spin électronique.....	35
II. 2 - Analyse moléculaire de la matière organique des sols.....	36
II. 2. 1 - Dégradations chimiques.....	36
II. 2. 1. a - Généralités.....	36
II. 2. 1. b - Hydrolyse alcaline.....	36
II. 2. 2 - Dégradations thermiques.....	38
II. 2. 2. a - Pyrolyse.....	38

II. 2. 2. b - Thermochimiolyse .....	39
II. 3 - Analyse spécifique des biomolécules de la matière organique des sols .....	43
II. 3. 1 - Analyse des sucres.....	43
II. 3. 1. a - Hydrolyse acide.....	43
II. 3. 1. b - Thermochimiolyse .....	45
II. 3. 2 - Analyse de la lignine .....	47
II. 3. 2. a - Oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II) .....	47
II. 3. 2. b - Thioacidolyse .....	49
II. 3. 2. c - La méthode DFRC.....	51
II. 3. 2. d - Thermochimiolyse .....	54
<b>III - Conclusion .....</b>	<b>56</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>57</b>
<b>CHAPITRE II : FONCTIONNEMENT D'UNE TOURBIERE, PRESENTATION DU SITE D'ETUDE ET CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES .....</b>	<b>75</b>
<b>I - Les tourbières.....</b>	<b>77</b>
I. 1 - Répartition géographique .....	77
I. 2 - L'eau et la formation des tourbières.....	78
I. 3 - Classification .....	80
<b>II - Dynamique de la matière organique dans les tourbières .....</b>	<b>81</b>
II. 1 - Cycle du carbone dans les tourbières .....	81
II. 2 - Production primaire.....	83
II. 3 - Processus de dégradation et préservation de la matière organique dans la tourbe. 84	
II. 3. 1 - Structure diploielmique du haut-marais : notions d'acrotelme et de catotelme .....	84
II. 3. 2 - Processus de dégradation de la matière organique dans l'acrotelme .....	85
II. 3. 3 - Processus de dégradation de la matière organique dans le catotelme.....	85
<b>III - Présentation du site d'étude.....</b>	<b>86</b>
III. 1 - Statut et contexte géographique .....	86
III. 2 - Contexte géologique .....	87
III. 3 - Contexte climatique .....	88
<b>IV - Caractérisations préliminaires de l'échantillon de tourbe étudié.....</b>	<b>88</b>

IV. 1 - Caractérisations globales de l'échantillon principal.....	89
<i>IV. 1. 1 - Datation par le carbone 14</i> .....	89
<i>IV. 1. 2 - Analyse élémentaire</i> .....	89
<i>IV. 1. 3 - Spectroscopie infrarouge</i> .....	89
IV. 2 - Fractionnement de la matière organique de l'échantillon principal .....	91
<i>IV. 2. 1 - Résultat du fractionnement</i> .....	91
<i>IV. 2. 2 - Analyse élémentaire des substances humiques</i> .....	92
<b>V - Conclusion</b> .....	<b>93</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>94</b>
<b>CHAPITRE III : APPLICATION DE LA METHODE "DERIVATIZATION FOLLOWED BY REDUCTIVE CLEAVAGE" (DFRC) A LA MATIERE ORGANIQUE DE SOLS ET DE SEDIMENTS</b> .....	<b>97</b>
<b>I - Caractérisation des lipides liés et des monolignols d'une tourbière ombrotrophe et de ses substances humiques correspondantes par la méthode "Derivatization Followed by Reductive Cleavage" (DFRC)</b> .....	<b>99</b>
<b>II - Comparaison des lipides simples et des lipides liés libérés par la méthode DFRC</b>	<b>122</b>
II. 1 - Fractionnement des lipides libres de la tourbière de Frasne .....	122
II. 2 - Caractérisation des lipides simples de la tourbière de Frasne .....	123
<i>II. 2. 1 - Lipides simples neutres-basiques</i> .....	123
<i>II. 2. 2 - Lipides simples acides</i> .....	129
II. 3 - Comparaison des lipides simples de la tourbière de Frasne et des lipides liés libérés par la méthode DFRC .....	131
II. 4 - Conclusion.....	135
<b>III - Comparaison de trois méthodes d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments : l'oxydation alcaline en présence de CuO, la thermochimiolysse en présence de TMAH et la méthode DFRC</b> .....	<b>136</b>
<b>IV - Conclusion</b> .....	<b>156</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>157</b>
<b>CHAPITRE IV : APPLICATION DE LA THERMOCHIMIOLYSE PREPARATIVE A LA MATIERE ORGANIQUE D'UNE TOURBIERE OMBROTROPHE</b> .....	<b>159</b>

<b>I - Analyse et quantification de la cellulose et des sucres libres d'une tourbière par thermochimiolyse en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium .....</b>	<b>161</b>
<b>II - Thermochimiolyse <i>double-shot</i> appliquée à la fraction organique délipidifiée et aux substances humiques correspondantes d'une tourbière ombrotrophe .....</b>	<b>179</b>
<b>III - Application de la thermochimiolyse <i>double-shot</i> à la fraction organique délipidifiée d'un sol limoneux.....</b>	<b>197</b>
III. 1 - Description de l'échantillon.....	197
III. 2 - Rappel du protocole .....	197
III. 3 - Résultats .....	198
<i>III. 3. 1 - Première thermochimiolyse en présence de HMDS, 300 °C .....</i>	<i>199</i>
<i>III. 3. 2 - Seconde thermochimiolyse en présence de TMAH, 400 °C.....</i>	<i>200</i>
III. 4 - Conclusion .....	201
<b>IV - Conclusion .....</b>	<b>202</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>203</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>205</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>211</b>
<b>I - Précautions .....</b>	<b>213</b>
<b>II - Fractionnement de la matière organique.....</b>	<b>213</b>
II. 1 - Extraction et fractionnement des lipides .....	213
II. 2 - Extraction des substances humiques .....	214
<b>III - Méthode DFRC .....</b>	<b>215</b>
<b>IV - Hydrolyses basiques.....</b>	<b>215</b>
<b>V - Hydrolyses acides.....</b>	<b>216</b>
V. 1 - Protocole .....	216
V. 2 - Conditions d'analyses.....	216
<b>VI - Oxydation alcaline par l'oxyde de cuivre.....</b>	<b>217</b>
<b>VII - Thermochimiolyse préparative .....</b>	<b>217</b>
<b>VIII - Séparations et analyses.....</b>	<b>218</b>



VIII. 1 - Séparations chromatographiques .....	218
<i>VIII. 1. 1 - Chromatographie sur couche mince (CCM)</i> .....	218
<i>VIII. 1. 2 - Chromatographie sur gel de silice</i> .....	218
VIII. 2 - Caractérisations globales.....	218
<i>VIII. 2. 1 - Datation par le carbone 14</i> .....	218
<i>VIII. 2. 2 - Analyse élémentaire</i> .....	219
<i>VIII. 2. 3 - Spectroscopie infra-rouge</i> .....	219
VIII. 3 - Caractérisations fines .....	219
<i>VIII. 3. 1 - Dérivations préalables</i> .....	219
<i>VIII. 3. 1. a - Méthylation des acides carboxyliques</i> .....	219
<i>VIII. 3. 1. b - Acétylation des alcools</i> .....	219
<i>VIII. 3. 2 - Chromatographie gazeuse</i> .....	220
<i>VIII. 3. 3 - Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse</i> .....	220
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>221</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>223</b>
<b>Spectres de masse des composés polycycliques de structures inconnues présents dans les lipides simples neutres-basiques de la tourbe de Frasne .....</b>	<b>225</b>
<b>Spectres de masse des composés polycycliques de structures inconnues présents dans les lipides simples acides de la tourbe de Frasne .....</b>	<b>229</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure I-1: Structure des L- $\alpha$ -acides aminés les plus abondants.....	24
Figure I-2 : Unités de base de la cellulose reliées par une liaison $\beta$ -(1-4)-glycosidique. ....	25
Figure I-3 : Structures des monomères des hémicelluloses. ....	25
Figure I-4 : Structures des différents précurseurs de la lignine.....	26
Figure I-5 : Structure supposée d'une lignine de hêtre (Killops et Killops, 2005).....	27
Figure I-6 : Structure générale des monomères des tannins condensés. ....	28
Figure I-7 : Structure des monomères des tannins hydrolysables.....	28
Figure I-8 : Structure des monomères aliphatiques de cutine et de subérine d'après Kolattukudy (1980a). ....	30
Figure I-9 : Modèles de cutine et de subérine d'après Kolattukudy (1980a).....	30
Figure I-10 : Spectres IRTF d'ordre zéro de la tourbe de la forêt d'Abernethy (absorbance moyenne des différents échantillons) d'après Chapman et al. (2001). ....	34
Figure I-11 : Spectres RMN $^{13}\text{C}$ du solide de différents horizons de sols de la forêt expérimentale de Hubbard Brook, d'après Ussiri et Johnson (2003). ....	35
Figure I-12 : Réaction d'hydrolyse alcaline en présence d'éther couronne 18-C-6.....	37
Figure I-13 : Mécanisme de la thermochimiolyse en présence de TMAH d'après Kossa et al. (1979). ....	39
Figure I-14 : Mécanisme de l'étape d'hydrolyse intervenant lors de la thermochimiolyse en présence de TMAH à l'origine de la rupture des liaisons éthers et esters d'après Challinor (2001). ....	39
Figure I-15 : Mécanisme de la thermochimiolyse en présence de TMAH d'après Sithole (2000). ....	40
Figure I-16 : Exemple de produits libérés par la thermochimiolyse de tannins condensés (cycles B procyanidine <b>PC</b> ou prodelphinidine <b>PD</b> ) et de lignines (guaiacyles <b>G</b> ou syringyles <b>S</b> ) (les carbones $^{13}\text{C}$ -marqués sont indiqués par des étoiles) d'après Nierop et Filley (2008). ....	41
Figure I-17 : Mécanisme de la thermochimiolyse en présence de TMAAc d'après Joll et al. (2004). ....	42
Figure I-18 : Mécanisme de la méthylation lors de la thermochimiolyse en présence de TMSH.....	43
Figure I-19 : Formation d'acides sacchariniques perméthylés lors de la thermochimiolyse du D-glucose en présence de TMAH d'après Fabbri et Helleur (1999). ....	46

Figure I-20 : Monomères ligneux libérés lors de l'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II).....	48
Figure I-21 : Mécanisme de la thioacidolyse d'après Block (1978). .....	50
Figure I-22 : Structures des lignines et de leurs principaux produits de thioacidolyse (Lapierre et al., 2004).....	50
Figure I-23 : Coupure des éthers ligneux par la méthode DFRC (Lu et Ralph, 1997b). .....	52
Figure I-24 : Structure des monomères libérés par la méthode DFRC appliquée à différentes lignines isolées d'après Lu et Ralph (1998a). .....	53
Figure I-25 : Structures de la sylvestamine (a) et de la yangambine (b).....	55
Figure II-1 : Répartition et densité des tourbières à l'échelle mondiale d'après Joosten et Clarke (2002).....	77
Figure II-2 : Processus de développement de la tourbière mis en jeu au cours de l'atterrissement d'une pièce d'eau (Francez, 2000). .....	79
Figure II-3 : Cycle du carbone dans les tourbières d'après Francez (2000). .....	82
Figure II-4 : Productivité moyenne des espèces de sphaignes d'Europe du Nord et d'Amérique du Sud. Le nombre d'observations pour chacune des espèces est indiqué par le chiffre situé à la base des barres (Gunnarsson, 2005).....	84
Figure II-5 : Localisation de la station expérimentale au sein de la tourbière de Frasne (la zone entourée en blanc représente le haut-marais/marais de transition qui est la plus active vis-à-vis de l'accumulation de tourbe).....	87
Figure II-6 : Colonne de tourbe utilisée pour l'analyse et la quantification de la cellulose et des sucres libres de la tourbière ombrotrophe. ....	88
Figure II-7 : Spectre IRTF de la tourbe lyophilisée. ....	90
Figure II-8 : Fractionnement de la matière organique.....	91
Figure III-1 : Fractionnement des lipides libres de la tourbière de Frasne. ....	122
Figure III-2 : Spectre de masse de la taraxénone. ....	124
Figure III-3 : Spectre de masse de l'acétate du $\beta$ -sitostérol. ....	124
Figure III-4 : Fragmentogramme de masse pour $m/z = 71$ des hydrocarbures de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasne.....	125
Figure III-5 : Fragmentation des cétones en CG-SM.....	125
Figure III-6 : Fragmentogramme de masse pour $m/z = 58$ des cétones de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasne. ....	126

Figure III-7 : Mécanismes de formation des méthylcétones.....	126
Figure III-8 : Spectre de masse de la 6,10,14-triméthylpentadéca-2-one.....	127
Figure III-9 : Schéma hypothétique de la bioformation de la 6,10,14-triméthylpentadécan-2-one.....	127
Figure III-10 : Fragmentation des acétates en CG-SM.....	128
Figure III-11 : Fragmentogramme de masse pour $m/z = 61$ des alcools de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasne.....	128
Figure III-12 : Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide abiétique.....	129
Figure III-13 : Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide déhydroabiétique.....	130
Figure III-14 : Fragmentation des esters méthyliques d'acides gras en CG-SM.....	130
Figure III-15 : Fragmentogramme de masse pour $m/z = 74$ des acides gras (identifiés sous la forme d'esters méthyliques) de la fraction acide des lipides simples de la tourbe de Frasne (r : ramifié ; i : iso ; a : anteiso).....	131
Figure III-16 : Structures des composés polycycliques identifiés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC.....	132
Figure III-17 : Fragmentogrammes de masse pour $m/z = 71$ des <i>n</i> -alcanes identifiés dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC.....	133
Figure III-18 : Fragmentogrammes de masse pour $m/z = 61$ des alcools identifiés sous la forme d'acétates dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC.....	134
Figure III-19 : Fragmentogrammes de masse pour $m/z = 74$ des acides gras identifiés sous la forme d'esters méthyliques dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC (r : ramifié ; i : iso ; a: anteiso).....	135
Figure IV-1 : Localisation du site du Deffend.....	197
Figure IV-2 : Chromatogrammes du courant ionique total des produits de thermochemiolyse générés à partir du sol limoneux par le procédé <i>double-shot</i> : (a) HMDS, 300 °C et (b) TMAH, 400 °C et par la thermochemiolyse classique en présence de TMAH (c) (IS : étalon interne, Ax : composés aromatiques, S : sucres, ○: acides gras, ■: ω-méthoxy esters).....	198

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Attribution des bandes infrarouge d'après D'Orazio et Senesi (2009) et Abdulla et al. (2010). .....	33
Tableau I-2 : Attribution des déplacements chimiques en RMN <sup>13</sup> C du solide (Kögel-Knabner, 1997).....	34
Tableau I-3 : Produits principaux de la thermochimiolyse de lignines en présence de TMSH d'après Shadkami et al. (2010). .....	55
Tableau II-1 : Répartition mondiale des tourbières (Francez, 2000). .....	78
Tableau II-2 : Caractéristiques respectives des bas- et haut-marais (Francez, 2000). .....	81
Tableau II-3 : Analyse élémentaire de la tourbe lyophilisée.....	89
Tableau II-4 : Répartition massique des fractions organiques extraites de la tourbe (* les acides fulviques étant obtenus sous forme de sels, la valeur indiquée est obtenue par différence). .....	92
Tableau II-5 : Analyse élémentaire des substances humiques. ....	92
Tableau III-1 : Répartition massique des lipides totaux extraits de la tourbe lyophilisée. ....	122
Tableau III-2 : Répartition massique des lipides simples. ....	123
Tableau III-3 : Teneurs des différentes familles identifiées dans les lipides simples neutres-basiques de la tourbe de Frasne.....	123
Tableau III-4 : Teneurs des différentes familles identifiées dans les lipides simples acides de la tourbe de Frasne. ....	129
Tableau III-5 : Teneurs des lipides simples et des lipides liés libérés par la méthode DFRC de la tourbière ombrotrophe de Frasne. ....	132
Tableau IV-1 : Identification des composés pertriméthylsilylés numérotés sur le chromatogramme du courant ionique total de la première thermochimiolyse en présence de HMDS du sol limoneux (Figure IV-2).....	199
Tableau IV-2 : Identification des composés aromatiques pertriméthylsilylés numérotés sur le chromatogramme du courant ionique total de la seconde thermochimiolyse en présence de TMAH du sol limoneux (Figure IV-2).....	199

Tableau IV-3 : Abondances des produits de thermochimiolyse pertriméthylsilylés générés à partir du sol limoneux pendant le procédé <i>double-shot</i> et pendant la thermochimiolyse classique en présence de TMAH.....	200
---	-----

# LISTE DES ABREVIATIONS

B.P.	:	Before Present (i.e. before 1950)
BSTFA	:	Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CCM	:	Chromatographie sur Couche Mince
CG	:	Chromatographie Gazeuse
CG-SM	:	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CLHP	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
DFRC	:	Derivatization Followed by Reductive Cleavage
DMC	:	Diméthylcarbonate
HMDS	:	Hexaméthylidisilazane
IHSS	:	International Humic Substances Society
IRTF	:	InfraRouge à Transformée de Fourier
M	:	Mol.L <sup>-1</sup>
MOS	:	Matière Organique des Sols
RDTF	:	Réflexion Diffuse par Transformée de Fourier
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
RSE	:	Résonance de Spin Electronique
TBAH	:	Hydroxyde de tétrabutylammonium
TEAAc	:	Acétate de tétraéthylammonium
TEAH	:	Hydroxyde de tétraéthylammonium
TFA	:	Acide trifluoroacétique
THM	:	Thermochimioolyse
TMAAc	:	Acétate de tétraméthylammonium
TMABr	:	Bromure de tétraméthylammonium
TMACO <sub>3</sub>	:	Carbonate de tétraméthylammonium
TMAH	:	Hydroxyde de tétraméthylammonium
TMCS	:	Triméthylchlorosilane
TMSDEA	:	Triméthylsilyldiéthylamine
TMSH	:	Hydroxyde de triméthylsulfonium
TMSI	:	Triméthylsilylimidazole
TPAH	:	Hydroxyde de tétrapropylammonium





# **INTRODUCTION GENERALE**



Les matières organiques des sols conditionnent les propriétés chimiques (stocks de carbone, d'azote et de phosphore) et physiques (perméabilité, stabilité structurale, capacité de rétention et de circulation en eau et à retenir ou transporter les polluants organiques ou les minéraux) du sol. En cela elles forment un compartiment essentiel à la fertilité et à la stabilité des sols. De plus, les matières organiques des sols et des sédiments de surface occupent une position clé dans le cycle du carbone car elles représentent une quantité non négligeable du carbone réduit sur Terre. Porter atteinte de façon conséquente à ce stock, c'est modifier de façon conséquente les autres compartiments du carbone sur Terre. Elles sont donc au sein de problématiques aujourd'hui considérées comme essentielles.

Alors que dans les sols, la matière organique est plus ou moins rapidement minéralisée, dans les milieux hydromorphes ou engorgés (zones humides, tourbières) les conditions anaérobies permettent la formation de "puits de carbone". Une partie de la matière organique échappe ainsi au cycle du carbone et s'accumule. Ces zones humides jouent de plus un rôle hydrogéologique primordial : régulation du débit des cours d'eau, écrêtage des crues, stockage de l'eau et recharge des nappes souterraines. Elles contrôlent aussi les transferts de nutriments et de nombreuses substances toxiques et montrent une particularité biologique considérable. Les zones humides, et notamment les tourbières, présentent également un intérêt géochimique évident : ces stocks importants de carbone organique sont susceptibles d'évoluer à long terme vers la formation de kérogène, matière organique insoluble qui représente actuellement environ 95 % du carbone organique terrestre. Comprendre les mécanismes de cette accumulation peut s'avérer essentiel pour la gestion des stocks de carbone sur Terre.

Néanmoins, la complexité de la structure et des mécanismes de la dynamique de la matière organique bride encore notre connaissance fine à leurs sujets. Aborder un tel système complexe ne peut se faire évidemment que par un ensemble d'approches variées et complémentaires.

En pratique, des caractérisations globales par analyse élémentaire et/ou spectroscopies (infrarouge, résonance magnétique nucléaire du proton, du carbone ou de l'azote, résonance de spin électronique, ...) permettent de mettre en évidence les principales fonctions chimiques présentes. Une caractérisation plus fine nécessite cependant l'emploi de techniques de dégradation par voie thermique (pyrolyse ou thermochimioolyse) et/ou chimique. Ces dernières dépendent de la matière organique à analyser et plus particulièrement de la spécificité des motifs ciblés.

Ici, la mise au point de nouvelles méthodes de dégradation thermiques et chimiques a été effectuée sur des échantillons provenant de la tourbière ombrotrophe de Frasné dans les montagnes du Jura.

Après un bref rappel, lors d'un premier chapitre, des principales techniques d'analyses chimiques et thermiques employées aujourd'hui pour l'étude des matières organiques, des informations sur le fonctionnement des tourbières, la présentation du site d'étude et les caractérisations préliminaires effectuées sur l'échantillon étudié sont exposées dans un deuxième chapitre.

Utilisée dans la chimie du bois pour l'analyse des motifs ligneux, la méthode "Derivatization Followed by Reductive Cleavage" (DFRC) reste très peu employée pour l'analyse de la matière organique des sols et des sédiments. Pourtant, sa spécificité (rupture sélective des liaisons  $\beta$ -aryl éthers) peut en faire une méthode de choix pour l'analyse des monomères ligneux mais également des composés lipidiques macromoléculaires. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus par l'application de cette méthode sur la tourbe et les substances humiques correspondantes. Une comparaison avec les méthodes classiques d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments (oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre et thermochimiolyse en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium) est également présentée.

La thermochimiolyse, principalement réalisée en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium, est une technique de dégradation thermique rapide et efficace pour analyser les macromolécules organiques. Cependant, la recherche de nouveaux agents s'avère nécessaire pour améliorer sa sélectivité et obtenir de nouvelles informations sur la composition, l'origine et la nature de la matière organique des sols et des sédiments. Le quatrième et dernier chapitre présente ces résultats. Il y est montré que la thermochimiolyse préparative en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium permet l'analyse de sucres habituellement cachés à l'hydrolyse acide, la méthode classique pour leur analyse. Un nouveau procédé de thermochimiolyse *double-shot* impliquant deux thermochimiolyses successives avec des agents de dérivation de force croissante : l'hexaméthylidisilazane et l'hydroxyde de tétraméthylammonium est également présenté.

**CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA  
MATIERE ORGANIQUE DES SOLS ET LES  
TECHNIQUES D'ANALYSES EMPLOYEES  
POUR SON ETUDE**



## **I - GENERALITES SUR LA MATIERE ORGANIQUE DES SOLS**

La matière organique des sols (MOS) est l'ensemble des composés organiques issus de résidus d'organismes vivants à différents stades de décomposition.

Source majeure de carbone et d'énergie pour les microorganismes, la MOS constitue le substrat indispensable au développement de la vie biologique et joue donc un rôle clé dans la fertilité des sols et le cycle du carbone sur terre.

Elle est constituée de différents composés organiques de hauts poids moléculaires (polysaccharides, protéines, lipides, ...), de substances plus simples (sucres, acides aminés, petites molécules organiques, ...) et de substances humiques.

### **I. 1 - Les molécules biologiques**

#### *I. 1. 1 - Les protéines*

Les protéines remplissent des rôles très divers dans le monde vivant (enzymes, protéines de transport ou de structure, régulateurs). Elles sont constituées de polypeptides, longues chaînes d'acides aminés neutres, acides ou basiques (Figure I-1). Les protéines présentes dans les sols sont issues des végétaux et des microorganismes, ces derniers étant également en grande partie responsables de leur décomposition.

Les protéines et leurs produits de dégradation (peptides et acides aminés) représentent les composés organiques azotés les plus abondants dans les sols (40-60 %) (Schulten et Schnitzer, 1997) et sont des composants clés du cycle de l'azote (Roberts et Jones, 2008). L'extraction et l'analyse des protéines des sols apparaissent donc comme de bons indicateurs de l'évolution de l'écosystème du sol. Singleton et al. (2003) ont ainsi montré que l'extraction directe des protéines du sol pouvait être utilisée pour évaluer la réponse des communautés microbiennes des sols aux changements environnementaux.

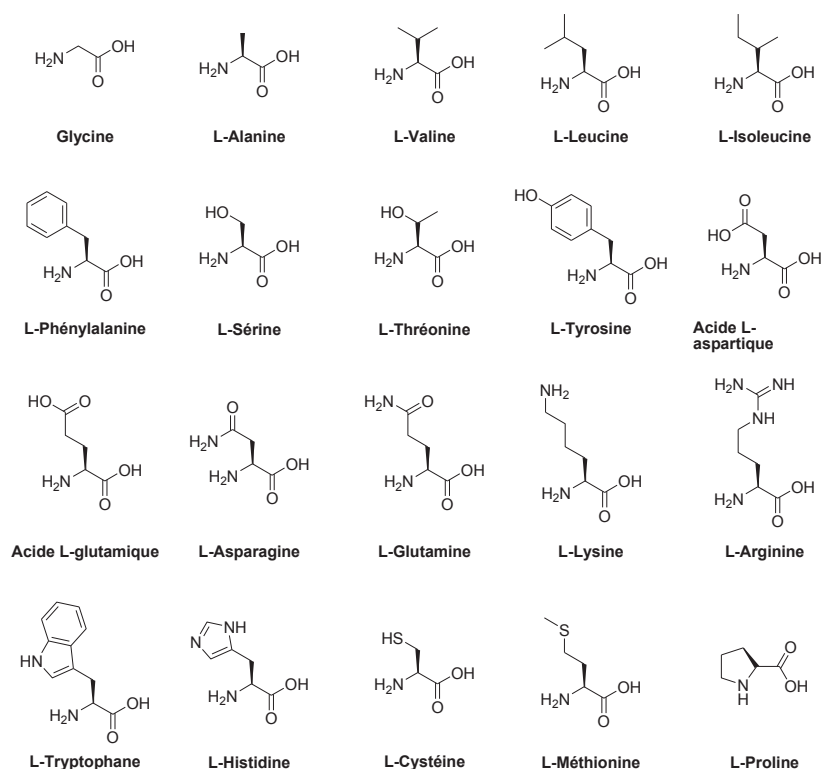


Figure I-1: Structure des L- $\alpha$ -acides aminés les plus abondants.

### I. 1. 2 - Les polysaccharides

Les polysaccharides représentent entre 5 et 25 % de la MOS et sont présents sous la forme de sucres simples et de polyoses. Ils peuvent être indicateurs de l'origine et de la dynamique de la MOS. Ainsi, comme la cellulose et les hémicelluloses, les sucres simples (pentoses et hexoses) sont caractéristiques des végétaux supérieurs. Par exemple, les cyperacées sont riches en xylose et en arabinose (Moers et al., 1989 ; Moers et al., 1990 ; Wicks et al., 1991 ; Bourdon et al., 2000 ; Comont et al., 2006) tandis que le galactose, le mannose et le rhamnose sont présents dans les sphaignes (Moers et al., 1989 ; Moers et al., 1990 ; Wicks et al., 1991). Le fucose est, quant à lui, un marqueur microbien (Comont et al., 2006).

#### I. 1. 2. a - La cellulose

Constituant majeur des parois des cellules végétales, la cellulose est le biopolymère le plus abondant du monde végétal. Il s'agit d'un polymère linéaire constitué d'unités de glucose (> 10 000) liées par des liaisons  $\beta$ -(1-4)-glycosidiques (Figure I-2). L'arrangement régulier des groupements hydroxyles le long de la chaîne conduit à la formation de liaisons hydrogène et à une structure fibreuse possédant des propriétés cristallines (Faulon et al., 1994). De plus,



les fibres de cellulose forment une structure de base étroitement associée aux hémicelluloses et à la lignine dans les parois des cellules du bois.

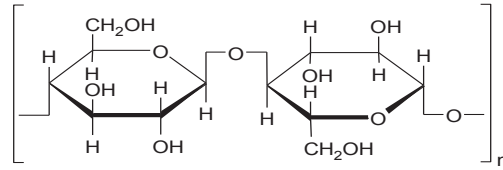


Figure I-2 : Unités de base de la cellulose reliées par une liaison  $\beta$ -(1-4)-glycosidique.

*1. 1. 2. b - Les polysaccharides non cellulosiques*

Les polysaccharides non cellulosiques sont souvent nommés hémicelluloses ou polyoses (Killops et Killops, 2005). Il s'agit d'un groupe de polysaccharides de composition variée qui diffère de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition monosaccharidique (Figure I-3). Ils présentent généralement des chaînes latérales plus ou moins ramifiées et un degré de polymérisation inférieur à celui de la cellulose. Les xylanes, les mannanes, les glucomannanes et les galactanes en sont des exemples.

Les pectines sont également des polysaccharides non cellulosiques. Complexes et fortement ramifiées, elles sont principalement constituées de galactose, d'arabinose, et d'acides hexuroniques. Elles jouent le rôle de liaison intercellulaire principalement chez les végétaux et les fruits.

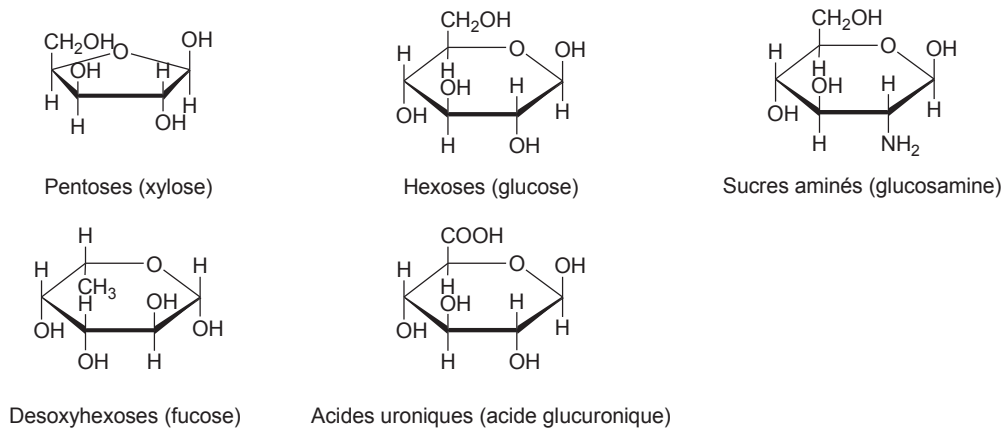


Figure I-3 : Structures des monomères des hémicelluloses.

*1. 1. 3 - La lignine*

Après les polysaccharides, la lignine est le biopolymère le plus abondant dans la nature. Elle représente environ 30 % en masse du bois (Donaldson, 2001). C'est une macromolécule tridimensionnelle hydrophobe de haut poids moléculaire constituée d'unités

phénylpropanes qui permet la cohésion intercellulaire et protège les cellules du bois des attaques des microorganismes.

Les unités structurales de la lignine, appelées monolignols, sont les alcools *p*-coumarylique, coniférylique, et sinapylique (Figure I-4) conduisant respectivement à la formation d'unités *p*-hydroxyphényles, guaiacyles et syringyles. Ces monomères réagissent selon une réaction de polymérisation déshydrogénative afin de former une macromolécule tridimensionnelle contenant une multitude de liaisons C-C et de liaisons éther pour la plupart non hydrolysables (Figure I-5). La proportion des monomères et la nature des liaisons intermoléculaires sont très variables et dépendent de l'origine botanique, du tissu et de la localisation dans la paroi. Les liaisons de type  $\beta$ -O-4 entre le carbone  $\beta$  de la chaîne propényle et l'oxygène du phénol sont cependant les plus nombreuses quelle que soit l'origine de l'échantillon. En revanche, la composition de la lignine varie en fonction de l'origine des végétaux. Ainsi, la lignine des gymnospermes est majoritairement constituée d'unités guaiacyles alors que la lignine des angiospermes contient des quantités équivalentes d'unités guaiacyles et syringyles. Les deux types de végétaux contiennent également de faibles proportions d'unités *p*-hydroxyphényles (Donaldson, 2001 ; Killops et Killops, 2005).

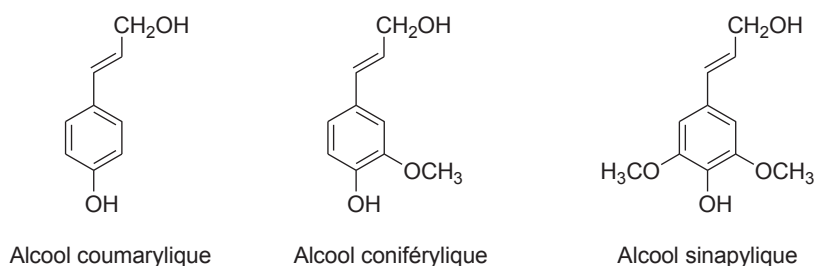


Figure I-4 : Structures des différents précurseurs de la lignine.

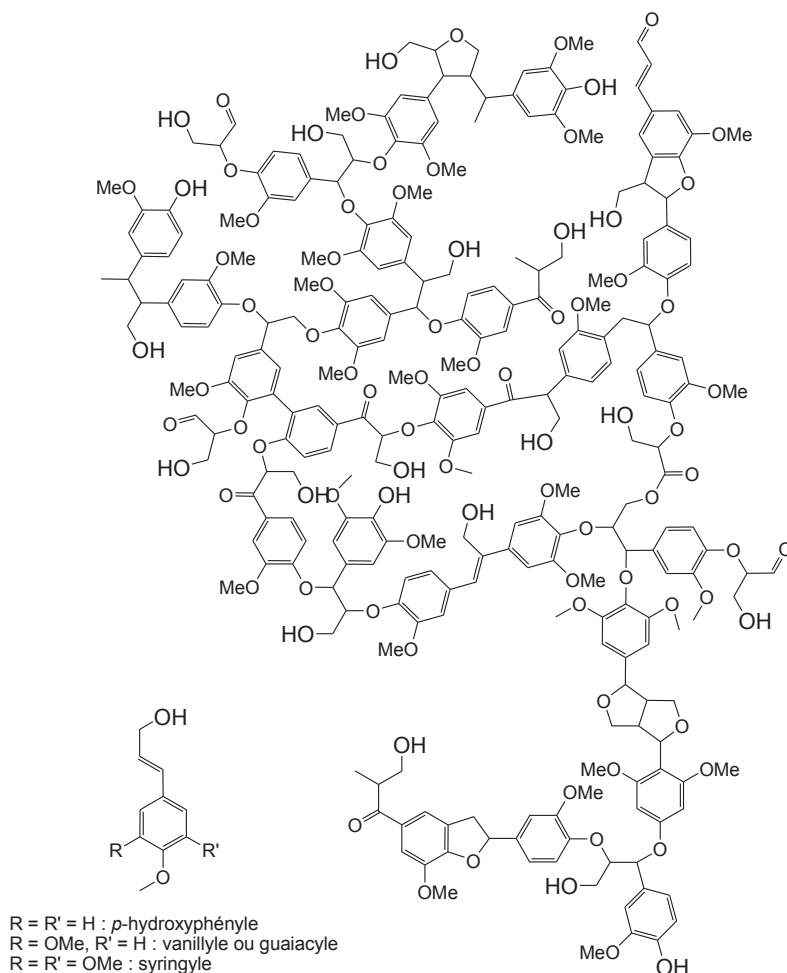


Figure I-5 : Structure supposée d'une lignine de hêtre (Killops et Killops, 2005).

Les lignines sont très résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques et sont donc difficilement dégradées. Seules certaines bactéries aérobies (actinomycètes) et quelques champignons (ascomycètes et basidiomycètes) sont capables de dégrader la lignine (Kirk et Farrell, 1987).

L'analyse de la lignine est utilisée pour déterminer les apports végétaux, comprendre les processus de sa décomposition et de son incorporation dans les sols et les sédiments et suivre ainsi les possibles changements environnementaux.

#### *I. 1. 4 - Les tannins*

Les tannins sont des polyphénols présents dans de nombreux végétaux. Ils jouent, entre autres, un rôle important de défense contre les organismes phytophages. Ils participent aussi à des réactions photochimiques et d'oxydoréduction, à l'immobilisation de l'azote et à la complexation de cations. Ils sont également considérés comme des précurseurs des substances humiques par la formation de quinones (Hernes et Hedges, 2000 ; Hernes et Hedges, 2004).

Tout comme la lignine, la structure des tannins est génétiquement liée à des sources botaniques spécifiques. L'analyse de la composition chimique des tannins peut donc donner des indices sur l'origine de la végétation d'un sol et les processus de son fonctionnement (Kanerva et al., 2006 ; Halvorson et al., 2009). Les tannins sont des composés polyfonctionnels de poids moléculaire conséquent et leur analyse dans les sols et les sédiments reste donc encore limitée.

Deux grands groupes peuvent être distingués : les tannins condensés ou non hydrolysables et les tannins hydrolysables.

#### *I. 1. 4. a - Les tannins condensés*

Les tannins condensés sont des polyphénols constitués d'unités poly-hydroxy-flavan-3-ols (généralement moins de 10) liées par des liaisons C-C entre les carbones C-4 et C-8 (Figure I-6) et plus rarement, dans le cas de ramifications, entre les carbones C-4 et C-6. La présence de différents groupes fonctionnels induit une grande hétérogénéité de composés.

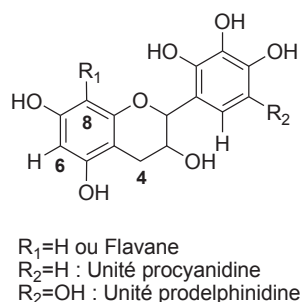


Figure I-6 : Structure générale des monomères des tannins condensés.

#### *I. 1. 4. b - Les tannins hydrolysables*

Les tannins hydrolysables possèdent deux unités de base : un sucre (généralement le glucose) et un acide phénolique. Ils forment un groupe hétérogène de macromolécules qui peuvent être classées en deux catégories : les gallotannins dont l'unité centrale de type sucre est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique et les ellagitannins dont l'unité phénolique de base est l'acide ellagique (Figure I-7).

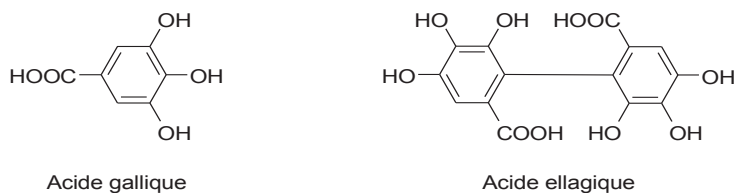


Figure I-7 : Structure des monomères des tannins hydrolysables.

*I. 1. 5 - Les lipides, la cutine et la subérine*

*I. 1. 5. a - Les lipides*

Les lipides sont des substances organiques insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (chloroforme, hexane, diéthyl éther ou benzène).

Les lipides présents dans les sols peuvent être classés en deux fractions : les lipides simples ou libres et les lipides complexes ou macromoléculaires. Les lipides simples regroupent, entre autres, les hydrocarbures (alcanes, alcènes), les glycérides (monoglycérides, diglycérides, triglycérides, phospholipides, glycolipides, éthers lipidiques), les acides gras et les alcools gras. Ils sont principalement issus des végétaux et des microorganismes. Ceux issus de la mésofaune et de la macrofaune ne sont présents qu'en faibles quantités. Les lipides complexes sont des macromolécules polaires, peu solubles et donc difficilement analysables par des techniques classiques de chromatographie en phase gazeuse. Leur étude nécessite donc l'utilisation de la chromatographie en phase liquide ou l'emploi de méthodes de dégradation.

Les lipides totaux peuvent être fractionnés en famille de polarités ou de fonctions chimiques. Une méthode, introduite par McCarthy et Duthie (1962), utilise de la silice acide imprégnée de potasse et permet la séparation des lipides neutres et des lipides acides. D'autres techniques d'extraction sur phase solide peuvent également être utilisées (Bull et al., 1998 ; Fiorentino et al., 2006). Dans ce cas, des cartouches contenant une phase aminopropyle sont employées et les lipides sont, comme précédemment, séparés en fractions neutres et acides. Enfin, les lipides totaux peuvent être fractionnés sur silice acide (Dickson et al., 2009). Trois fractions sont alors obtenues en fonction du solvant d'élution : les lipides simples (élution avec du chloroforme/acide acétique, 100/1, v/v), les glycolipides (élution avec de l'acétone) et les phospholipides (élution avec du méthanol).

*I. 1. 5. b - La cutine*

La cutine, associée aux cires et aux graisses, forme la cuticule des plantes. Celle-ci couvre l'épiderme de la plante et la protège ainsi contre le dessèchement. Les polymères de la cutine sont composés d'acides gras hydroxylés de longueur de chaîne C<sub>16</sub> ou C<sub>18</sub>. Ces acides peuvent être époxydés, di- ou tri-hydroxylés (Figure I-8 et Figure I-9). La composition de ces polymères dépend de l'espèce de la plante, de son stade de développement et des conditions environnementales (Kolattukudy, 1980a ; Kolattukudy, 1980b). Ces motifs sont souvent mis

en évidence après la dégradation chimique ou thermique des sols (Nierop, 2001 ; Garcette-Lepecq et al., 2004 ; Quénéa et al., 2004).

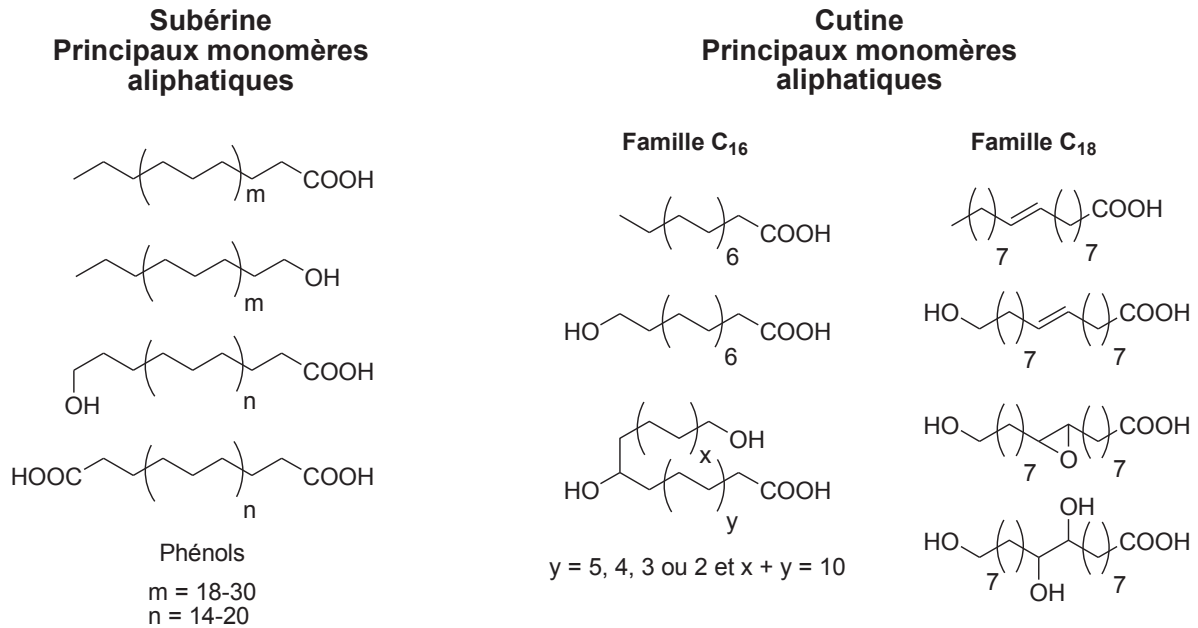


Figure I-8 : Structure des monomères aliphatiques de cutine et de subérine d'après Kolattukudy (1980a).

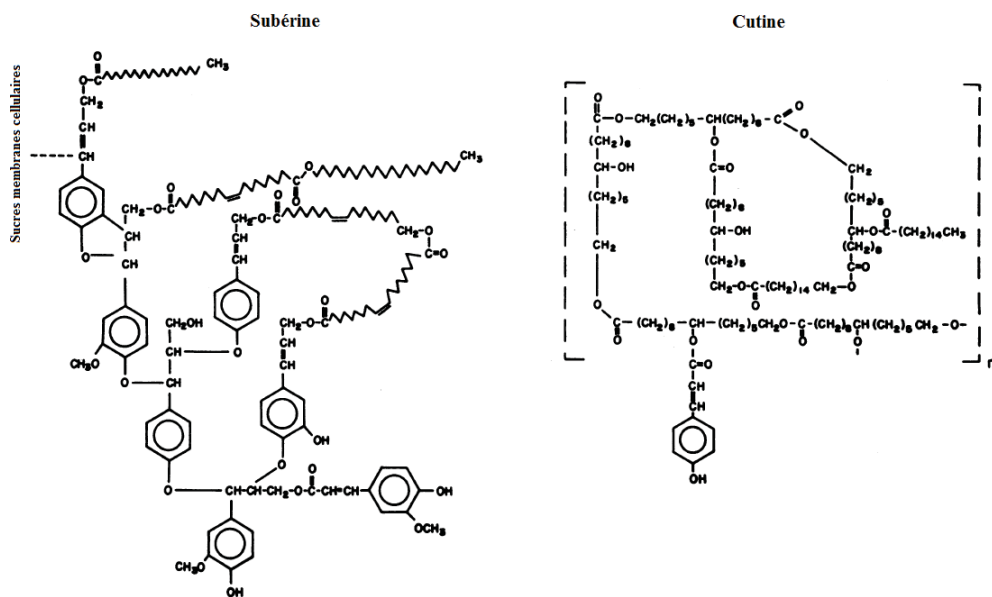


Figure I-9 : Modèles de cutine et de subérine d'après Kolattukudy (1980a).

### I. 1. 5. c - La subérine

La subérine est un constituant des parois cellulaires du bois. Elle est le composé principal du liège. Elle est formée de composés aliphatiques et aromatiques (Figure I-8 et Figure I-9). Contrairement à la cutine, elle peut posséder des monomères à longue chaîne

carbonée (C<sub>20</sub>-C<sub>30</sub>) et en particulier des alcan-1-ols, des acides gras, des acides gras  $\omega$ -hydroxylés et des acides  $\alpha,\omega$ -dioïques de longueur de chaîne C<sub>16</sub> ou C<sub>18</sub>. La subérine contient également des acides phénoliques et notamment des acides hydroxycinnamiques (Kolattukudy, 1980a ; Kolattukudy, 1980b). A l'instar de la cutine, les monomères subéreux sont identifiés après dégradation de la matière organique des sols et des sédiments (Nierop et al., 2003 ; Naafs et al., 2005).

## I. 2 - Les substances humiques

Les substances humiques sont les principaux composants de la matière organique naturelle dans les sols et les sédiments. Elles sont présentes dans tous les écosystèmes, sous la forme d'un ensemble moléculaire provenant de la dégradation et de la transformation de la matière organique. Elles jouent notamment un rôle clé pour la fertilité des sols en améliorant sa structure, en augmentant l'activité biologique et la disponibilité des nutriments et en complexant les métaux toxiques (Stevenson, 1985).

Elles sont considérées comme un mélange complexe et hétérogène de matériaux polydispersés formés à partir de diverses biomolécules de l'environnement et par dégradation d'organismes morts. Le processus de dégradation et de minéralisation conduisant à la formation de ces substances est appelé humification. Ce terme est également défini comme la stabilisation prolongée des substances organiques contre la biodégradation (McDonald et al., 2004).

Les substances humiques des sols sont souvent classées en trois catégories de composés : les acides fulviques, les acides humiques et l'humine. Les acides fulviques correspondent à la fraction soluble dans l'eau quel que soit le pH. Ce sont des substances de poids moléculaire modéré. Les acides humiques correspondent à la fraction soluble dans l'eau à pH basique mais insoluble dans l'eau à pH acide (pH = 1-2). Ce sont des substances de plus haut poids moléculaire. Enfin, l'humine correspond à la fraction insoluble dans l'eau quel que soit le pH. L'humine est généralement la forme majoritaire de la MOS. Sa nature réfractaire résulte de sa structure moléculaire mais aussi de fortes interactions avec les minéraux argileux ou les métaux. Afin de pouvoir analyser sa structure moléculaire, il est parfois nécessaire d'extraire l'humine de cette matrice inorganique (Fabbri et al., 1996 ; McDonald et al., 2004).

La Société Internationale des Substances Humiques (IHSS) recommande une procédure générale pour fractionner et isoler ces substances humiques (Calderoni et Schnitzer, 1984).

Les différentes caractérisations moléculaires des substances humiques ont montré qu'elles étaient constituées en partie de molécules directement héritées des végétaux et des microorganismes des sols mais aussi de molécules partiellement remaniées. La structure moléculaire d'une part importante des substances humiques, sujette à de nombreuses controverses, reste cependant encore inconnue aujourd'hui (Piccolo, 2001 ; Killops et Killops, 2005).

## **II - ANALYSE DE LA MATIERE ORGANIQUE PRESENTE DANS LES SOLS**

Un grand nombre d'approches analytiques est utilisé pour analyser qualitativement et quantitativement la nature moléculaire de la MOS. Ainsi, à côté des techniques d'analyse spectroscopique, des méthodes de dégradation, chimiques ou thermiques, sont employées. Ces méthodes permettent de libérer des fragments moléculaires issus de substances humiques ou de biopolymères (tels que la cutine, la subérine, la lignine ou la cellulose) présents dans les sols. Ces unités moléculaires nous renseignent sur les origines et les degrés de transformation de la MOS.

### II. 1 - Analyses spectroscopiques

#### *II. 1. 1 - La spectroscopie infrarouge*

La spectroscopie infrarouge peut fournir rapidement des informations sur la composition de la MOS lorsqu'elle est utilisée en mode RDTF (Réflexion Diffuse par Transformée de Fourier). Elle permet une analyse des groupes fonctionnels de l'échantillon (Tableau I-1). Cette technique présente plusieurs avantages : elle est rapide, simple d'utilisation, sensible, peu onéreuse, non destructive et ne requiert que quelques milligrammes d'échantillon. Cependant, les spectres obtenus sont invariablement très complexes de par la superposition d'un grand nombre de bandes d'absorption.



Longueur d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Vibration	Groupes fonctionnels associés
3400	O-H	Alcools liés et non liés ; eau
3180-3090	NH <sub>2</sub>	Amines I
3080-3030	C-H	CH <sub>2</sub> aromatiques
2920-2850	C-H	CH <sub>2</sub> et CH <sub>3</sub> aliphatiques
1740-1720	C=O	Aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, esters
1640	C=O	Amides I, carboxylates
	C=C	Alcènes, aromatiques
1620-1600	C=C	Aromatiques
1600	N-H	Amines
1570-1540	N-H	Amides II
1515-1505	C=C	Aromatiques
1425	COO <sup>-</sup>	Acides carboxyliques
1320	C-N	Amines aromatiques I et II
1265-1240	C-O	Acides carboxyliques, aryl éthers et phénols
	C-N	Amides III
1170-1120	C-OH	Alcools aliphatiques
1080-1010	C-O-C, C-O	Polysaccharides

Tableau I-1 : Attribution des bandes infrarouge d'après D'Orazio et Senesi (2009) et Abdulla et al. (2010).

Cette technique a couramment été utilisée pour l'analyse des substances humiques : acides humiques (Shin et al., 1999 ; González Pérez et al., 2004 ; Shirshova et al., 2006 ; Meissl et al., 2007 ; González-Pérez et al., 2008 ; Francioso et al., 2009), acides fulviques (Gondar et al., 2005 ; Dai et al., 2006) et humine (Russell et al., 1983).

Appliquée à des échantillons de tourbe, l'analyse par spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) (Chapman et al., 2001) a permis la mise en évidence de pics d'absorbance caractéristiques des sucres ou polysaccharides (1061 cm<sup>-1</sup>), des "carboxylates" (R-COO<sup>-</sup> : 1630 cm<sup>-1</sup>) et des structures aliphatiques (CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> : 2800-3000 cm<sup>-1</sup>) représentés sur la Figure I-10.

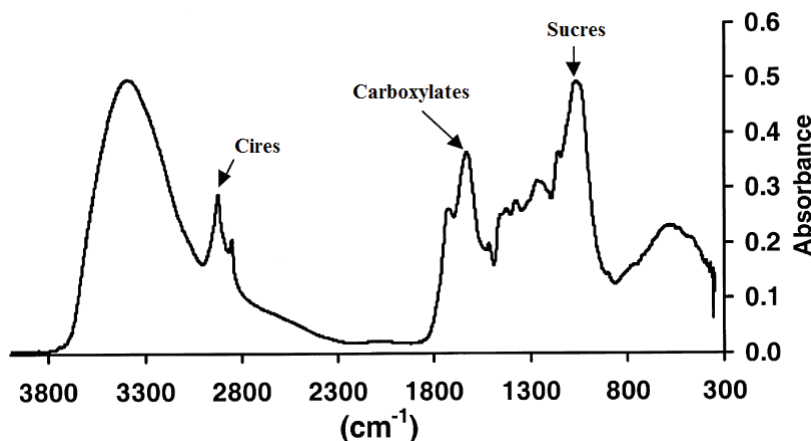


Figure I-10 : Spectres IRTF d'ordre zéro de la tourbe de la forêt d'Abernethy (absorbance moyenne des différents échantillons) d'après Chapman et al. (2001).

### II. 1. 2 - La résonance magnétique nucléaire

Les spectroscopies de résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone  $^{13}\text{C}$  et de l'azote  $^{15}\text{N}$  sont couramment utilisées pour la caractérisation de la composition de la MOS (Tableau I-2). Le développement de la technique de polarisation croisée a permis une évolution significative des spectroscopies RMN du solide du carbone  $^{13}\text{C}$  et de l'azote  $^{15}\text{N}$ . Elle permet en effet un gain non négligeable en sensibilité en transférant la magnétisation des spins des hydrogènes  $^1\text{H}$  très abondants vers les spins des carbones  $^{13}\text{C}$  et des azotes  $^{15}\text{N}$  plus rares. Elle permet également un temps d'analyse plus court, le temps de relaxation du proton étant généralement inférieur à ceux du carbone et de l'azote. Ainsi, couplée à la technique de l'angle magique de spin (nécessaire pour compenser l'anisotropie des échantillons solides), elle permet d'obtenir des informations structurales sur la MOS des sols sans extraction préalable (Kögel-Knabner, 1997).

Déplacements chimiques (ppm)	Attribution
0-45	C aliphatiques saturés
45-110	C substitués par un ou plusieurs hétéroatomes
110-160	C aromatiques
160-220	C carboxyliques

Tableau I-2 : Attribution des déplacements chimiques en RMN  $^{13}\text{C}$  du solide (Kögel-Knabner, 1997).

A titre d'exemple, la Figure I-11 représente les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du solide d'échantillons de différents horizons Oa, Bh et Bs1 d'un sol sous forêt (Ussiri et Johnson,

2003). Le pic large identifié à 31 ppm correspond aux carbones aliphatiques. Les pics à 57, 73 et 104 ppm sont associés aux carbones des groupements méthoxy présents dans les lignines (57 ppm) et dans les sucres (73 et 104 ppm). Les pics à 112, 128 et 131 ppm suggèrent la présence de cycles aromatiques non substitués (alkylbenzènes par exemple) mais peuvent également correspondre aux carbones aromatiques des structures ligneuses. Enfin, le pic à 174 ppm correspond aux carbones carboxyliques. Cette étude par RMN  $^{13}\text{C}$  du solide montre ici une diminution des signaux avec la profondeur ce qui pourrait indiquer une dégradation de la lignine.

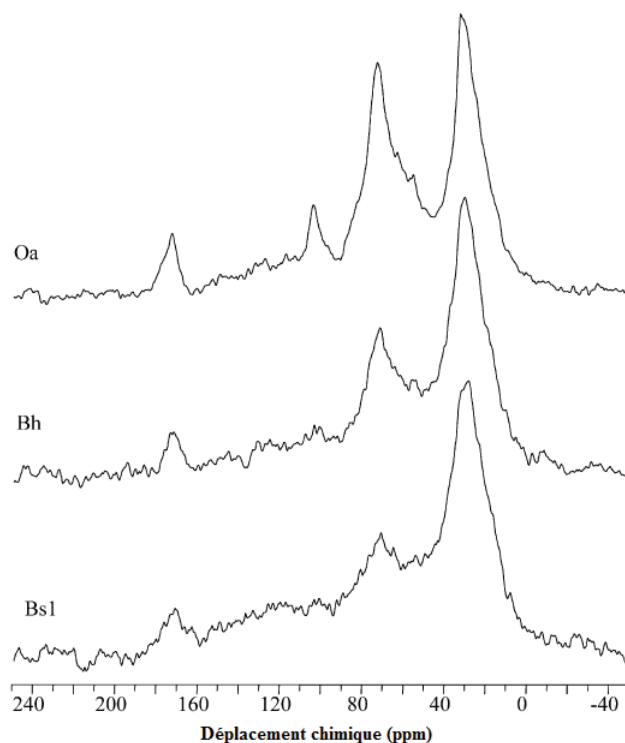


Figure I-11 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  du solide de différents horizons de sols de la forêt expérimentale de Hubbard Brook, d'après Ussiri et Johnson (2003).

### II. 1. 3 - La résonance de spin électronique

La résonance de spin électronique (RSE) fournit des informations sur les espèces contenant des électrons non appariés. Dans le cas de la MOS, cela concerne principalement les radicaux libres. Cette technique permet d'obtenir d'importantes informations sur la résistance de la MOS à la dégradation microbienne. En effet, les radicaux libres présents dans la MOS proviennent de structures aromatiques connues pour être plus résistantes à la décomposition biologique que d'autres structures issues, par exemple, des polysaccharides ou des protéines (Kögel-Knabner, 2000 ; Bayer et al., 2006).

Cette technique a notamment permis d'étudier les radicaux libres ou éphémères d'acides humiques dérivés de composts, de sols, de tourbe et de lignite brun (Jeziarski et al., 2000).

## II. 2 - Analyse moléculaire de la matière organique des sols

Afin d'obtenir plus d'informations sur la structure fine des biogéomacromolécules, une des voies possibles nécessite de les dégrader, chimiquement ou thermiquement, et ainsi, de les dépolymériser pour pouvoir en analyser les unités moléculaires.

### *II. 2. 1 - Dégradations chimiques*

#### *II. 2. 1. a - Généralités*

De nombreuses méthodes de dégradation chimique sont connues pour l'analyse moléculaire de la matière organique des sols et des sédiments. Les réactions utilisées à cet effet peuvent être peu sélectives et toucher un grand nombre de fonctions, ou au contraire, cibler un type particulier de groupement chimique.

Les réactions d'oxydation ont notamment permis l'identification d'un grand nombre de structures présentes dans les substances humiques (Grasset, 1997 et références citées). De nombreux oxydants sont utilisés, dont les principaux sont le permanganate de potassium, le tétr oxyde de ruthénium et l'oxyde de cuivre. De même, les substances humiques peuvent être étudiées par différentes méthodes de dégradation en conditions réductrices (Grasset, 1997 et références citées). Les principaux réactifs utilisés sont la poudre de zinc, le sodium dans l'ammoniaque, le sulfure de sodium et l'amalgame de sodium.

Parmi les réactions de dégradation spécifiques, la transestérification par le complexe trifluorure de bore-méthanol et l'hydrolyse alcaline (décrite ci-dessous) sont spécifiques des liaisons esters tandis que le tribromure de bore ou l'iodure d'hydrogène sont spécifiques des liaisons éthers.

#### *II. 2. 1. b - Hydrolyse alcaline*

L'hydrolyse alcaline est une méthode couramment utilisée pour l'étude des kérogènes (Vitorovic, 1980) et des substances humiques (Stevenson, 1982). Cependant, en raison de l'extrême complexité de la matière organique étudiée, les rendements obtenus sont faibles. Des problèmes d'encombrement stérique limitent fortement l'accessibilité de certaines fonctions esters dissimulées au cœur du réseau tridimensionnel. Pour remédier à ce problème,

des catalyseurs de transfert de phase, de type éther couronne par exemple, sont utilisés. En solubilisant la potasse dans le solvant organique et en activant l'anion par formation d'un complexe d'association stable, ils permettent de saponifier un plus grand nombre de liaisons esters (Figure I-12).

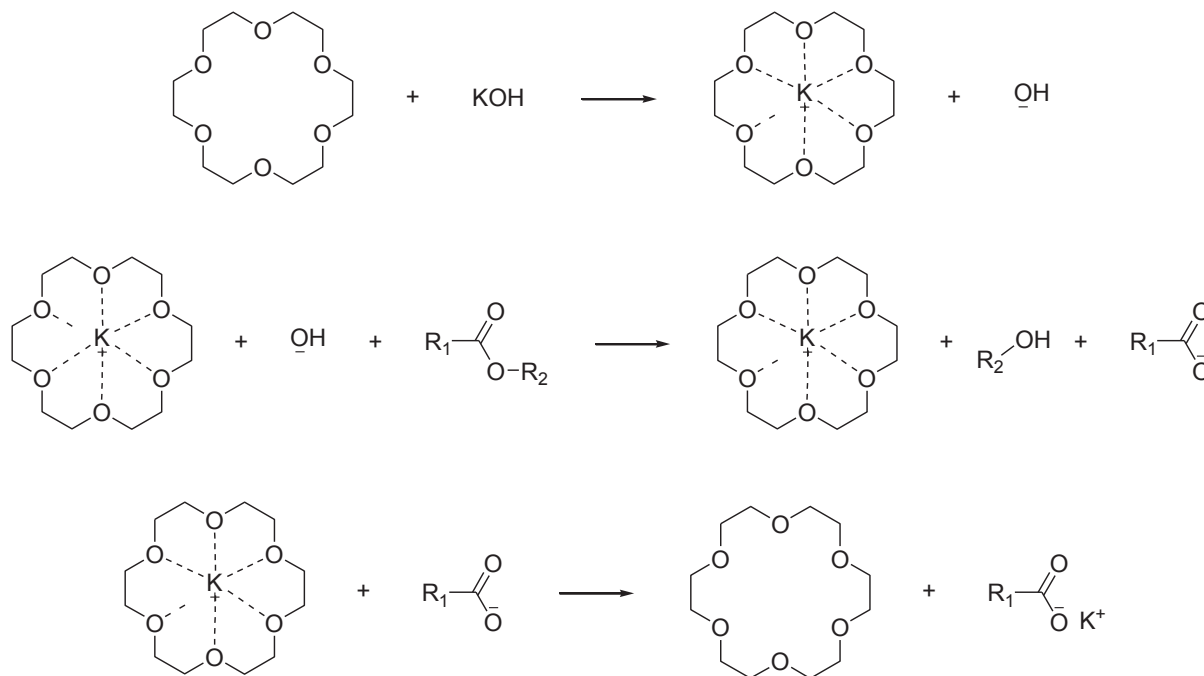


Figure I-12 : Réaction d'hydrolyse alcaline en présence d'éther couronne 18-C-6.

Cette technique a été appliquée à l'étude des kérogènes (Amblès et al., 1987 ; Amblès et al., 1993 ; Amblès et al., 1996 ; Bruan et al., 2001 ; Kribii et al., 2001), de sédiments récents lacustres (Stefanova et Disnar, 2000), d'acides humiques et d'humines de tourbes (Grasset, 1997 ; Grasset et Amblès, 1998). Lors de cette dernière étude, l'utilisation du complexe KOH/éther couronne a permis de solubiliser 87 % de la matière organique initiale après une première série d'hydrolyses. Des composés aliphatiques (acides mono- et dicarboxyliques, alcools, ...) et des dérivés phénoliques ont été identifiés parmi les produits d'hydrolyse.

Des études plus récentes sur les acides carboxyliques présents dans des sédiments deltaïques et marins associent l'hydrolyse alcaline, avec ou sans catalyseur de transfert de phase, à l'hydrolyse acide afin de libérer tous les acides présents dans l'échantillon (Zegouagh et al., 2000 ; Garcette-Lepecq et al., 2004). Différentes fractions acides peuvent ainsi être obtenues incluant les acides non-liés, correspondant aux acides présents dans les composés lipidiques organosolubles, et les acides liés, correspondant aux acides liés aux structures macromoléculaires insolubles. Ces derniers peuvent être séparés en quatre catégories : (i) les

acides libérés par saponification classique, (ii) les acides libérés par saponification en présence d'un catalyseur de transfert de phase, (iii) les acides libérés par hydrolyse acide et (iv) les acides libérés par thermochimiolyse. L'étude de ces différentes fractions fournit des informations sur l'abondance, les sources et l'altération diagénétique de ces fonctions acides.

## *II. 2. 2 - Dégradations thermiques*

### *II. 2. 2. a - Pyrolyse*

La pyrolyse est une technique de dégradation thermique couramment utilisée pour l'analyse des composés de la MOS. Elle offre une alternative intéressante aux méthodes de dégradation chimique et est devenue au cours des vingt dernières années un outil incontournable pour l'étude des substances bio- et géomacromoléculaires.

Parmi les différentes méthodes pyrolytiques employées pour tenter de comprendre la structure chimique de ces composés, la plus utilisée (et la plus efficace) consiste à coupler la pyrolyse avec la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. Durant la pyrolyse, l'échantillon est chauffé rapidement sous atmosphère inerte. L'importante quantité d'énergie thermique accumulée entraîne la fragmentation des macromolécules. Les fragments ainsi formés, volatils, sont ensuite être séparés par chromatographie gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse. Cependant, diverses réactions secondaires peuvent avoir lieu (réarrangement, hydrogénation, polymérisation, ...) et modifier considérablement le composé original. Les acides gras et les acides aromatiques, par exemple, peuvent se décarboxyler. Cela est particulièrement vrai dans le cas de sols argileux, les argiles pouvant catalyser ces réactions (Kögel-Knabner, 2000). Par ailleurs, la pyrolyse analytique de polymères naturels conduit à la formation de composés fortement polaires tels que ceux portant des fonctions carboxyliques qui sont retenus dans le pyrolyseur et donc difficilement analysables en chromatographie gazeuse (del Rio et al., 1996).

Cette technique a cependant été utilisée dans de nombreux domaines notamment pour l'analyse de la MOS (Nierop et al., 2001a ; White et al., 2004 ; Poirier et al., 2005), de végétaux (Nip et al., 1986), d'algues (Largeau et al., 1986), de compost (Dignac et al., 2005), d'acides humiques (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1987 ; Schulten et Schnitzer, 1992), de kérogènes (Béhar et Pelet, 1985 ; Hartgers et al., 1992), de cellulose (Pouwels et al., 1989), de protéines (Raghavan et al., 1986 ; Boon et De Leeuw, 1987) et pour l'analyse de biomarqueurs de bactéries (Sugden et al., 2005) et de microorganismes (Schmidt et al., 2006).

II. 2. 2. b - Thermochimioolyse

La thermochimioolyse, initialement développée pour la caractérisation structurale de polymères (Challinor, 1989), est une réaction de chimioolyse thermiquement assistée. Différents agents de dérivation peuvent être utilisés, la plupart étant des agents alkylants.

▪ En présence de TMAH

L'agent de thermochimioolyse le plus utilisé est l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) qui est une base organique relativement forte ( $pK_b = 4,2$ ). Ce réactif est cité dans plus de 90 % des publications sur la thermochimioolyse (Shadkami et Helleur, 2010). La thermochimioolyse en présence de TMAH est utilisée pour remédier à certains inconvénients de la pyrolyse classique, notamment une perte importante d'informations structurales. Elle permet en effet d'éviter la décarboxylation des acides aromatiques et la déshydratation des groupements alcools (Grasset et al., 2009).

En 1979, Kossa et al. ont proposé un mécanisme pour la thermochimioolyse en présence de TMAH d'un composé possédant un groupe fonctionnel acide. Ce mécanisme, illustré sur la Figure I-13, est toujours accepté.

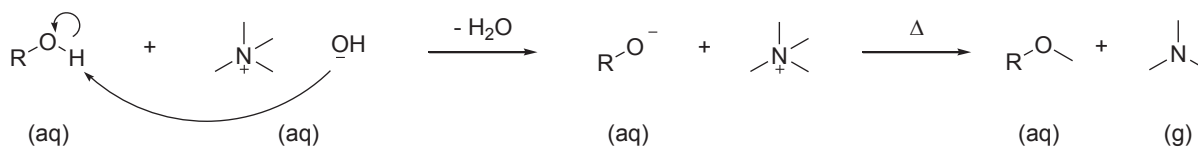


Figure I-13 : Mécanisme de la thermochimioolyse en présence de TMAH d'après Kossa et al. (1979).

En 2001, Challinor a ajouté une étape d'hydrolyse à ce mécanisme pour expliquer la rupture des liaisons éthers et esters (notées A-B sur la Figure I-14 ci-dessous).

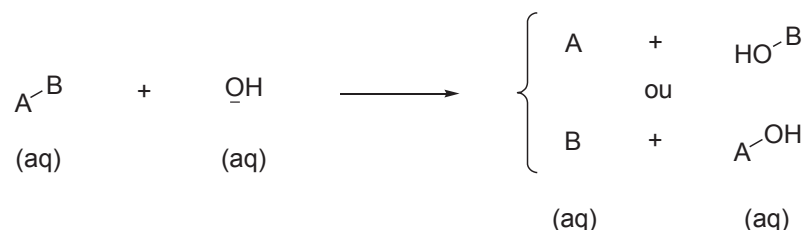


Figure I-14 : Mécanisme de l'étape d'hydrolyse intervenant lors de la thermochimioolyse en présence de TMAH à l'origine de la rupture des liaisons éthers et esters d'après Challinor (2001).

Un autre mécanisme, illustré sur la Figure I-15, a été proposé par Sithole (2000). Il implique un cation méthylcarbonium instable.

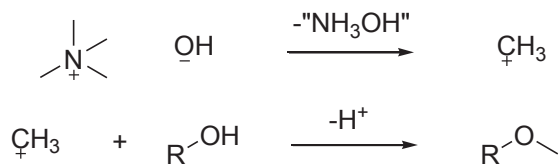


Figure I-15 : Mécanisme de la thermochemiolyse en présence de TMAH d'après Sithole (2000).

La thermochemiolyse en présence de TMAH a été appliquée à une grande variété de composés synthétiques et naturels (Challinor, 2001 ; Shadkami et Helleur, 2010).

La composition d'échantillons de sols a ainsi été déterminée par thermochemiolyse en présence de TMAH. La présence de dérivés ligneux, de composés aromatiques non-ligneux, de lipides (acides gras, *n*-alcanols,  $\alpha,\omega$ -diacides,  $\omega$ -hydroxy-acides sous la forme d'esters ou d'éthers méthyliques), de composés azotés (pyrroles, imidazoles, pyrazoles, pyrimidines, pyrazines et indoles), de différentes sous-unités ligneuses et d'acides déoxy aldoniques perméthylés dérivant des sucres a été mise en évidence dans différents sols (Chefetz et al., 2000 ; Chefetz et al., 2002 ; Grasset et al., 2009).

L'analyse de substances humiques y a montré la présence d'alcanes, d'acides gras, de phénols, de dérivés ligneux et de dérivés azotés (Hatcher et Clifford, 1994 ; Martín et al., 1994 ; Martín et al., 1995a ; Fabbri et al., 1996 ; del Rio et al., 1998 ; Mansuy et al., 2001 ; Ikeya et al., 2004 ; Durand et al., 2005 ; Li et al., 2006 ; Buurman et al., 2009 ; Grasset et al., 2009). Ces composés peuvent être classés en trois classes : les composés aliphatiques, les composés aromatiques et les composés hétérocycliques.

Récemment, elle a également été utilisée pour analyser l'impact des activités industrielles sur l'humification (Poerschmann et al., 2007). En effet, la thermochemiolyse permet la rupture des liaisons covalentes formées par réaction de divers polluants avec la matière organique humifiée fonctionnalisée. Elle permet également la détection de polluants encapsulés dans la matière organique humifiée, et donc non extractibles, en dégradant sa structure tridimensionnelle.

La thermochemiolyse en présence de TMAH présente cependant un inconvénient : elle ne permet pas de distinguer les dérivés méthyliques formés lors de la réaction des dérivés méthyliques initialement présents dans l'échantillon. Ayant les mêmes caractéristiques de dégradation et de dérivation, la thermochemiolyse en présence de TMAH marqué, le  $^{13}\text{C}$ -TMAH, permet de pallier cet inconvénient. Elle permet notamment l'analyse des tannins, condensés ou hydrolysables, présents dans les sols en distinguant les produits dérivés des tannins de ceux dérivés des lignines (Nierop et Filley, 2007 ; Nierop et Filley, 2008). La



thermochimioolyse en présence de TMAH sur les cycles B des tannins condensés et sur les lignines produit les mêmes dérivés : 1,2-diméthoxybenzènes substitués et 1,2,3-triméthoxybenzènes substitués. Le marquage permet de déterminer l'origine de ses dérivés (Figure I-16). D'autre part, l'action de la thermochimioolyse sur le cycle A des tannins condensés conduit à la formation de 1,3,5-triméthoxybenzènes substitués. Ces composés n'ayant jamais été identifiés dans les produits issus de la thermochimioolyse des lignines, ils peuvent donc être considérés comme des marqueurs spécifiques des tannins (Nierop et Filley, 2008).

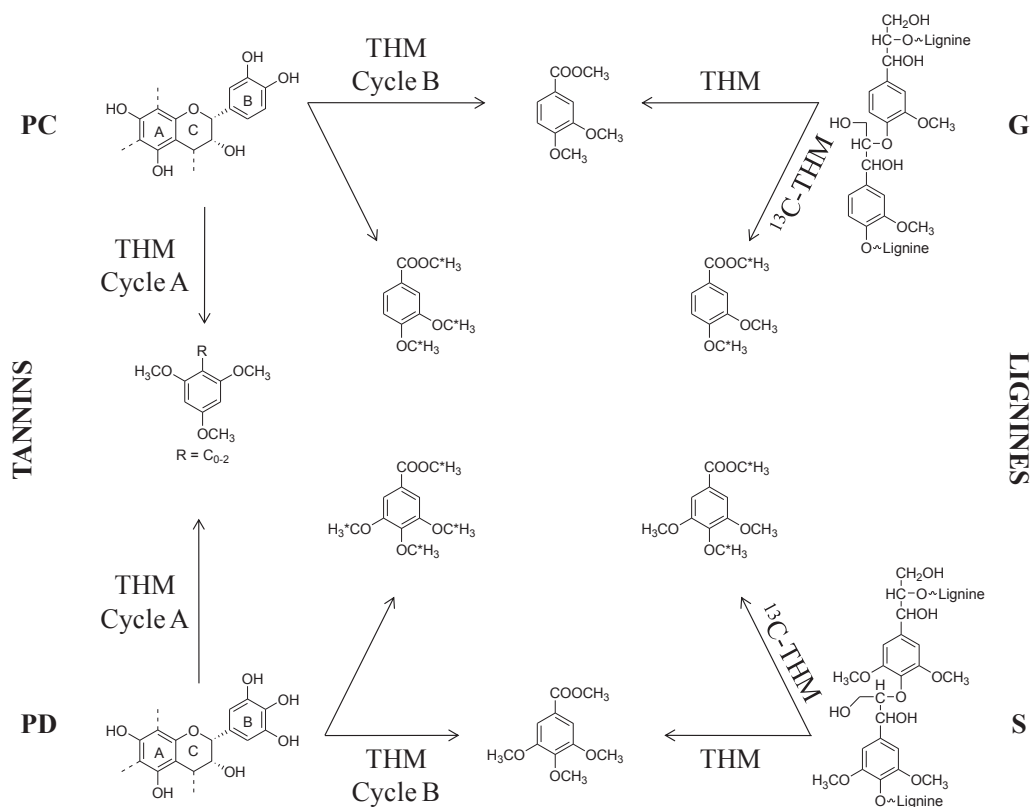


Figure I-16 : Exemple de produits libérés par la thermochimioolyse de tannins condensés (cycles B procyanidine **PC** ou prodelphinidine **PD**) et de lignines (guaiacyles **G** ou syringyles **S**) (les carbones <sup>13</sup>C-marqués sont indiqués par des étoiles) d'après Nierop et Filley (2008).

▪ En présence d'autres agents alkylants

La thermochimioolyse en présence d'acétate de tétraméthylammonium (TMAAc) ou d'acétate de tétraéthylammonium (TEAAc) permet d'obtenir une alkylation sélective des acides libres sans transestérifier les acides gras initialement estérifiés (Hardell et Nilvebrant, 1999 ; Grasset et al., 2002). Utilisée en complément de la thermochimioolyse en présence de TMAH, elle permet de différencier les acides libres des acides liés présents dans un échantillon. De plus, contrairement à la thermochimioolyse en présence de TMAH, elle n'induirait pas d'isomérisation des doubles liaisons (Hardell et Nilvebrant, 1999). De même,

la thermochimiolyse en présence d'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAH) ou d'hydroxyde de tétrapropylammonium (TPAH) permet de distinguer les produits issus de la pyrolyse des produits initialement présents sous une forme méthylée (Martín et al., 1995b ; Guignard et al., 2000).

Dans les conditions classiques de thermochimiolyse, les acétates de tétraalkylammonium n'induisent pas d'hydrolyse et agissent donc uniquement comme des agents alkylants. Une transestérification peut cependant être observée lorsque la thermochimiolyse en présence de TMAAc est réalisée en ampoule scellée à 205 °C pendant 90 minutes (Joll et al., 2004). Dans ce cas, le TMAAc réagirait *in situ* avec le méthanol pour former un méthoxide de tétraméthylammonium qui pourrait alors transestérifier les fonctions esters présentes dans la matière organique naturelle (Figure I-17). L'acide carboxylique (ou le carboxylate) n'étant pas formé, la décarboxylation est ainsi évitée.

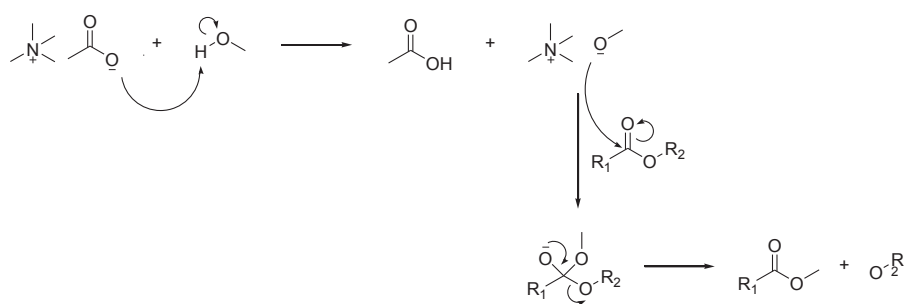


Figure I-17 : Mécanisme de la thermochimiolyse en présence de TMAAc d'après Joll et al. (2004).

D'autres agents alkylants ont également été testés (Lehtonen et al., 2003 ; Joll et al., 2004). Il apparaît que le carbonate de tétraméthylammonium (TMACO<sub>3</sub>) et le TMAH sont des réactifs alkylants équivalents, que l'hydroxyde de tétraéthylammonium (TEAH) et le TBAH sont moins réactifs que le TMAH et que le bromure de tétraméthylammonium (TMABr) est très peu réactif.

L'utilisation de diméthylcarbonate (DMC) comme agent alkylant a été envisagée lors de la thermochimiolyse de l'huile de soja (Fabbri et al., 2005), son application à la MOS pourrait être envisagée. Il apparaît que le DMC n'est efficace qu'en présence de zéolites (catalyseurs). Dans ce cas, des esters méthyliques d'acides gras sont obtenus en quantités significatives. De plus, il semble que l'isomérisation soit moins importante que lors d'une thermochimiolyse en présence de TMAH. Cependant, les échantillons restent soumis à des réactions secondaires de décarboxylation.

Enfin, l'emploi d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH) a été rapportée pour l'étude des acides gras présents dans différentes huiles (Ishida et al., 1999 ; Okuyama et al.,

2002 ; Dron et al., 2004) ou dans le zooplancton (Nakanishi et al., 2003). Utilisé en solution méthanolique 0,2 M, le TMSH est un agent alkylant conduisant à la formation des éthers méthyliques d'acools gras selon le mécanisme décrit sur la Figure I-18 (Yamauchi et al., 1979). Il apparaît que son utilisation conduit à peu ou pas d'isomérisation ainsi qu'à peu de dégradations secondaires.

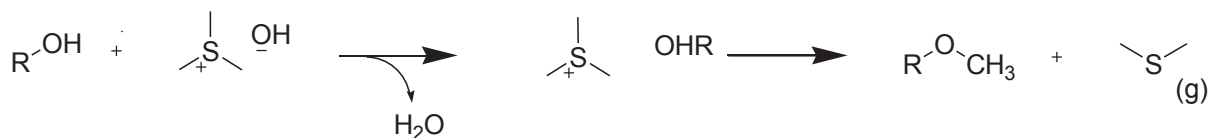


Figure I-18 : Mécanisme de la méthylation lors de la thermochimiolyse en présence de TMSH.

Récemment, le TMSH a été employé pour l'analyse de modèles de catéchines et de tannins condensés (Shadkami et al., 2009), pour celle de sous-unités ligneuses issues de pulpes de papier (Shadkami et al., 2010) et pourrait permettre l'analyse de la MOS.

- En présence d'agents silylants

La silylation, et plus particulièrement la triméthylsilylation, est couramment utilisée en chromatographie gazeuse mais sa combinaison avec la pyrolyse reste rare.

Cette technique a toutefois déjà permis l'analyse de substances humiques (Fabbri et al., 2002a). Leur pyrolyse en présence d'hexaméthylidisilazane (HMDS) conduit à la formation majoritaire d'éthers triméthylsilylés de phénols, de guaiacols, de syringols, et de di- et tri-hydroxybenzènes. Elle permet également l'analyse d'acides  $\alpha$ -aminés (Chiavari et al., 2001).

## II. 3 - Analyse spécifique des biomolécules de la matière organique des sols

Cette partie s'intéresse plus particulièrement à deux types de biomolécules de la matière organique des sols : les sucres et la lignine.

### II. 3. 1 - Analyse des sucres

#### II. 3. 1. a - Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est une technique couramment utilisée pour l'analyse des sucres présents dans la matière organique des sols. Initialement développée en présence d'acide sulfurique froid (Ivarson et Sowden, 1962), différents acides peuvent être employés.

- Acide sulfurique

Après macération à température ambiante en présence d'acide sulfurique 12 ou 13 M pendant 16 heures, les échantillons sont hydrolysés en présence d'acide sulfurique dilué (0,5 à 1,2 M) à 100 °C (Cowie et Hedges, 1984 ; Hu et al., 1995 ; Koivula et Hänninen, 2001 ; Zhang et al., 2007). Ce protocole libère les sucres libres, hémicellulosiques et celluloses contenus dans l'échantillon sans aucune distinction. Par contre, l'hydrolyse en présence d'acide sulfurique 2 M sans macération préalable dans l'acide sulfurique concentré permet uniquement la libération des sucres libres et hémicellulosiques (Modzeleski et al., 1971). Ainsi, il est possible d'analyser les sucres celluloses en réalisant la différence des résultats obtenus pour les deux protocoles précédents (Comont et al., 2006).

Récemment, un processus mettant en jeu deux hydrolyses successives a été utilisé dans le cadre d'une étude sur les sols méditerranéens (Rovira et Vallejo, 2007). La première hydrolyse est effectuée en présence d'acide sulfurique à 2,5 M à 105 °C pendant 30 minutes et permet de libérer les sucres libres et les sucres hémicellulosiques. La seconde hydrolyse est réalisée en présence d'acide sulfurique à 1 M à 105 °C pendant 3 heures après macération de l'échantillon pendant une nuit dans de l'acide sulfurique concentré (13 M). Elle permet la libération des sucres celluloses.

- Acide chlorhydrique

Différentes études sur l'influence de la concentration en acide chlorhydrique, de la température et de la durée de l'hydrolyse ont été réalisées (Sigleo, 1996 ; Ogier et al., 2001). Ainsi, pour une même concentration, l'augmentation de la température (de 100 à 125 °C) ou de la durée de la réaction (de une à deux heures) entraîne une augmentation du rendement en sucres hydrolysés. Par contre, pour une température et une durée de réaction données, l'augmentation de la concentration d'acide chlorhydrique (de 0,1 à 6 M) induit une diminution du rendement en sucres hydrolysés. Il semblerait cependant que des résultats similaires soient obtenus pour les concentrations 1, 1,2 et 2,5 M.

Deux hydrolyses de forces croissantes successives ont par ailleurs déjà été utilisées pour l'analyse des sucres. Cette séquence a été appliquée à des sédiments lacustres et des tourbes (Bourdon et al., 2000 ; Ogier et al., 2001). La première hydrolyse, réalisée en présence d'acide chlorhydrique 1,2 M à 100 °C pendant 3 heures, permet la libération des sucres labiles tels que les hémicelluloses alors que la seconde, réalisée dans les mêmes conditions mais après macération dans de l'acide chlorhydrique concentré (12 M) libère les sucres celluloses. L'analyse des sucres ainsi libérés est réalisée par chromatographie gazeuse après silylation des échantillons. L'efficacité de ce protocole a été montrée par spectroscopie IRTF (Bourdon

et al., 2000). Les sucres labiles sont entièrement libérés lors de la première hydrolyse. En revanche, la libération des sucres cellulosiques, moins abondants, nécessite une deuxième étape d'hydrolyse. De plus, l'étude d'Ogier et al. (2001), portant sur l'analyse des sucres neutres de sédiments lacustres, a montré que l'abondance et la composition des monosaccharides sont fortement liées à la production microbienne.

Une hydrolyse en une seule étape peut également être réalisée. Pour l'analyse des sucres de sols sous forêt, de l'acide chlorhydrique 6 M est utilisé et l'hydrolyse est effectuée à 105 °C pendant 18 heures (Rovira et Vallejo, 2007).

- Acide trifluoroacétique

Des hydrolyses en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) d'échantillons de sols de forêts ont récemment été réalisées (Nierop et al., 2001b ; Rumpel et Dignac, 2006 ; Spielvogel et al., 2007). L'hydrolyse est effectuée en présence de TFA 4 M à 105 °C pendant 4 heures. Elle ne permet cependant que l'analyse des sucres neutres non cellulosiques.

Lors d'une étude réalisée par Rumpel et Dignac (2006), les unités monosaccharidiques d'un sol sous forêt ont été analysées en chromatographie gazeuse sous forme d'alditols acétylés. Contrairement aux techniques usuelles de dérivation (silylation directe ou transformation en oximes), l'acétylation des alditols permet d'éliminer le centre anomérique et donc de s'affranchir de l'isomérisation. Chaque sucre conduit alors à un pic unique ce qui simplifie l'analyse chromatographique. Cette méthode permet l'analyse des sucres neutres présents dans les sols à l'exception du fructose qui conduit au même alditol que le glucose lors de l'étape de réduction. Cependant, compte tenu des faibles concentrations de fructose dans les sols (Amelung et al., 1996), l'impact sur la quantité de glucose est négligeable. De plus, ces deux sucres n'interviennent pas dans le calcul des ratios C6/C5 (mannose + galactose)/(xylose + arabinose) et déoxy/C5 (rhamnose + fucose)/(xylose + arabinose) utilisés pour distinguer les sucres microbiens des sucres végétaux.

### *II. 3. 1. b - Thermochimioolyse*

Différents auteurs ont analysé les produits de la thermochimioolyse de sucres et de polysaccharides en présence de TMAH. Des échantillons standards d'hexoses, de pentoses, de déoxyhexoses, de lactose, de cellulose et d'amidon ont été traités par une solution aqueuse de TMAH 25 % puis pyrolysés à 700 °C (Fabbri et Helleur, 1999). Dans ces conditions basiques et à haute température, les sucres réducteurs subissent des réactions d'aldolisation et de rétro-aldolisation (Schwarzinger, 2003). Ils se réarrangent en acides déoxy aldoniques (acides sacchariques) et l'on peut observer la méthylation des acides carboxyliques et des fonctions

hydroxyles. Une grande variété de produits est ainsi obtenue et notamment de nombreux isomères des saccharides parents (). Les chromatogrammes présentent cependant tous la même caractéristique : la présence de produits de même poids moléculaire ( $m/z = 250$  pour les hexoses,  $m/z = 206$  pour les pentoses,  $m/z = 220$  pour les déoxy hexoses) dont les spectres de masse possèdent tous le même pic de base ( $m/z = 129$ ).

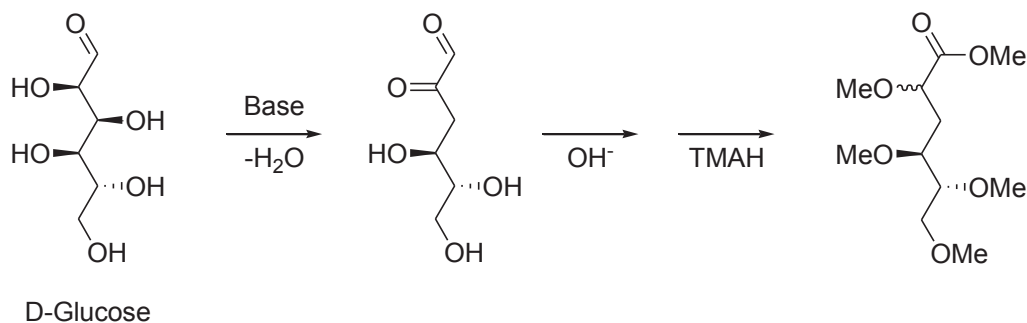


Figure I-19 : Formation d'acides sacchariniques perméthylés lors de la thermochemiolyse du D-glucose en présence de TMAH d'après Fabbri et Helleur (1999).

La thermochemiolyse de sucres a également été envisagée en présence de HMDS, un agent silylant (Fabbri et Chiavari, 2001). Des monosaccharides (D-glucose, D-mannose, D-galactose) et des polysaccharides (cellulose, laminaran, agar) ont été pyrolysés en présence de HMDS. Des éthers triméthylsilylés caractéristiques de composés hydroxylés ont été obtenus. Ces produits regroupent notamment les dérivés triméthylsilylés d'anhydrosucres (les plus importants), de pyranones et de cyclopenténones hydroxylées, d'hydroxyméthylfuraldéhydes, d'hydroxyméthylfuranes, et de di- et tri-hydroxybenzènes. Ainsi, l'analyse par CG-SM de la cellulose après pyrolyse en présence de HMDS met en évidence la présence du fragment  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$ ,  $m/z = 73$ , pour les principaux pics du chromatogramme. L'ion  $m/z = 183$  est un marqueur spécifique des hexoses, l'ion  $m/z = 116$  est un marqueur spécifique des anhydrosucres partiellement silylés et l'ion  $m/z = 217$  est un marqueur spécifique des anhydrosucres persilylés (Fabbri et al., 2002b).

De même, l'analyse de la cellulose a été réalisée par un procédé *off-line* de pyrolyse/silylation suivi par analyse CG-SM (Fabbri et al., 2003). Elle a pour but d'augmenter la formation d'anhydrosucres persilylés, les anhydrosucres étant des marqueurs représentatifs de la composition monosaccharidique (Fabbri et Chiavari, 2001). Ils gardent en effet la configuration de l'unité saccharidique parente. Les performances de quatre agents de silylation ont été comparées : le HMDS, la triméthylsilyldiéthylamine (TMSDEA), le bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) et le triméthylsilylimidazole (TMSI). Les meilleurs résultats et la meilleure reproductibilité ont été obtenus avec le HMDS. Le

triméthylchlorosilane (TMCS) peut être utilisé comme catalyseur en complément des agents de silylation précédemment cités (Chiantore et al., 2009). Dans ce cas, la réaction de dérivaison semble conduire à de meilleurs résultats et faciliter ainsi la séparation des différents composés (Scalarone et al., 2008).

### *II. 3. 2 - Analyse de la lignine*

#### *II. 3. 2. a - Oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II)*

Introduite pour l'analyse des lignines dans les sols et les sédiments (Hedges et Ertel, 1982), l'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II) est une des méthodes de dégradation chimique les plus couramment utilisées.

Cette méthode d'analyse est principalement employée pour l'analyse des lignines présentes dans des structures et des environnements divers : bois (Hedges et al., 1988 ; Goñi et al., 1993), plantes vascularisées (Goñi et Hedges, 1992 ; Opsahl et Benner, 1995), milieux aquatiques (Reeves et Preston, 1989 ; Hautala et al., 1997 ; Cotrim da Cunha et al., 2001), sols (Rumpel et al., 2002 ; Kiem et Kögel-Knabner, 2003 ; Bahri et al., 2006 ; Spielvogel et al., 2007), sédiments (Hyötyläinen et al., 1995 ; Hyötyläinen et al., 1998 ; Hu et al., 1999 ; Miltner et Emeis, 2001 ; Loh et al., 2008 ; Tesi et al., 2008a ; Tesi et al., 2008b) et substances humiques (Schnitzer, 1974 ; Schnitzer et Neyroud, 1975 ; Ertel et Hedges, 1984 ; Hänninen, 1992 ; Miikki et al., 1994 ; Lehtonen et al., 2001 ; Lehtonen et al., 2004).

L'oxydation est réalisée à 170 °C pendant 3 heures sous atmosphère inerte dans une bombe sous pression à l'intérieur de laquelle sont introduits de l'oxyde de cuivre (II), du sulfate ferreux d'ammonium (sel de Mohr) et de la soude 2 M. Les produits d'oxydation sont ensuite récupérés par centrifugation après lavage du milieu réactionnel avec de la soude 1 M. L'extrait basique est alors acidifié à pH = 1 puis extrait avec de l'éther préalablement traité par du sulfate ferreux d'ammonium pour éliminer toute trace de peroxyde (Hedges et Ertel, 1982). Afin de remédier aux inconvénients de l'extraction liquide-liquide (temps de mise en œuvre, quantité de solvant utilisée, rendement et sélectivité), elle peut être remplacée par une concentration sur colonne C<sub>18</sub>. Les produits sont alors séparés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Kögel et Bochter, 1985) ou par chromatographie gazeuse (CG) (Hetherington et Anderson, 1998). Elle peut également être remplacée par une extraction sur phase solide suivie d'une analyse par électrophorèse capillaire (Lima et al., 2007). Récemment, une autre procédure a été mise en place afin de réduire la durée de la manipulation (Goñi et Montgomery, 2000 ; Heim et Schmidt, 2007). Elle consiste à réaliser

l'oxydation sous chauffage micro-ondes. Dans ce cas, un chauffage à 150 °C pendant 90 minutes conduit aux résultats optima.

L'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre produit des phénols dérivés de la lignine (phénols aldéhydiques majoritairement, cétoniques et acides) qui, après silylation, peuvent être analysés par chromatographie gazeuse (Figure I-20). Parmi eux se retrouvent les grandes familles de phénols caractéristiques de la structure des lignines (Hedges et Ertel, 1982) :

- les unités *p*-hydroxyphényles (*p*-hydroxybenzaldéhyde, *p*-hydroxyacétophénone et acide *p*-hydroxybenzoïque),
- les unités guaiacyles ou vanilliques (vanilline, acétovanillone et acide vanillique),
- les unités syringyles (syringaldéhyde, acétosyringone et acide syringique),
- les unités cinnamiques (acides *p*-coumarique et férulique).

Comme la lignine des gymnospermes est majoritairement constituée d'unités guaiacyles alors que la lignine des angiospermes contient des quantités équivalentes d'unités guaiacyles et syringyles, ces unités nous renseignent sur l'origine des lignines.

De plus, Ertel et Hedges (1985) puis Hedges et al. (1988) ont montré que les ratios des dérivés les plus oxydés (acides carboxyliques) sur les aldéhydes correspondants fournissaient une mesure de l'état de dégradation de la lignine. Ainsi, le ratio acide/aldéhyde (Ad/Al) décroît systématiquement lorsque la lignine est dégradée.

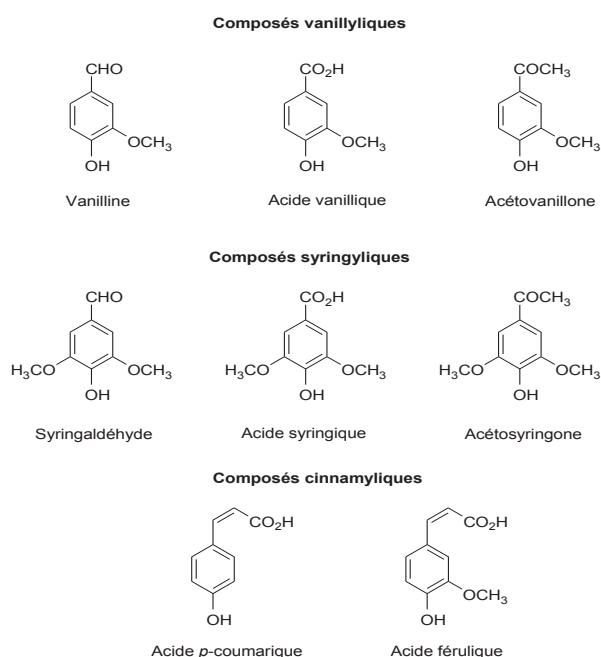


Figure I-20 : Monomères ligneux libérés lors de l'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II).



L'oxydation alcaline en présence de CuO conduit également à la formation de produits ne dérivant pas des lignines. Un exemple en est la formation de produits dérivés de cutines dont notamment des acides gras hydroxylés à chaîne carbonée longue (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>) a été observée (Goñi et Hedges, 1990a ; Goñi et Hedges, 1990b ; Goñi et Hedges, 1990c). Il semblerait que ces produits soient principalement issus de l'hydrolyse alcaline du polymère parent. Lors de cette hydrolyse, les doubles liaisons C=C sont préservées contrairement aux époxy-acides qui sont totalement convertis en hydroxy-acides.

Cette méthode d'analyse fournit aussi des informations sur d'autres composés biochimiques abondants (protéines, polysaccharides, lipides, composés aromatiques non ligneux) et notamment sur leur présence chez les organismes marins (macrophytes, phytoplancton, zooplancton, bactéries) (Goñi et Hedges, 1995).

L'oxydation d'acides humiques en présence de CuO libère des produits d'oxydation pouvant être isolés en trois fractions : acides humiques oxydés, acides fulviques et composés lipidiques (triterpénoïdes, acides gras à chaîne courte et  $\beta$ -sitostérol). Une seconde oxydation des acides humiques oxydés conduit à nouveau à la libération de composés lipidiques (acides diterpénoïques, divers acides gras C<sub>18</sub> insaturés et *n*-alcanes C<sub>22</sub>-C<sub>34</sub>) (Lehtonen et al., 2001). Dans le cas d'acides fulviques méthylés, l'oxydation alcaline en présence de CuO libère des aldéhydes et des esters phénoliques méthylés, des esters méthyliques d'acide benzoïque, des esters méthyliques de diacides aliphatiques et d'autres composés tels que des alcanes ou des esters méthyliques d'acides gras (Schnitzer, 1974).

### *II. 3. 2. b - Thioacidolyse*

La thioacidolyse est une méthode de dégradation spécifique des lignines (Lapierre et al., 1985). Il s'agit d'une réaction de coupure sélective des ponts alkyl-benzyl-éthers qui sont les principaux enchaînements présents entre les différentes unités monomériques des lignines. Cette réaction se fait selon un mécanisme en deux étapes (Block, 1978). Lors de la première étape, les liaisons  $\beta$ -aryl-éther sont substituées par des groupements thioéthyles puis au cours de la seconde étape, la substitution se fait sur les liaisons éther situées en position  $\beta$  des groupements thioéthyles précédemment introduits (Figure I-21).

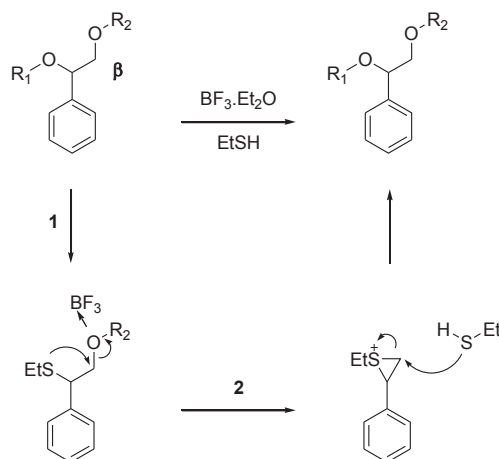


Figure I-21 : Mécanisme de la thioacidolyse d'après Block (1978).

Comme illustré par la Figure I-22, les liaisons éther  $\beta$ -O-4 conventionnelles (**L1**) conduisent aux monomères **1G** et **1S**, les hydroxycinnamaldéhydes couplés (liaisons 8-O-4) entre lignines (**L2**) à la formation des marqueurs indènes **2G** et **2S**, les hydroxycinnamaldéhydes terminaux (**L3**) à la formation des thioacétals **3G** et **3S** et les hydroxybenzaldéhydes terminaux (**L4**) à la formation des thioacétals **4G** et **4S** où **G** représente les unités guaiacyles et **S** les unités syringiques.

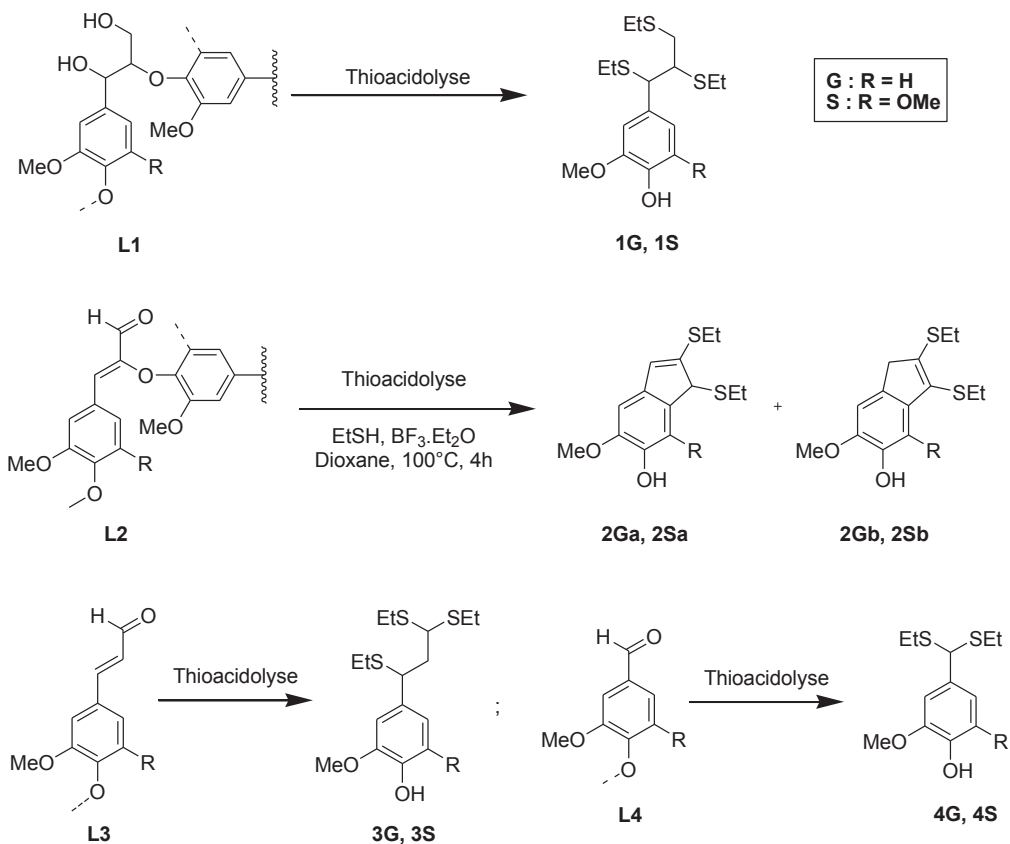


Figure I-22 : Structures des lignines et de leurs principaux produits de thioacidolyse (Lapierre et al., 2004).

La thioacidolyse est réalisée en présence d'éthanethiol et de trifluorure de bore ou d'acide tétrafluoroborique dans le dioxane sous atmosphère inerte. Le trifluorure de bore est cependant préférentiellement utilisé. Le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C pendant 4 heures sous agitation. Le milieu refroidi, dont le pH a été ajusté à 3-4 avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,4 M, est ensuite extrait avec du dichlorométhane. Après silylation, l'analyse des produits ainsi obtenus se fait par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

La thioacidolyse est couramment employée pour l'analyse des lignines dans l'industrie du bois (Baillères et al., 1997 ; Lapierre et al., 2004 ; Christiernin, 2006a ; Christiernin, 2006b ; Windeisen et Wegener, 2008), des céréales (Grabber et al., 1996 ; Billa et al., 1998 ; Yosef et Ben-Ghedalia, 1999) et des tannins (Vivas et al., 2004). Elle a aussi été appliquée aux substances humiques : humine et acides humiques (Deport, 2002). Cette dernière étude a ainsi permis de mettre en évidence les liaisons  $\beta$ -aryl éther dans les humines étudiées grâce à l'identification de dérivés de l'acide férulique et de l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique, unités monomériques de la lignine, dans les produits de thioacidolyse. De faibles rendements massiques sont cependant observés (5 à 10 %).

### *II. 3. 2. c - La méthode DFRC*

La méthode DFRC ("Derivatization Followed by Reductive Cleavage") doit son nom aux réactions mises en jeu et au Dairy Forage Research Center (Madison, Wisconsin) où elle a été développée. Elle permet l'analyse des lignines et consiste en deux étapes clés : bromation et acétylation simultanées en présence de bromure d'acyle puis élimination réductrice en présence de zinc métallique. Une acétylation finale est réalisée pour acétyler les groupes phénoliques libres produits lors de l'étape de réduction. Cela permet de distinguer plus facilement les unités étherifiées des unités phénoliques libres mais cela requiert une attention particulière car une acétylation partielle des phénols peut avoir lieu lors de l'étape d'élimination réductrice (Lu et Ralph, 1997a ; Lu et Ralph, 1998a).

La réaction des lignines ou de modèles de lignine avec le bromure d'acyle dans l'acide acétique induit la dissolution complète des lignines et la formation de dérivés  $\alpha$ -bromés ligneux acétylés possédant un squelette de type  $\beta$ -bromo éther. En effet, il a été montré sur les modèles de lignine que le bromure d'acyle dans l'acide acétique à température ambiante est fortement sélectif dans ses réactions avec la lignine, c'est-à-dire que les groupes  $\alpha$ -hydroxyles et  $\alpha$ -éthers deviennent des dérivés  $\alpha$ -bromés, que les groupes  $\gamma$ -hydroxyles sont rapidement acétylés et que les hydroxyles phénoliques sont acétylés plus lentement.

Lors de la seconde étape, les éthers bromés sont clivés par une élimination réductrice en présence de zinc métallique dans une solution aqueuse de dioxane/acide acétique/eau, ce qui conduit à la formation d'isomères de l'acétate 4-hydroxycinnamylique (**P**), du diacétate coniférylique (**G**) et du diacétate sinapylique (**S**) issus des unités *p*-hydroxyphényle, guaiacyle et syringyle (Figure I-23).

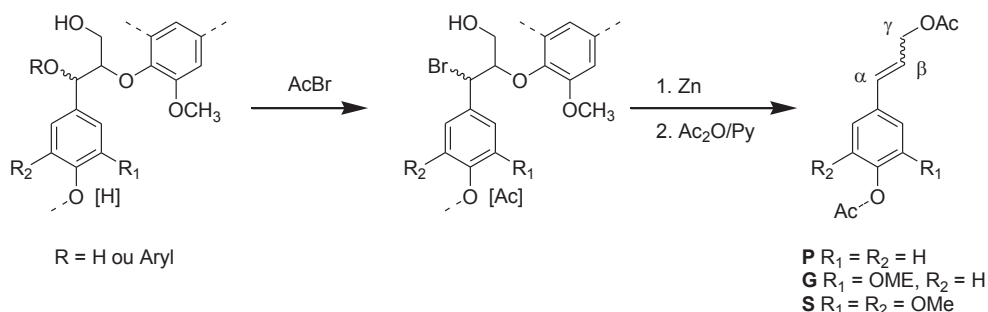


Figure I-23 : Coupure des éthers ligneux par la méthode DFRC (Lu et Ralph, 1997b).

La méthode DFRC a été appliquée à de nombreux modèles de lignines :  $\beta$ -aryl-éthers (Lu et Ralph, 1997a), dilignols (Kobayashi et al., 2005) et modèles ligneux possédant des groupes terminaux cinnamyles (Lu et Ralph, 1999a). Les acétates présents naturellement sur les lignines peuvent également être analysés grâce à une petite modification du protocole (Ralph et Lu, 1998a). Dans ce cas, la dérivation est réalisée avec du bromure de propionyle dans l'acide propionique à la place du bromure d'acyle dans l'acide acétique. De même, l'élimination réductrice se fait dans l'acide propionique et l'acétylation finale utilise l'anhydride propionique en remplacement de l'anhydride acétique.

L'étude de Lu et Ralph (1998a) portant sur l'analyse de différentes lignines isolées (conifères, feuillus, herbes et dicotylédones) a permis d'identifier de nombreux monomères (représentés sur la Figure I-24). Les monomères de type **P**, **G** et **S** dérivant des unités  $\beta$ -éthers sont obtenus avec d'autres composés monomériques mineurs dérivant d'autres structures (produits contenant des groupements terminaux cinnamyles, aldéhydes, arylglycérols et unités  $\alpha$ -carbonylés).

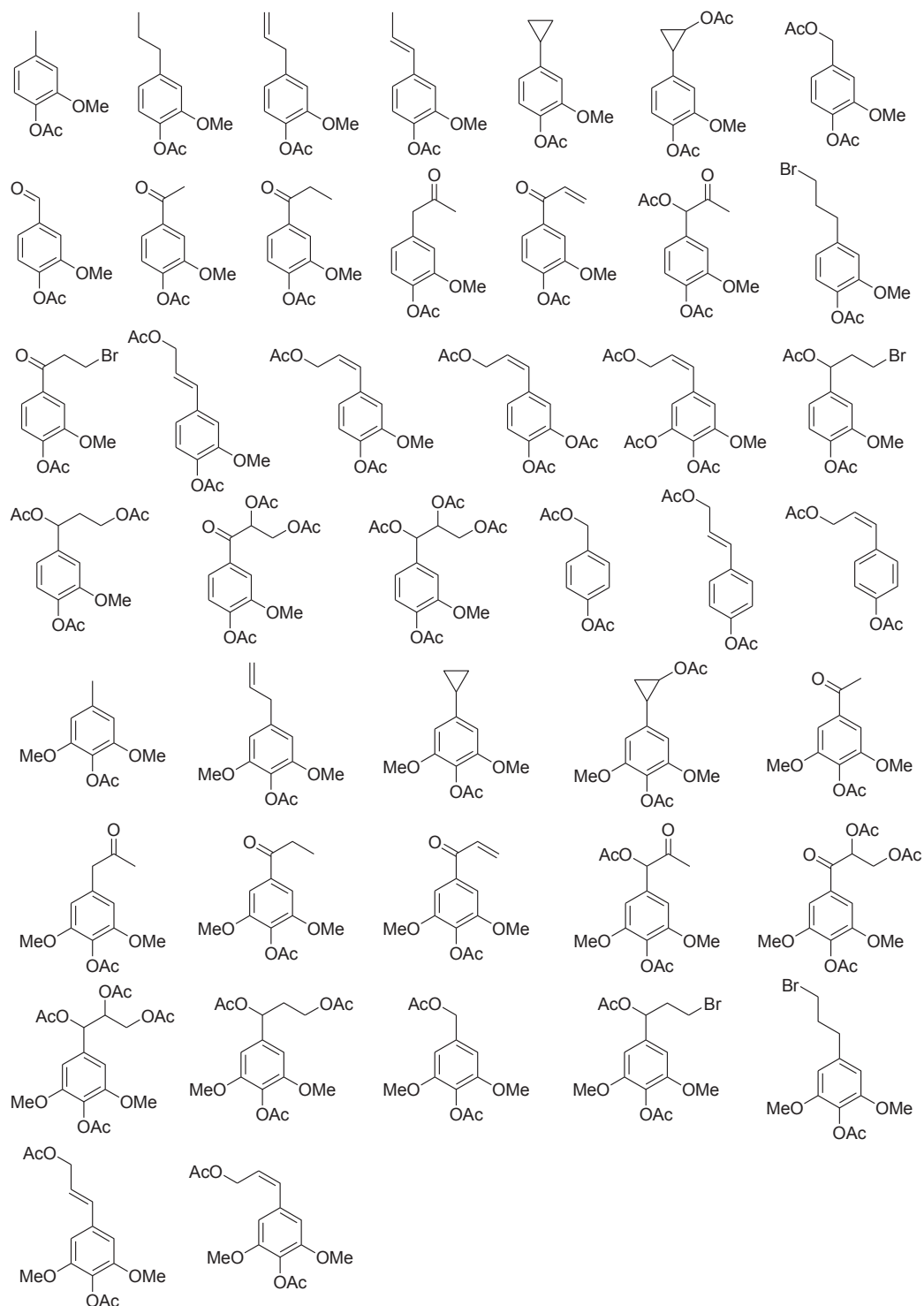


Figure I-24 : Structure des monomères libérés par la méthode DFRC appliquée à différentes lignines isolées d'après Lu et Ralph (1998a).

Les rendements des monomères ainsi obtenus (92-97 %) sont supérieurs à ceux obtenus par des méthodes classiques d'acidolyse ou de thioacidolyse (Lu et Ralph, 1997a). Ainsi, de par sa simplicité, ses conditions douces, son exceptionnelle sélectivité et ses rendements, cette technique apparaît comme une méthode analytique de choix pour la

caractérisation des lignines des gymnospermes, des angiospermes et des végétaux (Lu et Ralph, 1998b ; Peng et al., 1998 ; Ralph et al., 1998b ; Lu et Ralph, 1999b ; Peng et al., 1999 ; Tohmura et Argyropoulos, 2001 ; Ikeda et al., 2002 ; Marita et al., 2003 ; Yamauchi et Fukushima, 2004 ; Kobayashi et al., 2005 ; del Río et al., 2008) mais aussi des fruits et légumes (Bunzel et al., 2005). Une seule étude cependant porte sur l'application de la méthode DFRC à des échantillons de sol et de sédiment (Grasset et al., 2010). Elle montre la persistance de monomères ligneux intacts (principalement de type guaiacyles) dans un lignite du sud de la Moravie (Hodonín, République tchèque).

### *II. 3. 2. d - Thermochimiolysse*

Evitant les réactions de décarboxylation et de déshydratation, la thermochimiolysse en présence de TMAH semble conduire à la formation de fragments plus représentatifs de la structure de la lignine que ceux obtenus par pyrolyse classique. Cette technique est donc grandement employée pour l'étude structurale de la lignine (Clifford et al., 1995 ; Hatcher et Minard, 1996 ; del Río et al., 1998 ; Challinor, 2001 ; Nakagawa-izumi et al., 2004 ; Kuroda et Nakagawa-izumi, 2006 ; del Río et al., 2007 ; Wysocki et al., 2008). De nombreux modèles ont également été étudiés afin de déterminer la structure de la lignine en se basant sur les liaisons chimiques qui relient les différentes sous-unités (Nakagawa-izumi et al., 2004 ; Kuroda et Nakagawa-izumi, 2005a ; Kuroda et Nakagawa-izumi, 2005b ; Kuroda et Nakagawa-izumi, 2006 ; Kuroda et al., 2009). La thermochimiolysse en présence de TMAH induit la coupure des liaisons  $\beta$ -aryl-éthers et libère ainsi les monomères de la lignine (unités *p*-hydroxyphényles, guaiacyles et syringyles) tout en préservant leurs chaînes latérales (del Río et al., 1998 ; Chefetz et al., 2000). Ainsi, le 1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-méthoxyéthène et le 1-(3,4-diméthoxyphényl)-1,2,3-triméthoxypropane sont produits lors de la thermochimiolysse en présence de TMAH d'une lignine de cèdre et proviennent des sous-unités  $\beta$ -aryl-éthers (Kuroda et Nakagawa-izumi, 2006). La thermochimiolysse en présence de TMAH permet également d'étudier la décomposition de la lignine à l'aide des ratios acide/aldéhyde suivants : acide 3,4-diméthoxybenzoïque/3,4-benzaldéhyde et acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque/3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde (les acides étant considérés sous la forme d'esters méthyliques) (Robertson et al., 2008).

L'utilisation de  $^{13}\text{C}$ -TMAH a également été appliquée à l'analyse de la lignine (Filley et al., 1999 ; Filley et al., 2006 ; Nierop et Filley, 2007 ; Mason et al., 2009). Elle permet de distinguer les dérivés méthyliques initialement présents de ceux formés lors de la thermochimiolysse.

Récemment, l'utilisation de TMSH a été utilisée dans le cas de l'analyse de sous-unités ligneuses (Shadkami et al., 2010). Lors de cette étude, la thermochimiolysse en présence de TMSH de lignine (conifères et feuillus) produit des dimères ligneux de haut poids moléculaire (Tableau I-3). Contrairement à la thermochimiolysse en présence de TMAH qui libère des marqueurs pouvant être d'origine ligneuse ou non-ligneuse, ces dimères sont spécifiques de la structure complexe de la lignine. La sylvatesmine (Figure I-24) apparaît comme un marqueur des lignines de conifères alors que la yangambine (Figure I-24) est un marqueur des lignines de feuillus. Le 3,3',4,4'-tétraméthoxystylbène est un marqueur des deux types de lignines.

Pic	Produit de thermochimiolysse	Origine
1	Ester méthylique de l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque	Feuillus
2	Ester méthylique de l'acide 6,9-octadécadiénoïque	Conifères
3	Ester méthylique de l'acide pimarique	Conifères
4	Ester méthylique de l'acide déhydroabiétique	Conifères
5	Ester méthylique de l'acide abiétique	Conifères
6	Ester méthylique de l'acide néoabiétique	Conifères
7	Bis (3,4,5-triméthoxyphényl) méthane	Feuillus
8	3,3',4,4'-tétraméthoxystylbène	Conifères et Feuillus
9	Sylvatesmine	Conifères
10	9H-Furo[2,3-H]chromène-2,8-dione,4-méthyl-9-(3,4,5-triméthoxybenzylidène)	Conifères
11	Yangambine	Feuillus

Tableau I-3 : Produits principaux de la thermochimiolysse de lignines en présence de TMSH d'après Shadkami et al. (2010).

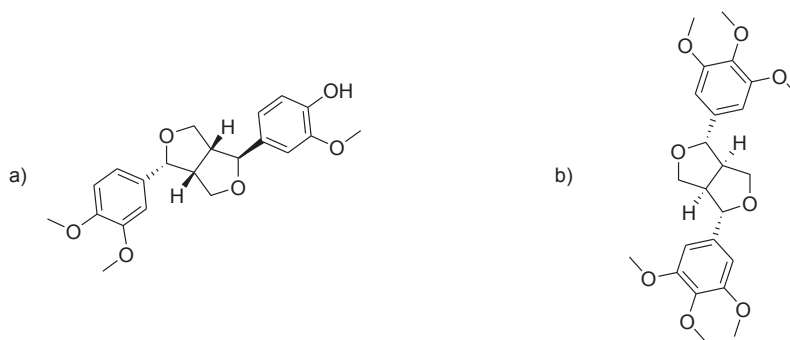


Figure I-25 : Structures de la sylvatesmine (a) et de la yangambine (b).

Enfin, le BSTFA peut être utilisé comme agent silylant pour l'analyse de la lignine (Kuroda, 2000). De nombreux composés triméthylsilylés de l'alcool coniférylique sont ainsi obtenus et montrent que les groupements hydroxyles des alcools ou des phénols sont bien dérivés.

### **III - CONCLUSION**

La matière organique des sols est constituée de différentes biomolécules et notamment de protéines, de polysaccharides, de lignines, de tannins, de lipides, de cutines, de subérines et de substances humiques. Ces biomolécules représentent de bons marqueurs et fournissent d'importantes informations, au niveau moléculaire, sur la matière organique des sols.

Les différentes techniques d'analyse employées pour l'étude de la matière organique des sols ont été détaillées. Parmi elles, les analyses spectroscopiques (spectroscopie infrarouge, résonance magnétique nucléaire ou résonance de spin électronique) permettent d'identifier les principales fonctions chimiques.

Par ailleurs, l'analyse moléculaire de cette matière organique nécessite la dégradation des biogéomacromolécules, par voie chimique ou thermique, afin d'en analyser les unités moléculaires. Des réactions d'oxydation ou de réduction et des dégradations spécifiques de certains motifs ou de certaines fonctions chimiques sont ainsi utilisées. De même, la pyrolyse et la thermochimioolyse, réalisée en présence d'agents alkylants ou silylants, peuvent être employées.

Cependant, de par leurs spécificités et les mécanismes impliqués, ces méthodes présentent des biais possibles. C'est pourquoi il apparaît nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes pour l'analyse moléculaire de la matière organique des sols et des sédiments.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulla, H.A.N., Minor, E.C., Dias, R.F., Hatcher, P.G., 2010. Changes in the compound classes of dissolved organic matter along an estuarine transect: A study using FTIR and  $^{13}\text{C}$  NMR. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 3815-3838.
- Amblès, A., Dupas, G., Jacquesy, J.-C., 1987. Solubilization of Timahdit (MOROCCO) oil shale kerogen catalysed by 18-crown-6. *Tetrahedron Letters* 28, 6449-6452.
- Amblès, A., Baudet, N., Jacquesy, J.-C., 1993. Structural study of the kerogen from Brazilian Irati oil shale by selective degradations. *Tetrahedron Letters* 34, 1783-1786.
- Amblès, A., Grasset, L., Dupas, G., Jacquesy, J.-C., 1996. Ester- and ether bond cleavage in immature kerogens. *Organic Geochemistry* 24, 681-690.
- Amelung, W., Cheshire, M.V., Guggenberger, G., 1996. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1631-1639.
- Bahri, H., Dignac, M.-F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Chenu, C., Mariotti, A., 2006. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1977-1988.
- Baillères, H., Castan, M., Monties, B., Pollet, B., Lapierre, C., 1997. Lignin structure in *Buxus sempervirens* reaction wood. *Phytochemistry* 44, 35-39.
- Bayer, C., Martin-Neto, L., Mielniczuk, J., Dieckow, J., Amado, T.J.C., 2006. C and N stocks and the role of molecular recalcitrance and organomineral interaction in stabilizing soil organic matter in a subtropical Acrisol managed under no-tillage. *Geoderma* 133, 258-268.
- Béhar, F., Pelet, R., 1985. Pyrolysis-gas chromatography applied to organic geochemistry: Structural similarities between kerogens and asphaltenes from related rock extracts and oils. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 8, 173-187.
- Billa, E., Koukios, E.G., Monties, B., 1998. Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability* 59, 71-75.
- Block, E., 1978. Sulfur-containing carbocations. Academic Press Inc., New York, San Francisco, London.
- Boon, J.J., De Leeuw, J.W., 1987. Amino acid sequence information in proteins and complex proteinaceous material revealed by pyrolysis-capillary gas chromatography-low and high resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11, 313-327.

- Bourdon, S., Laggoun-Défarge, F., Disnar, J.-R., Maman, O., Guillet, B., Derenne, S., Largeau, C., 2000. Organic matter sources and early diagenetic degradation in a tropical peaty marsh (Tritrivakely, Madagascar). Implications for environmental reconstruction during the Sub-Atlantic. *Organic Geochemistry* 31, 421-438.
- Bruan, V., Halim, M., Ziyad, M., Largeau, C., Amblès, A., 2001. Characterization of the Moroccan Timahdit (X-layer) oil shale kerogen using pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 165-179.
- Bull, I.D., van Bergen, P.F., Poulton, P.R., Evershed, R.P., 1998. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments-II, Soils from the Hoosfield Spring Barley Experiment treated with different quantities of manure. *Organic Geochemistry* 28, 11-26.
- Bunzel, M., Seiler, A., Steinhart, H., 2005. Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9553-9559.
- Buurman, P., Nierop, K.G.J., Kaal, J., Senesi, N., 2009. Analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation of EUROSOIL humic acid samples - A key to their source. *Geoderma* 150, 10-22.
- Calderoni, G., Schnitzer, M., 1984. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2045-2051.
- Challinor, J.M., 1989. A pyrolysis-derivatization-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 16, 323-333.
- Challinor, J.M., 2001. Review: The development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 3-34.
- Chapman, S.J., Campbell, C.D., Fraser, A.R., Puri, G., 2001. FTIR spectroscopy of peat in and bordering Scots pine woodland: Relationship with chemical and biological properties. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1193-1200.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp, C.E., Hatcher, P.G., 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil Science Society of America Journal* 64, 583-589.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh, A.P., Hatcher, P.G., Chen, Y., 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Science Society of America Journal* 66, 129-141.

- Chiantore, O., Riedo, C., Scalarone, D., 2009. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of products from on-line pyrolysis/silylation of plant gums used as binding media. *International Journal of Mass Spectrometry* 284, 35-41.
- Chiavari, G., Fabbri, D., Prati, S., 2001. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of products arising from pyrolysis of amino acids in the presence of hexamethyldisilazane. *Journal of Chromatography A* 922, 235-241.
- Christiernin, M., 2006a. Lignin composition in cambial tissues of poplar. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 700-706.
- Christiernin, M., 2006b. Structure of lignins in developing xylem of Norway spruce. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 693-699.
- Clifford, D.J., Carson, D.M., McKinney, D.E., Bortiatynski, J.M., Hatcher, P.G., 1995. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23, 169-175.
- Comont, L., Laggoun-Défarge, F., Disnar, J.-R., 2006. Evolution of organic matter indicators in response to major environmental changes: The case of a formerly cut-over peat bog (Le Russey, Jura Mountains, France). *Organic Geochemistry* 37, 1736-1751.
- Cotrim da Cunha, L., Serve, L., Gadel, F., Blazi, J.-L., 2001. Lignin-derived phenolic compounds in the particulate organic matter of a French Mediterranean river: Seasonal and spatial variations. *Organic Geochemistry* 32, 305-320.
- Cowie, G.L., Hedges, J.I., 1984. Carbohydrate sources in a coastal marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2075-2087.
- Dai, J., Ran, W., Xing, B., Gu, M., Wang, L., 2006. Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils. *Geoderma* 135, 284-295.
- del Río, J.C., Martin, F., Gonzalez-Vila, F.J., 1996. Thermally assisted hydrolysis and alkylation as a novel pyrolytic approach for the structural characterization of natural biopolymers and geomacromolecules. *Trends in Analytical Chemistry* 15, 70-79.
- del Río, J.C., McKinney, D.E., Knicker, H., Nanny, M.A., Minard, R.D., Hatcher, P.G., 1998. Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Chromatography A* 823, 433-448.
- del Río, J.C., Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M., Ibarra, D., Martínez, Á.T., 2007. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 79, 39-46.

- del Río, J.C., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Santos, J.I., Jiménez-Barbero, J., Zhang, L., Martínez, Á.T., 2008. Highly acylated (acetylated and/or *p*-coumaroylated) native lignins from diverse herbaceous plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9525-9534.
- Deport, C., 2002. Etude structurale des substances humiques en zones humides : Marais Poitevin, Marais de Rochefort, Marais de Gironde. Thèse de l'Université de Poitiers, France.
- Dickson, L., Bull, I.D., Gates, P.J., Evershed, R.P., 2009. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fatty acids from glycolipid and phospholipid fractions. *Journal of Microbiological Methods* 78, 249-254.
- Dignac, M.F., Houot, S., Francou, C., Derenne, S., 2005. Pyrolytic study of compost and waste organic matter. *Organic Geochemistry* 36, 1054-1071.
- Donaldson, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859-873.
- D'Orazio, V., Senesi, N., 2009. Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size-exclusion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1775-1781.
- Dron, J., Linke, R., Rosenberg, E., Schreiner, M., 2004. Trimethylsulfonium hydroxide as derivatization reagent for the chemical investigation of drying oils in works of art by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1047, 111-116.
- Durand, C., Ruban, V., Amblès, A., 2005. Characterisation of complex organic matter present in contaminated sediments from water retention ponds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 73, 17-28.
- Ertel, J.R., Hedges, J.I., 1984. The lignin component of humic substances: Distribution among soil and sedimentary humic, fulvic, and base-insoluble fractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2065-2074.
- Ertel, J.R., Hedges, J.I., 1985. Sources of sedimentary humic substances: Vascular plant debris. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2097-2107.
- Fabbri, D., Chiavari, G., Galletti, G.C., 1996. Characterization of soil humin by pyrolysis(/methylation)-gas chromatography/mass spectrometry: Structural relationships with humic acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 37, 161-172.
- Fabbri, D., Helleur, R., 1999. Characterization of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49, 277-293.

- Fabbri, D., Chiavari, G., 2001. Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane. *Analytica Chimica Acta* 449, 271-280.
- Fabbri, D., Vassura, I., Snape, C.E., 2002a. Simple off-line flash pyrolysis procedure with in situ silylation for the analysis of hydroxybenzenes in humic acids and coals. *Journal of Chromatography A* 967, 235-242.
- Fabbri, D., Chiavari, G., Prati, S., Vassura, I., Vangelista, M., 2002b. Gas chromatography/mass spectrometric characterisation of pyrolysis/silylation products of glucose and cellulose. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 2349-2355.
- Fabbri, D., Prati, S., Vassura, I., Chiavari, G., 2003. Off-line pyrolysis/silylation of cellulose and chitin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69, 163-171.
- Fabbri, D., Baravelli, V., Chiavari, G., Prati, S., 2005. Dimethyl carbonate as a novel methylating reagent for fatty acids in analytical pyrolysis. *Journal of Chromatography A* 1065, 257-264.
- Faulon, J.-L., Carlson, G.A., Hatcher, P.G., 1994. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. *Organic Geochemistry* 21, 1169-1179.
- Filley, T.R., Minard, R.D., Hatcher, P.G., 1999. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis: Proposed mechanisms based upon the application of <sup>13</sup>C-labeled TMAH to a synthetic model lignin dimer. *Organic Geochemistry* 30, 607-621.
- Filley, T.R., Nierop, K.G.J., Wang, Y., 2006. The contribution of polyhydroxyl aromatic compounds to tetramethylammonium hydroxide lignin-based proxies. *Organic Geochemistry* 37, 711-727.
- Fiorentino, G., Spaccini, R., Piccolo, A., 2006. Separation of molecular constituents from a humic acid by solid-phase extraction following a transesterification reaction. *Talanta* 68, 1135-1142.
- Francioso, O., Montecchio, D., Gioacchini, P., Cavani, L., Ciavatta, C., Trubetskoj, O., Trubetskaya, O., 2009. Structural differences of Chernozem soil humic acids SEC-PAGE fractions revealed by thermal (TG-DTA) and spectroscopic (DRIFT) analyses. *Geoderma* 152, 264-268.
- Garcette-Lepecq, A., Largeau, C., Bouloubassi, I., Derenne, S., Saliot, A., Lorre, A., Point, V., 2004. Lipids and their modes of occurrence in two surface sediments from the Danube delta and northwestern Black Sea: Implications for sources and early diagenetic alteration: I. Carboxylic acids. *Organic Geochemistry* 35, 959-980.

- Gondar, D., Lopez, R., Fiol, S., Antelo, J.M., Arce, F., 2005. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma* 126, 367-374.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990a. Cutin-derived CuO reaction products from purified cuticles and tree leaves. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 3065-3072.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990b. Potential applications of cutin-derived CuO reaction products for discriminating vascular plant sources in natural environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 3073-3081.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1990c. The diagenetic behavior of cutin acids in buried conifer needles and sediments from a coastal marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 3083-3093.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1992. Lignin dimers: Structures, distribution, and potential geochemical applications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 4025-4043.
- Goñi, 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. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 3985-4002.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1995. Sources and reactivities of marine-derived organic matter in coastal sediments as determined by alkaline CuO oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 2965-2981.
- Goñi, M.A., Montgomery, S., 2000. Alkaline CuO oxidation with a microwave digestion system: Lignin analyses of geochemical samples. *Analytical Chemistry* 72, 3116-3121.
- González Pérez, M., Martin-Neto, L., Saab, S.C., Novotny, E.H., Milori, D.M.B.P., Bagnato, V.S., Colnago, L.A., Melo, W.J., Knicker, H., 2004. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma* 118, 181-190.
- González-Pérez, M., Vidal Torrado, P., Colnago, L.A., Martin-Neto, L., Otero, X.L., Milori, D.M.B.P., Gomes, F.H., 2008. <sup>13</sup>C NMR and FTIR spectroscopy characterization of humic acids in spodosols under tropical rain forest in southeastern Brazil. *Geoderma* 146, 425-433.
- Grabber, J.H., Quideau, S., Ralph, J., 1996. *p*-coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for β-ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* 43, 1189-1194.
- Grasset, L., 1997. Etude de l'humine et des acides humiques des sols : importance de la composante lipidique. Université de Poitiers, France.

- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *Organic Geochemistry* 29, 881-891.
- Grasset, L., Guignard, C., Amblès, A., 2002. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetraethylammonium acetate. *Organic Geochemistry* 33, 181-188.
- Grasset, L., Rovira, P., Amblès, A., 2009. TMAH-preparative thermochemolysis for the characterization of organic matter in densimetric fractions of a Mediterranean forest soil. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 85, 435-441.
- Grasset, L., Vlcková, Z., Kucerík, J., Amblès, A., 2010. Characterization of lignin monomers in low rank coal humic acids using the derivatization/reductive cleavage method. *Organic Geochemistry* 41, 905-909.
- Guignard, C., Lemée, L., Amblès, A., 2000. Structural characterization of humic substances from an acidic peat using thermochemolysis techniques. *Agronomie* 20, 465-475.
- Halvorson, J.J., Gonzalez, J.M., Hagerman, A.E., Smith, J.L., 2009. Sorption of tannin and related phenolic compounds and effects on soluble-N in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2002-2010.
- Hänninen, K., 1992. Cupric oxide oxidation of peat and coal humic acids. *Science of The Total Environment* 117-118, 75-82.
- Hardell, H.-L., Nilvebrant, N.-O., 1999. A rapid method to discriminate between free and esterified fatty acids by pyrolytic methylation using tetramethylammonium acetate or hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 52, 1-14.
- Hartgers, W.A., Sinninghe Damsté, J.S., de Leeuw, J.W., 1992. Identification of C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> alkylated benzenes in flash pyrolysates of kerogens, coals and asphaltenes. *Journal of Chromatography A* 606, 211-220.
- Hatcher, P.G., Clifford, D.J., 1994. Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Organic Geochemistry* 21, 1081-1092.
- Hatcher, P.G., Minard, R.D., 1996. Comparison of dehydrogenase polymer (DHP) lignin with native lignin from gymnosperm wood by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 24, 593-600.
- Hautala, K., Peuravuori, J., Pihlaja, K., 1997. Estimation of origin of lignin in humic dom by CuO-oxidation. *Chemosphere* 35, 809-817.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54, 174-178.

- Hedges, J.I., Blanchette, R.A., Weliky, K., Devol, A.H., 1988. Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2717-2726.
- Heim, A., Schmidt, M.W.I., 2007. Lignin turnover in arable soil and grassland analysed with two different labelling approaches. *European Journal of Soil Science* 58, 599-608.
- Hernes, P.J., Hedges, J.I., 2000. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. *Analytical Chemistry* 72, 5115-5124.
- Hernes, P.J., Hedges, J.I., 2004. Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 1293-1307.
- Hetherington, S., Anderson, J.M., 1998. Simplified procedure for the characterisation of plant lignins by alkaline CuO oxidation. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1477-1480.
- Hu, S., Coleman, D.C., Beare, M.H., Hendrix, P.F., 1995. Soil carbohydrates in aggrading and degrading agroecosystems: Influences of fungi and aggregates. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 54, 77-88.
- Hu, F.S., Hedges, J.I., Gordon, E.S., Brubaker, L.B., 1999. Lignin biomarkers and pollen in postglacial sediments of an Alaskan lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 1421-1430.
- Hyötyläinen, J., Knuutinen, J., Vilén, E., 1995. Characterization of high molecular mass fractions of receiving waters and sediments of a pulp mill by CuO-oxidation and HPLC. *Chemosphere* 30, 891-906.
- Hyötyläinen, J., Knuutinen, J., Malkavaara, P., Siltala, J., 1998. Pyrolysis-GC-MS and CuO-oxidation-HPLC in the characterization of HMMs from sediments and surface waters downstream of a pulp mill. *Chemosphere* 36, 297-314.
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J.F., Chang, H.-M., Jameel, H., 2002. Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 129-135.
- Ikeya, K., Yamamoto, S., Watanabe, A., 2004. Semiquantitative GC/MS analysis of thermochemolysis products of soil humic acids with various degrees of humification. *Organic Geochemistry* 35, 583-594.
- Ishida, Y., Wakamatsu, S., Yokoi, H., Ohtani, H., Tsuge, S., 1999. Compositional analysis of polyunsaturated fatty acid oil by one-step thermally assisted hydrolysis and methylation in the presence of trimethylsulfonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49, 267-276.



- Ivarson, K.C., Sowden, F.J., 1962. Methods for the analysis of carbohydrate material in soil: I. Colorimetric determination of uronic acids, hexoses, and pentoses. *Soil Science* 94, 245-250.
- Jeziarski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Drozd, J., 2000. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies on stable and transient radicals in humic acids from compost, soil, peat and brown coal. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 56, 379-385.
- Joll, C.A., Couton, D., Heitz, A., Kagi, R.I., 2004. Comparison of reagents for off-line thermochemolysis of natural organic matter. *Organic Geochemistry* 35, 47-59.
- Kanerva, S., Kitunen, V., Kiikkilä, O., Loponen, J., Smolander, A., 2006. Response of soil C and N transformations to tannin fractions originating from Scots pine and Norway spruce needles. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1364-1374.
- Kiem, R., Kögel-Knabner, I., 2003. Contribution of lignin and polysaccharides to the refractory carbon pool in C-depleted arable soils. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 101-118.
- Killops, S., Killops, V., 2005. *Introduction to organic geochemistry*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, 465-501.
- Kobayashi, T., Shigematsu, M., Tanahashi, M., 2005. Application of the DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage) method to dilignols. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 25, 41-50.
- 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, 637-640.
- Kögel-Knabner, I., 1997.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma* 80, 243-270.
- Kögel-Knabner, I., 2000. Analytical approaches for characterizing soil organic matter. *Organic Geochemistry* 31, 609-625.
- Koivula, N., Hänninen, K., 2001. Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification. *Chemosphere* 44, 271-279.
- Kolattukudy, P.E., 1980a. Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.

- Kolattukudy, P.E., 1980b. Cutin, suberin and waxes. In: Stumpf, P.K (Ed.). The biochemistry of plant lipids structure and function. Academic Press, New York, 571-645.
- Kossa, W.C., MacGee, J., Ramachandran, S., Webber, A.J., 1979. Pyrolytic methylation/gas chromatography: A short review. *Journal of Chromatographic Science* 17, 177-187.
- Kribii, A., Lemée, L., Chaouch, A., Amblès, A., 2001. Structural study of the Moroccan Timahdit (Y-layer) oil shale kerogen using chemical degradations. *Fuel* 80, 681-691.
- Kuroda, K.-I., 2000. Pyrolysis-trimethylsilylation analysis of lignin: Preferential formation of cinnamyl alcohol derivatives. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 56, 79-87.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., 2005a. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Behavior of 4-O-etherified cinnamyl alcohols and aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8859-8865.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., 2005b. Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis of guaiacyl-syringyl and guaiacyl dehydrogenation polymers. *Organic Geochemistry* 36, 53-61.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., 2006. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Improvement of the distribution profile of products derived from  $\beta$ -aryl ether subunits. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75, 104-111.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., Ashitani, T., Fujita, K., 2009. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of 2-arylcoumaran lignin model compounds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 86, 185-191.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., 1985. Thioacidolysis of lignin: Comparison with acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 5, 277-292.
- Lapierre, C., Pilate, G., Pollet, B., Mila, I., Leplé, J.-C., Jouanin, L., Kim, H., Ralph, J., 2004. Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins. *Phytochemistry* 65, 313-321.
- Largeau, C., Derenne, S., Casadevall, E., Kadouri, A., Sellier, N., 1986. Pyrolysis of immature Torbanite and of the resistant biopolymer (PRB A) isolated from extant alga *Botryococcus braunii*. Mechanism of formation and structure of torbanite. *Organic Geochemistry* 10, 1023-1032.
- Lehtonen, K., Hänninen, K., Ketola, M., 2001. Structurally bound lipids in peat humic acids. *Organic Geochemistry* 32, 33-43.
- Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K., 2003. Comparison of quaternary methyl-, ethyl- and butylammonium hydroxides as alkylating reagents in pyrolysis-GC/MS studies of aquatic fulvic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69, 315-329.

- Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K., 2004. Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium atmospheres. *Analytica Chimica Acta* 511, 349-356.
- Li, L., Jia, W., Peng, P.a., Sheng, G., Fu, J., Huang, W., 2006. Compositional and source characterization of base progressively extracted humic acids using pyrolytic gas chromatography mass spectrometry. *Applied Geochemistry* 21, 1455-1468.
- Lima, D.L.D., Duarte, A.C., Esteves, V.I., 2007. Solid-phase extraction and capillary electrophoresis determination of phenols from soil after alkaline CuO oxidation. *Chemosphere* 69, 561-568.
- Loh, P.S., Reeves, A.D., Harvey, S.M., Overnell, J., Miller, A.E.J., 2008. The fate of terrestrial organic matter in two Scottish sea lochs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 566-579.
- Lu, F., Ralph, J., 1997a. DFRC method for lignin analysis. 1. New method for  $\beta$ -aryl ether cleavage: Lignin model studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4655-4660.
- Lu, F., Ralph, J., 1997b. Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2590-2592.
- Lu, F., Ralph, J., 1998a. The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 547-552.
- Lu, F., Ralph, J., 1998b. The DFRC method for lignin analysis. Part 3. NMR studies. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 18, 219-233.
- Lu, F., Ralph, J., 1999a. The DFRC method for lignin analysis. 7. Behavior of cinnamyl end groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1981-1987.
- Lu, F., Ralph, J., 1999b. Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1988-1992.
- Mansuy, L., Bourezgui, Y., Garnier-Zarli, E., Jardé, E., Réveillé, V., 2001. Characterization of humic substances in highly polluted river sediments by pyrolysis methylation-gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 32, 223-231.
- Marita, J.M., Ralph, J., Hatfield, R.D., Guo, D., Chen, F., Dixon, R.A., 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 62, 53-65.

- Martín, F., González-Vila, F.J., del Río, J.C., Verdejo, T., 1994. Pyrolysis derivatization of humic substances 1. Pyrolysis of fulvic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 28, 71-80.
- Martín, F., del Río, J.C., González-Vila, F.J., Verdejo, T., 1995a. Pyrolysis derivatization of humic substances 2. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 31, 75-83.
- Martín, F., del Río, J.C., González-Vila, F.J., Verdejo, T., 1995b. Thermally assisted hydrolysis and alkylation of lignins in the presence of tetra-alkylammonium hydroxides. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 35, 1-13.
- Mason, S.L., Filley, T.R., Abbott, G.D., 2009. The effect of afforestation on the soil organic carbon (SOC) of a peaty gley soil using on-line thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) in the presence of <sup>13</sup>C-labelled tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 85, 417-425.
- McCarthy, R.D., Duthie, A.H., 1962. A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids. *Journal of Lipid Research* 3, 117-119.
- McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., 2004. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* 527, 105-124.
- Meissl, K., Smidt, E., Schwanninger, M., 2007. Prediction of humic acid content and respiration activity of biogenic waste by means of Fourier transform infrared (FTIR) spectra and partial least squares regression (PLS-R) models. *Talanta* 72, 791-799.
- Miikki, V., Hänninen, K., Knuutinen, J., Hyötyläinen, J., Alén, R., 1994. Characterization of the humic material formed by composting of domestic and industrial biowastes Part 1. HPLC of the cupric oxide oxidation products from humic acids. *Chemosphere* 29, 2609-2618.
- Miltner, A., Emeis, K.-C., 2001. Terrestrial organic matter in surface sediments of the Baltic Sea, Northwest Europe, as determined by CuO oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 1285-1299.
- Modzeleski, J.E., Laurie, W.A., Nagy, B., 1971. Carbohydrates from Santa Barbara Basin sediments: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of trimethylsilyl derivatives. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 35, 825-838.
- Moers, M.E.C., Boon, J.J., De Leeuw, J.W., Baas, M., Schenck, P.A., 1989. Carbohydrate speciation and Py-MS mapping of peat samples from a subtropical open marsh environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53, 2011-2021.

- Moers, M.E.C., Baas, M., De Leeuw, J.W., Boon, J.J., Schenck, P.A., 1990. Occurrence and origin of carbohydrates in peat samples from a red mangrove environment as reflected by abundances of neutral monosaccharides. *Geochimica Cosmochimica Acta* 54, 2463-2472.
- Naafs, D.F.W., Nierop, K.G.J., van Bergen, P.F., de Leeuw, J.W., 2005. Changes in the molecular composition of ester-bound aliphatics with depth in an acid andic forest soil. *Geoderma* 127, 130-136.
- Nakagawa-izumi, A., Kuroda, K.-I., Ozawa, T., 2004. Thermochemolytic behavior of  $\beta$ - $\beta$  lignin structures in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 35, 763-774.
- Nakanishi, O., Ishida, Y., Hirao, S., Tsuge, S., Ohtani, H., Urabe, J., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T., 2003. Highly sensitive determination of lipid components including polyunsaturated fatty acids in individual zooplankters by one-step thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography in the presence of trimethylsulfonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69, 187-195.
- Nierop, K.G.J., 2001. Temporal and vertical organic matter differentiation along a vegetation succession as revealed by pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61, 111-132.
- Nierop, K.G.J., Pulleman, M.M., Marinissen, J.C.Y., 2001a. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: A study using pyrolysis techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 755-764.
- Nierop, K.G.J., van Lagen, B., Buurman, P., 2001b. Composition of plant tissues and soil organic matter in the first stages of a vegetation succession. *Geoderma* 100, 1-24.
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., Verstraten, J.M., 2003. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry* 34, 719-729.
- Nierop, K.G.J., Filley, T.R., 2007. Assessment of lignin and (poly-)phenol transformations in oak (*Quercus robur*) dominated soils by  $^{13}\text{C}$ -TMAH thermochemolysis. *Organic Geochemistry* 38, 551-565.
- Nierop, K.G.J., Filley, T.R., 2008. Simultaneous analysis of tannin and lignin signatures in soils by thermally assisted hydrolysis and methylation using  $^{13}\text{C}$ -labeled TMAH. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 83, 227-231.

- Nip, M., Tegelaar, E.W., Brinkhuis, H., De Leeuw, J.W., Schenck, P.A., Holloway, P.J., 1986. Analysis of modern and fossil plant cuticles by Curie point Py-GC and Curie point Py-GC-MS: Recognition of a new, highly aliphatic and resistant biopolymer. *Organic Geochemistry* 10, 769-778.
- Ogier, S., Disnar, J.-R., Albéric, P., Bourdier, G., 2001. Neutral carbohydrate geochemistry of particulate material (trap and core sediments) in an eutrophic lake (Aydat, France). *Organic Geochemistry* 32, 151-162.
- Okuyama, S., Mitsui, T., Ishida, Y., Ohtani, H., Tsuge, S., 2002. Discriminative analysis of denatured vegetable oils by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography combined with multivariate analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 64, 187-196.
- Opsahl, S., Benner, R., 1995. Early diagenesis of vascular plant tissues: Lignin and cutin decomposition and biogeochemical implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4889-4904.
- Peng, J., Lu, F., Ralph, J., 1998. The DFRC method for lignin analysis. 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded loblolly pine wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 553-560.
- Peng, J., Lu, F., Ralph, J., 1999. Isochroman lignin trimers from DFRC-degraded *Pinus taeda*. *Phytochemistry* 50, 659-666.
- Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* 166, 810-832.
- Poerschmann, J., Trommler, U., Fabbri, D., Górecki, T., 2007. Combined application of non-discriminated conventional pyrolysis and tetramethylammonium hydroxide-induced thermochemolysis for the characterization of the molecular structure of humic acid isolated from polluted sediments from the Ravenna Lagoon. *Chemosphere* 70, 196-205.
- Poirier, N., Sohi, S.P., Gaunt, J.L., Mahieu, N., Randall, E.W., Powelson, D.S., Evershed, R.P., 2005. The chemical composition of measurable soil organic matter pools. *Organic Geochemistry* 36, 1174-1189.
- Pouwels, A.D., Eijkel, G.B., Boon, J.J., 1989. Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 14, 237-280.
- Quéneá, K., Derenne, S., Largeau, C., Rumpel, C., Mariotti, A., 2004. Variation in lipid relative abundance and composition among different particle size fractions of a forest soil. *Organic Geochemistry* 35, 1355-1370.

- Raghavan, S.K., Ho, C.-T., Daun, H., 1986. Identification of soy protein in meat by pyrolysis-high-resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 351, 195-202.
- Ralph, J., Lu, F., 1998a. The DFRC method for lignin analysis. 6. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4616-4619.
- Ralph, J., Peng, J., Lua, F., 1998b. Isochroman structures in lignin: A new  $\beta$ -1 pathway. *Tetrahedron Letters* 39, 4963-4964.
- Reeves, A.D., Preston, M.R., 1989. The composition of lignin in estuarine suspended particulates and the distribution of particulate lignin in estuaries as determined by capillary gas chromatography of cupric oxide oxidation products. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 29, 583-599.
- Roberts, P., Jones, D.L., 2008. Critical evaluation of methods for determining total protein in soil solution. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1485-1495.
- Robertson, S.A., Mason, S.L., Hack, E., Abbott, G.D., 2008. A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. *Organic Geochemistry* 39, 945-951.
- Rovira, P., Vallejo, R.V., 2007. Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 202-215.
- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F., 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry* 33, 1131-1142.
- Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2006. Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction-acetylation. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1478-1481.
- Russell, J.D., Vaughan, D., Jones, D., Fraser, A.R., 1983. An IR spectroscopic study of soil humin and its relationship to other soil humic substances and fungal pigments. *Geoderma* 29, 1-12.
- Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W., 1987. Chemical structure of a soil humic acid as revealed by analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11, 367-376.
- Scalarone, D., Chiantore, O., Riedo, C., 2008. Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of on-line pyrolysis-silylation products of monosaccharides. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 83, 157-164.

- Schmidt, H., Tadjimukhamedov, F.K., Douglas, K.M., Prasad, S., Smith, G.B., Eiceman, G.A., 2006. Quantitative assessment and optimization of parameters for pyrolysis of bacteria with gas chromatographic analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 76, 161-168.
- Schnitzer, M., 1974. Alkaline cupric oxide oxidation of a methylated fulvic acid. *Soil Biology and Biochemistry* 6, 1-6.
- Schnitzer, M., Neyroud, J.A., 1975. Further investigations on the chemistry of fungal "humic acids". *Soil Biology and Biochemistry* 7, 365-371.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M., 1992. Structural studies on soil humic acids by Curie-Point Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Soil Science* 153, 205-224.
- Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1997. The chemistry of soil organic nitrogen: A review. *Biology and Fertility of Soils* 26, 1-15.
- Schwarzinger, C., 2003. On the mechanism of thermally assisted hydrolysis and methylation of carbohydrates: The contribution of aldol and retroaldol reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69, 137-149.
- Shadkami, F., Estevez, S., Helleur, R., 2009. Analysis of catechins and condensed tannins by thermally assisted hydrolysis/methylation-GC/MS and by a novel two step methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 85, 54-65.
- Shadkami, F., Helleur, R., 2010. Recent applications in analytical thermochemolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 89, 2-16.
- Shadkami, F., Sithole, B.B., Helleur, R., 2010. Rapid screening of hardwood and softwood lignin using low temperature thermochemolysis with a GC injection port. *Organic Geochemistry* 41, 586-594.
- Shin, H.-S., Monsallier, J.M., Choppin, G.R., 1999. Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta* 50, 641-647.
- Shirshova, L.T., Ghabbour, E.A., Davies, G., 2006. Spectroscopic characterization of humic acid fractions isolated from soil using different extraction procedures. *Geoderma* 133, 204-216.
- Sigleo, A.C., 1996. Biochemical components in suspended particles and colloids: Carbohydrates in the Potomac and Patuxent estuaries. *Organic Geochemistry* 24, 83-93.
- Singleton, I., Merrington, G., Colvan, S., Delahunty, J.S., 2003. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. *Applied Soil Ecology* 23, 25-32.
- Sithole, B.B., 2000. *Encyclopedia of analytical chemistry: Applications, theory and instrumentation*. John Wiley & Sons, New-York.



- Spielvogel, S., Prietzel, J., Kögel-Knabner, I., 2007. Changes of lignin phenols and neutral sugars in different soil types of a high-elevation forest ecosystem 25 years after forest dieback. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 655-668.
- Stefanova, M., Disnar, J.R., 2000. Composition and early diagenesis of fatty acids in lacustrine sediments, lake Aydat (France). *Organic Geochemistry* 31, 41-55.
- Stevenson, F.J., 1982. Humus chemistry, genesis, composition, reaction. Wiley Interscience, New York.
- Stevenson, F., 1985. Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken, D.M.M.K., Wershaw, R.L., Mac Carthy, P. (Eds.). Humic substances in soil, sediment and water. Wiley-Interscience, New-York, 13-52.
- Sugden, M.A., Talbot, H.M., Farrimond, P., 2005. Flash pyrolysis - A rapid method for screening bacterial species for the presence of bacteriohopanepolyols. *Organic Geochemistry* 36, 975-979.
- Tesi, T., Langone, L., Goñi, M.A., Miserocchi, S., Bertasi, F., 2008a. Changes in the composition of organic matter from prodeltaic sediments after a large flood event (Po River, Italy). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 2100-2114.
- Tesi, T., Langone, L., Goñi, M.A., Turchetto, M., Miserocchi, S., Boldrin, A., 2008b. Source and composition of organic matter in the Bari canyon (Italy): Dense water cascading versus particulate export from the upper ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 55, 813-831.
- Tohmura, S.-I., Argyropoulos, D.S., 2001. Determination of arylglycerol- $\beta$ -aryl ethers and other linkages in lignins using DFRC/ $^{31}\text{P}$  NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 536-542.
- Ussiri, D.A.N., Johnson, C.E., 2003. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and chemical methods. *Geoderma* 111, 123-149.
- Vitorovic, D., 1980. Structure elucidation of kerogen by chemical methods. *Kerogen. Insoluble Organic Matter from Sedimentary Rocks*, 301-338.
- Vivas, N., Nonier, M.-F., de Gaulejac, N.V., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M., 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513, 247-256.

- White, D.M., Garland, D.S., Beyer, L., Yoshikawa, K., 2004. Pyrolysis-GC/MS fingerprinting of environmental samples. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 71, 107-118.
- Wicks, R.J., Moran, M.A., Pittman, L.J., Hodson, R.E., 1991. Carbohydrate signatures of aquatic macrophytes and their dissolved degradation products as determined by a sensitive high-performance ion chromatography method. *Applied Environmental Microbiology* 57, 3135-3143.
- Windeisen, E., Wegener, G., 2008. Behaviour of lignin during thermal treatments of wood. *Industrial Crops and Products* 27, 157-162.
- Wysocki, L.A., Filley, T.R., Bianchi, T.S., 2008. Comparison of two methods for the analysis of lignin in marine sediments: CuO oxidation versus tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis. *Organic Geochemistry* 39, 1454-1461.
- Yamauchi, K., Tanabe, T., Kinoshita, M., 1979. Trimethylsulfonium hydroxide: A new methylating agent. *The Journal of Organic Chemistry* 44, 638-639.
- Yamauchi, K., Fukushima, K., 2004. The regulation from guaiacyl to syringyl lignin in the differentiating xylem of *Robinia pseudoacacia*. *Comptes Rendus Biologies* 327, 791-797.
- Yosef, E., Ben-Ghedalia, D., 1999. Changes in thioacidolysis products of lignin in wheat straw as affected by SO<sub>2</sub> treatment and passage through the gastro-intestine of sheep. *Animal Feed Science and Technology* 80, 55-65.
- Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C., Saliot, A., 2000. A geochemical investigation of carboxylic acids released via sequential treatments of two surficial sediments from the Changjiang delta and East China Sea. *Organic Geochemistry* 31, 375-388.
- Zhang, W., He, H., Zhang, X., 2007. Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldononitrile acetates. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2665-2669.

**CHAPITRE II : FONCTIONNEMENT D'UNE  
TOURBIERE, PRESENTATION DU SITE  
D'ETUDE ET CARACTERISATIONS  
PRELIMINAIRES**



## I - LES TOURBIERES

Les tourbières sont des écosystèmes dans lesquels l'eau est omniprésente et les quantités de biomasse initiales ou transformées toujours supérieures aux quantités décomposées et minéralisées par l'activité microbienne. Il en résulte une accumulation de matière organique dont la dynamique débouche sur la formation de tourbe, histosol contenant de 75 à 100 % (masse sèche) de matière organique et de 80 à 90 % d'eau (Francez, 2000).

### I. 1 - Répartition géographique

Les tourbières couvrent entre 3 et 4 millions de km<sup>2</sup> et s'étendent ainsi sur près de 3 % de la surface des terres émergées (Francez, 2000 ; Joosten et Clarke, 2002), soit environ 400 millions d'hectares (Charman, 2002). Elles représentent environ 50 à 70 % des zones humides mondiales (Chapman et al., 2003) et se situent principalement, pour 90 % d'entre elles, dans les zones tempérées et boréales de l'hémisphère nord. Le reste (10 %) est situé au niveau des zones tropicales, dont 20 millions d'hectares en Indonésie (Figure II-1, Tableau II-1).

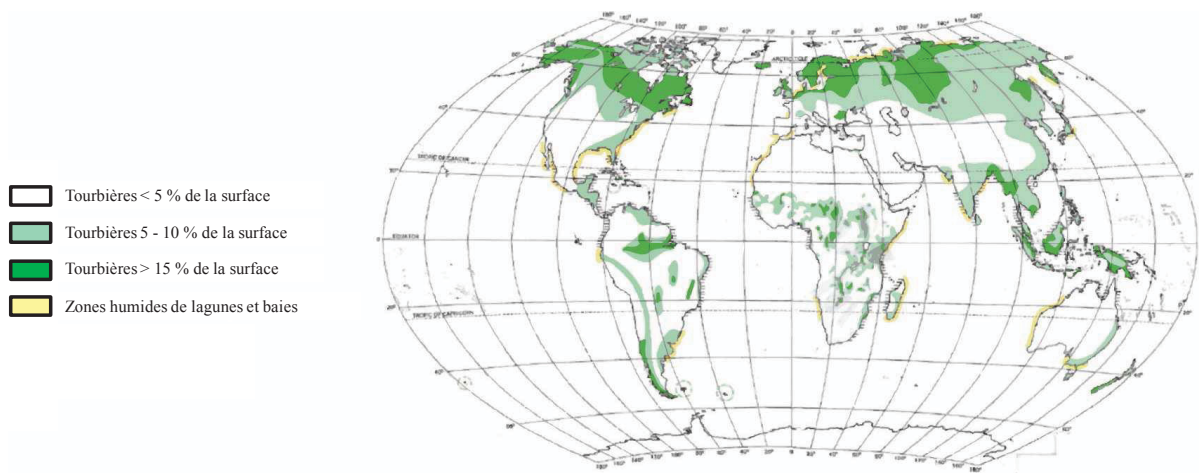


Figure II-1 : Répartition et densité des tourbières à l'échelle mondiale d'après Joosten et Clarke (2002).

Localisation	Surface (10 <sup>3</sup> km <sup>2</sup> )
Amérique du Nord	1735
Asie	1119
Europe	957
Amériques Centrale et du Sud	102
Afrique	58
Australie et Océanie	14
Total	3985

Tableau II-1 : Répartition mondiale des tourbières (Francez, 2000).

Les pays abritant les plus grandes étendues de tourbières sont le Canada (28 % de la surface mondiale des tourbières), les USA (15 %), la Russie (14 %), l'Indonésie (6 %) et la Finlande (3 %). Représentant 34 % du territoire national, c'est dans ce dernier pays que la proportion des terres occupées par les tourbières est la plus élevée (Francez, 2000). En France, suite à leur importante exploitation depuis le Moyen-Age, les tourbières représentent aujourd'hui moins de 1 % de la superficie du pays (environ 60 000 ha) mais la diversité y est grande (Manneville et al., 1999 ; Maitre, 2003).

## I. 2 - L'eau et la formation des tourbières

La formation des tourbières résulte d'une interaction complexe entre différents facteurs. Un bilan hydrique positif, c'est-à-dire un excédent d'apports d'eau (précipitations, ruissellements, sources, ...) par rapport à l'ensemble des pertes (évaporations, évapotranspirations, écoulements, ...), est nécessaire pendant la majeure partie de l'année. Pour que ce bilan soit positif, il faut non seulement tenir compte des apports en eau mais également de la température. La chaleur agit sur les transferts hydriques et active le métabolisme des microorganismes et la minéralisation de la matière organique. C'est pourquoi l'existence de systèmes tourbeux et leur répartition sont directement dépendantes du climat. Ainsi, les climats les plus favorables pour l'établissement des tourbières ombrotrophes (uniquement alimentées en eau par les précipitations atmosphériques) seront ceux qui allient des précipitations importantes à des températures relativement basses. Des tourbières peuvent également se développer sous des climats chauds (tropicaux par exemple) à condition que les pertes importantes d'eau par évapotranspiration soient compensées par d'abondantes précipitations et que la production primaire nette (c'est-à-dire la matière végétale produite sur place) soit nettement supérieure à celle éliminée par les processus de décomposition.

D'autres facteurs locaux, jouant un rôle à la fois dans le bilan hydrique et dans le bilan d'accumulation de la tourbe, peuvent également être pris en considération (Manneville et al., 1999). La topographie doit pouvoir retenir les eaux de pluie ou de ruissellement (pentes plus ou moins fortes, présence de creux, cols aplanis ...). De même, le substrat géologique doit présenter des caractéristiques physiques permettant la rétention des eaux (imperméable, peu poreux, peu fissuré, ...). Ainsi, l'accroissement en épaisseur de la tourbe peut être initié à partir d'une pièce d'eau qui va être progressivement comblée (processus d'atterrissement) ou à partir d'un substrat terrestre (processus de paludification) ayant des conditions hydriques favorables (Francez, 2000). Le processus de développement de la tourbière mis en jeu au cours de l'atterrissement d'une pièce d'eau est représenté sur la Figure II-2.

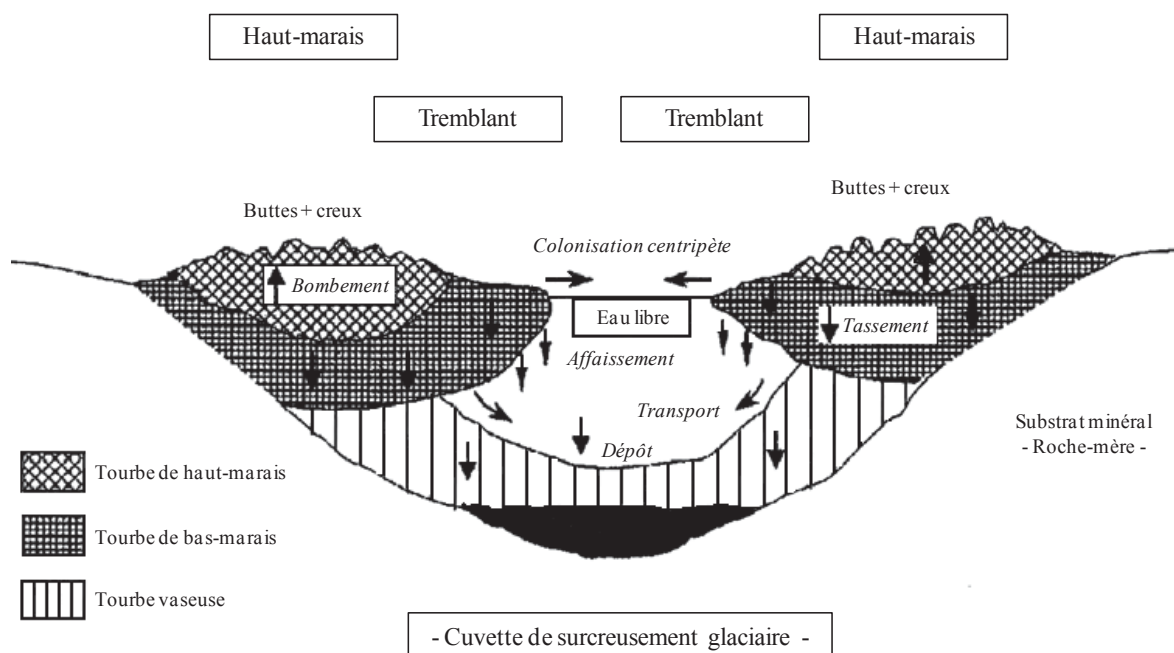


Figure II-2 : Processus de développement de la tourbière mis en jeu au cours de l'atterrissement d'une pièce d'eau (Francez, 2000).

Trois zones distinctes sont représentées :

- la zone d'épaississement : près du lac, la croissance verticale permet l'épaississement du radeau flottant,
- la zone de tassement : à ce niveau, la base étant en contact avec les débris de la tourbe et la vase du fond du lac, colmatage et élévation de la surface (bombement) se combinent,
- la zone d'équilibre dans laquelle la tourbe a atteint une densité maximale et où sa production ne débouche plus sur un tassement des couches profondes.

A partir de cette dernière zone, lorsque les conditions climatiques et géologiques le permettent, la tourbière continue sa croissance en hauteur et le bombement peut être important. La préservation de la matière organique, et donc du carbone organique, est principalement due à l'engorgement et donc à l'anoxie du milieu qui, généralement combinés à de faibles températures, contribuent à limiter fortement l'activité microbienne et donc la décomposition de la matière organique. Celle-ci peut alors s'accumuler pour former la tourbe (Clymo, 1983).

Enfin, les caractéristiques chimiques des roches en place, des alluvions, des arènes ou des sols telles que l'acidité ou la teneur en ions sont également à considérer. Elles ont une influence importante sur (i) les possibilités de dégradation et de recyclage de la matière organique, (ii) l'abondance et la nature des microorganismes responsables des premières étapes de dégradation de la matière organique et sur (iii) la végétation qui va pouvoir coloniser le milieu tourbeux (Manneville et al., 1999).

### I. 3 - Classification

Il existe un nombre important de classifications des tourbières selon l'importance donnée aux différents critères utilisables pour leur topologie. Elles diffèrent selon les disciplines pour lesquelles elles ont été élaborées. Cependant, la plupart tiennent compte du mode d'alimentation en eau de la tourbière (Manneville et al., 1999). Ainsi, une tourbière uniquement alimentée par les eaux des précipitations est dite ombrogène. C'est le cas des tourbières bombées ou de couverture. Lorsque le système d'alimentation en eau est dominé par les eaux d'écoulement, enrichies au contact des zones qu'elles traversent, les tourbières sont dites géogènes.

Pour les tourbières à sphaignes, une classification hydrochimique permet de distinguer trois grandes catégories : (i) les bas-marais minérotrophiques, (ii) les haut-marais ombrotrophiques et (iii) les tourbières de transition ombro-minérotrophiques (Francez, 2000). Les principales caractéristiques des bas- et haut-marais sont données dans le Tableau II-2.



	Bas-marais	Haut-marais
Alimentation en eau	Géogène	Ombrogène
Statut trophique	Riche en nutriments (N, P)	Pauvres en éléments nutritifs
Origine botanique de la tourbe	Herbacée (laîches), arborée (aulne), muscinale (hypnacées), peu de sphaignes	Sphaignes, linaigrettes, petits arbrisseaux (canneberge, andromède ...)
Couleur de la tourbe	Noire	Blonde
Degré d'humification	Fort	Faible
Topographie	Plate	Convexe
Types biologiques	Hydrophyte, hémicryptophyte	Hémicryptophyte, chaméphyte

Tableau II-2 : Caractéristiques respectives des bas- et haut-marais (Francez, 2000).

## II - DYNAMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE DANS LES TOURBIERES

### II. 1 - Cycle du carbone dans les tourbières

Les tourbières renferment un stock important de carbone estimé entre 300 et 455 Gt de carbone soit environ un tiers de l'estimation moyenne du carbone des sols (Gorham, 1991). Elles jouent ainsi un rôle essentiel dans le cycle du carbone de la biosphère.

La Figure II-3 schématise le cycle du carbone dans les tourbières et met en évidence (i) les apports de carbone par la voie photosynthétique, (ii) les processus de dégradation de la biomasse végétale et (iii) les pertes de carbone sous la forme de CO<sub>2</sub> (respiration), de CH<sub>4</sub> et de carbone organique soluble (pertes par lessivage).

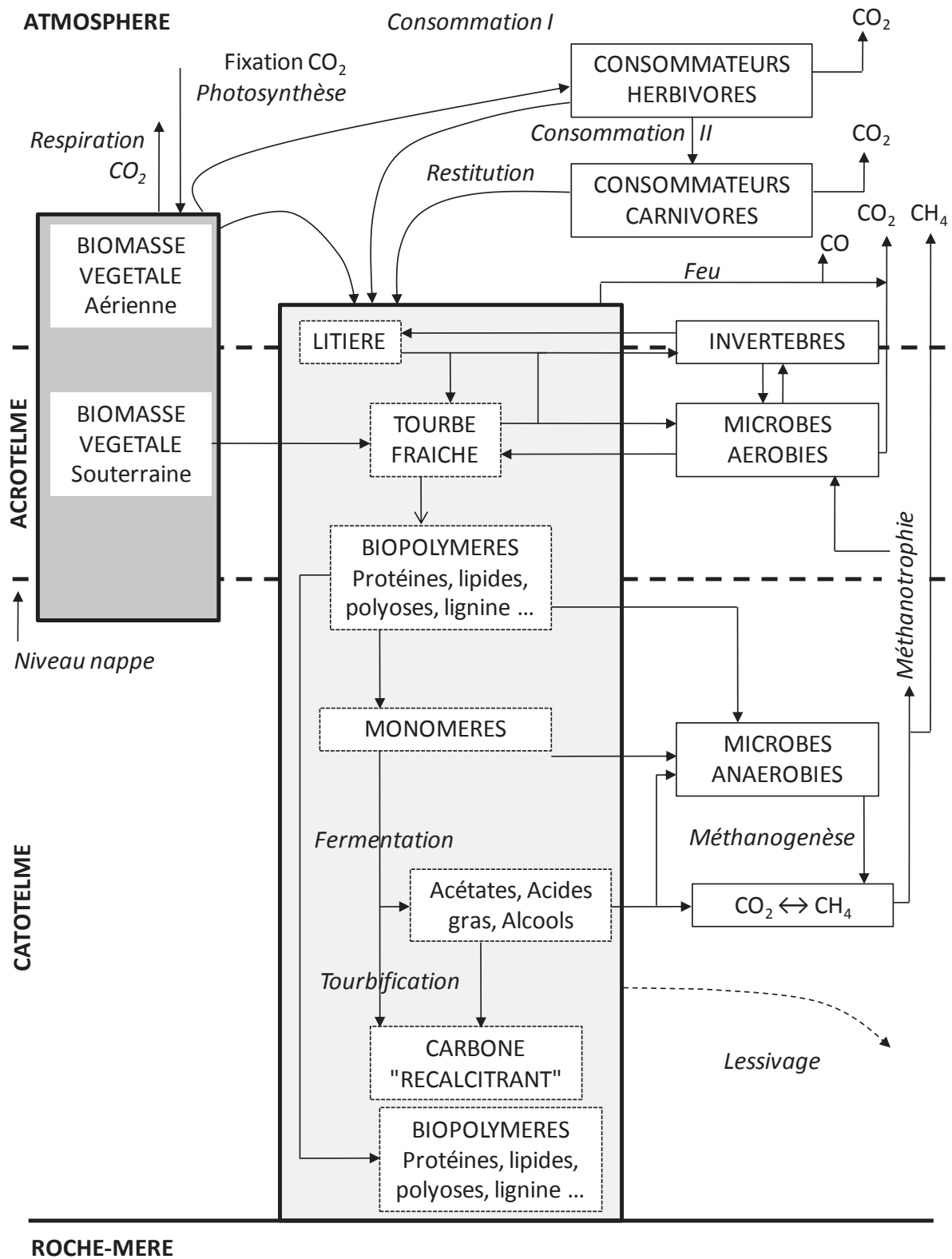


Figure II-3 : Cycle du carbone dans les tourbières d'après Francez (2000).

En conditions "normales", les tourbières fonctionnent comme des systèmes "puits" pour le carbone, principalement sous la forme de CO<sub>2</sub>, avec une fixation annuelle de l'ordre de 0,1 Gt (Gorham, 1991 ; Heikkinen et al., 2002). Cependant, dans ces mêmes conditions, les

tourbières fonctionnent également comme des systèmes "sources" pour le carbone, principalement sous la forme de CH<sub>4</sub>, avec des émissions de 24 à 39 kg de carbone par an (Martikainen et al., 1995 ; Francez, 2000). Ces flux entrants et sortants résultent des processus de régulation du cycle biogéochimique des tourbières qui est lui-même contrôlé par trois compartiments exerçant chacun une fonction spécifique : (i) les communautés végétales (production primaire), (ii) les communautés microbiennes (dégradation) et (iii) le substrat tourbeux (dégradation et accumulation) (Francez, 2000).

## II. 2 - Production primaire

La production végétale primaire est à l'origine de la formation et de l'accumulation de la tourbe. Elle dépend du climat régional et de la végétation autochtone. Les sphaignes sont la végétation la plus représentative des tourbières ombrotrophes (Breeuwer et al., 2008). Ces bryophytes (appartenant au genre *Sphagnum*) présentent des caractéristiques très spécifiques, aussi bien morphologiques que biochimiques, qui leur permettent de s'adapter aux conditions environnementales difficiles des tourbières (notamment la saturation en eau, les faibles températures et les faibles concentrations en oxygène et en éléments nutritifs). De par la structure cellulaire de leurs feuilles, elles peuvent stocker d'importantes quantités d'eau. En effet, celles-ci sont constituées de deux sortes de cellules : les chlorocystes, cellules vivantes assimilatrices chlorophylliennes prenant en charge la fonction de photosynthèse et assurant ainsi les fonctions métaboliques de la plante ; et les hyalocystes, grandes cellules mortes, non chlorophylliennes, assurant le stockage de l'eau (environ 25 à 30 fois leur poids sec). De plus, les sphaignes ont la capacité de fixer des cations minéraux du milieu (principalement le calcium, le potassium, le sodium et le magnésium nécessaires à leur développement) et, en échange, de libérer des protons qui contribuent à l'acidification du milieu. Cet appauvrissement du milieu en éléments nutritifs et son acidification contribuent à la création de conditions environnementales défavorables à l'installation d'autres plantes pionnières et à l'activité des microorganismes, entraînant une décomposition incomplète de la matière organique et son accumulation (Bragg, 2002).

Il existe de nombreuses données quantitatives sur la production primaire des tourbières. Les ordres de grandeur sont très variables et dépendent du climat régional et de la végétation autochtone. Il apparaît cependant que la production végétale primaire globale des tourbières à sphaignes, estimée à environ 321 gC.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>, est relativement faible par rapport à celle des écosystèmes terrestres (1300 à 10000 g matière sèche.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>) (Gorham, 1991). De plus, de grandes différences en termes de productivité interspécifique des sphaignes ont été

mises en évidence (Figure II-4) et peuvent être dues aux microhabitats ou aux conditions climatiques (Gunnarsson, 2005).

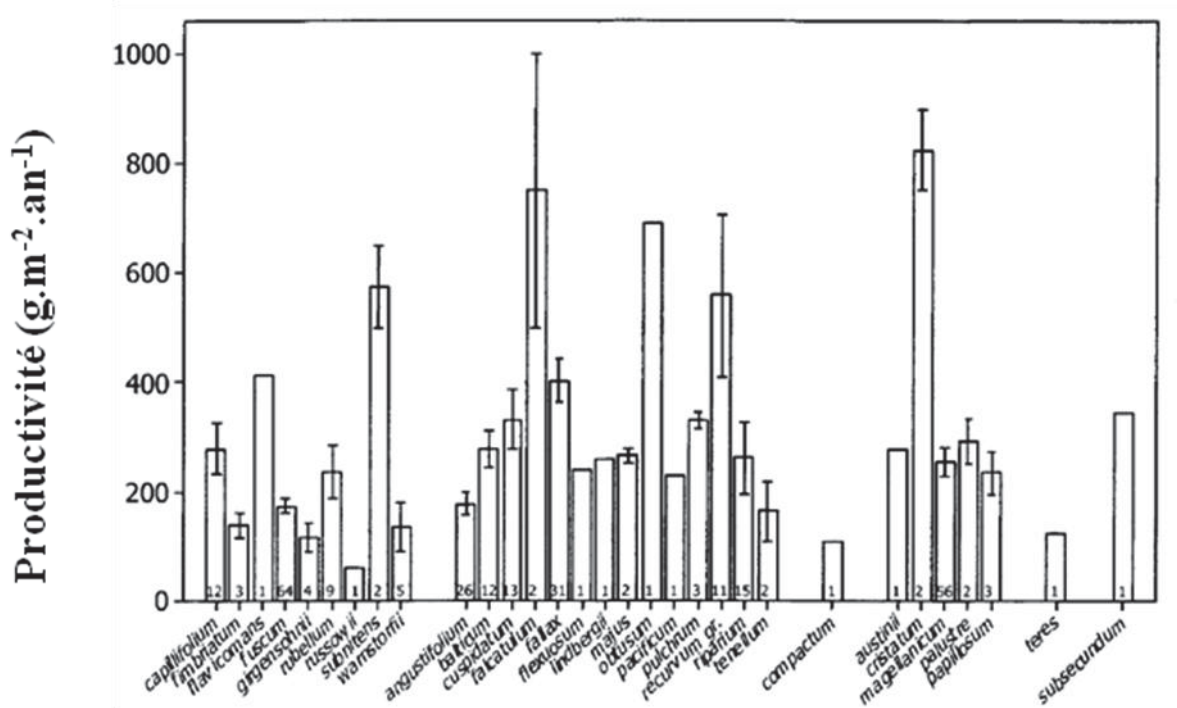


Figure II-4 : Productivité moyenne des espèces de sphaignes d'Europe du Nord et d'Amérique du Sud. Le nombre d'observations pour chacune des espèces est indiqué par le chiffre situé à la base des barres (Gunnarsson, 2005).

## II. 3 - Processus de dégradation et préservation de la matière organique dans la tourbe

### II. 3. 1 - Structure diplotelmique du haut-marais : notions d'acrotelme et de catotelme

La structure verticale d'une tourbière est dite "diplotelmique" et est caractérisée par deux couches dont les principes de fonctionnements hydrologiques et écologiques sont distincts et fondamentaux pour l'accumulation de matière organique (Francez, 2000).

La couche supérieure de la tourbe, ou "acrotelme" (du grec *acros* = partie supérieure et *telma* = couche), est peu décomposée. Au sein de cette couche, de fréquentes fluctuations du niveau de la nappe et de l'humidité sont observées. L'histosol présente périodiquement des phases d'aérobiose et une importante population de microorganismes aérobies. La production de matière vivante et la décomposition y sont donc élevées.

La couche inférieure, appelée "catotelme" (*cato* = en dessous), correspond à la tourbe ancienne, tassée et peu active chimiquement. Elle est située en permanence sous le niveau de la nappe phréatique et se caractérise par un taux d'humidité invariable dans le temps (couche

saturée en permanence), une très faible conductivité hydraulique, une pauvreté en germes microbiens actifs et une très faible production de matière vivante.

Ainsi, de par leurs fonctionnements spécifiques, l'acrotelme et le catotelme présentent leur propre dynamique de dégradation de la matière organique principalement sous l'activité des microorganismes.

### *II. 3. 2 - Processus de dégradation de la matière organique dans l'acrotelme*

L'essentiel de la décomposition se fait lors du transit dans l'acrotelme. Ainsi, 90 % de la matière organique d'origine photosynthétique seraient dégradés sous l'action des microorganismes dans l'acrotelme (Clymo, 1984).

Compte tenu de la grande diversité de la composition biochimique des sphaignes et des tourbes, les processus de dégradation inhérents à l'acrotelme n'ont été que faiblement étudiés. Ils sont ainsi souvent assimilés aux processus de dégradation aérobie se produisant dans les sols minéraux (Payette et Rochefort, 2001) pourtant très distincts de ceux des tourbières en raison de leurs conditions environnementales spécifiques.

Dans un premier temps, la matière organique est physiquement déstructurée lors des processus de diagenèse (Bourdon et al., 2000). Les macromolécules sont partiellement dépolymérisées et hydrolysées. Lors de leur dégradation et/ou assimilation par les microorganismes, les monomères produits (sucres et acides aminés) sont ensuite utilisés soit (i) comme source d'énergie et sont finalement minéralisés en gaz et nutriments, soit (ii) pour synthétiser de nouveaux constituants cellulaires, soit (iii) pour être intégrés dans les substances humiques.

### *II. 3. 3 - Processus de dégradation de la matière organique dans le catotelme*

Les 10 % de matière organique restants (non minéralisés lors de leur transit dans l'acrotelme) sont stockés dans le catotelme. Les conditions anaérobiques de cette couche induisent un taux de décomposition de la matière organique extrêmement faible, inférieur de plus de mille fois à celui de l'acrotelme (Manneville et al., 1999), mais l'activité microbiologique n'y est pas nulle. Ainsi, la dégradation de la matière organique est tout d'abord principalement effectuée par les microorganismes anaérobies (Francez, 2000).

Cette matière organique provient de composés biochimiques résistants des précurseurs végétaux ou ayant été préservés lors des premières étapes de dégradation, des néosynthèses microbiennes et des substances humiques. Elle peut être qualifiée de matière organique "récalcitrante" (Figure II-3).

### III - PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

#### III. 1 - Statut et contexte géographique

La tourbière étudiée est celle de Frasne (ou tourbière du Forbonnet). Elle est localisée dans le bassin du Dugeon, vallée orientée sud-ouest/nord-est, situé dans les départements du Jura (39) et du Doubs (25) dans la région de Franche-Comté. Ce bassin est protégé par de nombreux dispositifs réglementaires au titre de son classement comme réserve naturelle régionale (Franche-Comté), site Natura 2000, site Ramsar<sup>1</sup> et arrêté préfectoral de protection de biotope. Ces dispositifs de protection sont justifiés par la présence d'habitats d'intérêt communautaire (pinède à crochets, haut-marais actif, tourbière de transition) et de nombreuses espèces floristiques protégées à l'échelle nationale et européenne (*Carex limosa*, *Drosera* spp., *Scheuchzeria palustris* et *Andromeda polifolia*). Trente-sept sites tourbeux ont été recensés dans le bassin du Dugeon pour une superficie totale de 1057 ha dont 98 ha sont couverts par la tourbière de Frasne.

La tourbière du Forbonnet (46°49'35"N, 6°10'20"E ; Figure II-5) est située à environ 836 m d'altitude dans la commune de Frasne (Doubs). Elle est composée d'un bas-marais et d'un haut-marais/marais de transition de type ombrotrophe. De ce caractère ombrotrophe résulte la colonisation du milieu par les sphaignes, principales sources de carbone des tourbières de haut-marais. Ainsi, les espèces de sphaignes (*Sphagnum fallax*, *Sphagnum magellanicum* et *Sphagnum warnstorffii*) recouvrent 85 à 95 % du couvert végétal alors que les herbacées (*Eriophorum vaginatum*, *Scheuchzeria palustris*, *Andromeda polifolia*, *Vaccinium oxycoccos* et *Carex limosa*) recouvrent 30 à 60 % du couvert végétal (Bailly, 2005).

---

<sup>1</sup> La Convention sur les zones humides (Ramsar, Iran, 1971), connue sous le nom de "Convention de Ramsar", est un traité intergouvernemental qui incarne les engagements de ses États membres à maintenir les caractéristiques écologiques de leurs zones humides d'importance internationale et à planifier "l'utilisation rationnelle", ou utilisation durable, de toutes les zones humides se trouvant sur leur territoire.

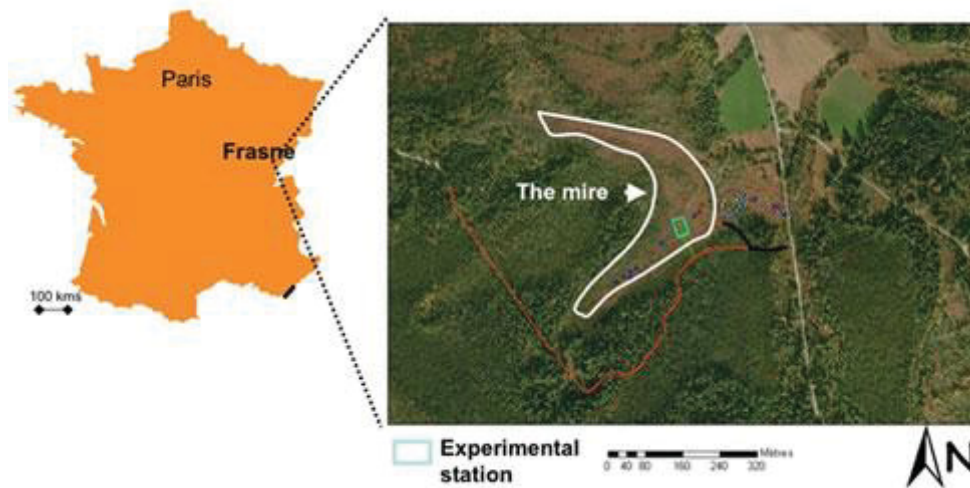


Figure II-5 : Localisation de la station expérimentale au sein de la tourbière de Frasne (la zone entourée en blanc représente le haut-marais/marais de transition qui est la plus active vis-à-vis de l'accumulation de tourbe).

### III. 2 - Contexte géologique

Le bassin de Drugeon est localisé dans le synclinal de Bonneveaux-Frasne. Les dépressions de ce synclinal, dont les formations sont principalement d'âge Crétacé inférieur, sont comblées par des formations glaciaires (Durraffourg et Palacio, 1981 ; Bruckert et Gaiffe, 1985). Ainsi, le remplissage quaternaire glaciaire masque le substratum Crétacé qui n'affleure que rarement (Durraffourg et Palacio, 1981). Les dépôts glaciaires (moraines) sont constitués d'éléments calcaires autochtones et sont datés du Würm (Grandvoinet et al., 1988). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer l'imperméabilisation des dépressions préglaciaires : (i) le dépôt de couches morainiques à pâtes calcaires plus ou moins argileuses et de couches argileuses (Broquet et al., 1978) et (ii) le dépôt de sédiments fins décarbonatés provenant de l'altération de la pâte calcaire des moraines (Bruckert et Gaiffe, 1985). Les tourbières se sont ensuite formées dans les dépressions préglaciaires imperméabilisées au début de la période Atlantique, également qualifiée d'optimum climatique, il y a 7500 ans (Campy et Richard, 1987 ; Grandvoinet et al., 1988 ; Reille, 1991). L'accumulation de tourbe dans ces dépressions peut donc atteindre actuellement plusieurs mètres d'épaisseur (Durraffourg et Palacio, 1981).

III. 3 - Contexte climatique

La région de Frasne est soumise à un climat montagnard continental avec des températures moyennes annuelles de l'ordre de 7 à 8 °C (station de Cernébiaud, Jura) et des précipitations moyennes comprises entre 1300 et 1500 mm.an<sup>-1</sup> (station de Pontarlier, Doubs).

#### IV - CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES DE L'ECHANTILLON DE TOURBE ETUDIE

L'échantillon principal étudié a été prélevé dans la partie périphérique boisée de la tourbière ombrotrophe de Frasne puis congelé à -20 °C. La tourbe est ensuite lyophilisée. Durant cette étape, le suivi de la perte de masse permet de déterminer la teneur en eau de la tourbe étudiée. L'échantillon de tourbe prélevé contient ainsi environ 88 % d'eau.

Pour l'analyse et la quantification de la cellulose et des sucres libres de la tourbière ombrotrophe de Frasne (chapitre IV), un second échantillon a été étudié. Il s'agit d'une colonne de tourbe de 50 cm, prélevée dans une zone de hat-marais à tendance sèche (Delarue et al., 2011). Six niveaux ont été analysés (Figure II-6) : (i) deux collectés dans la partie supérieure de la tourbière (acrotelme), (ii) deux collectés dans la zone de battement des eaux (mésotelme) et (iii) deux collectés dans la partie anaérobie (catotelme).

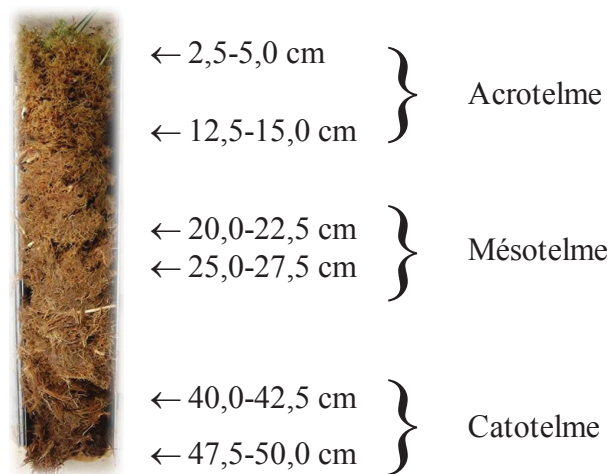


Figure II-6 : Colonne de tourbe utilisée pour l'analyse et la quantification de la cellulose et des sucres libres de la tourbière ombrotrophe.



#### IV. 1 - Caractérisations globales de l'échantillon principal

##### *IV. 1. 1 - Datation par le carbone 14*

L'âge de l'échantillon sec a été estimé à  $-85 \pm 25$  ans B.P. (Before Present : avant 1950) par le Centre de Datation par le Radiocarbone de Villeurbanne.

D'autre part, la partie périphérique boisée de la tourbière, où cet échantillon a été prélevé, est couverte depuis environ 50 ans par des pins du type *Picea abies* et *Pinus uncinata*. L'échantillon étudié associe donc un substrat ancien à un apport gymnosperme plus récent.

##### *IV. 1. 2 - Analyse élémentaire*

Les teneurs en carbone, hydrogène, azote et oxygène sont données dans le Tableau II-3.

	% massique				Ratios molaires		
	C	H	N	O	H/C	O/C	C/N
Tourbe lyophilisée	47,28	6,07	1,87	34,24	1,54	0,54	30,3

Tableau II-3 : Analyse élémentaire de la tourbe lyophilisée.

Le carbone, l'hydrogène et l'oxygène sont les trois éléments les plus abondants. L'azote est largement minoritaire.

La teneur en matière organique de cet échantillon, calculée comme la somme des teneurs en carbone, hydrogène, azote et oxygène, est d'environ 90 %. Les 10 % restants sont constitués de minéraux ou d'eau liée.

##### *IV. 1. 3 - Spectroscopie infrarouge*

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour caractériser les groupements fonctionnels majeurs constitutifs de l'échantillon de tourbe lyophilisée. Le spectre IRTF obtenu est représenté sur la Figure II-7.

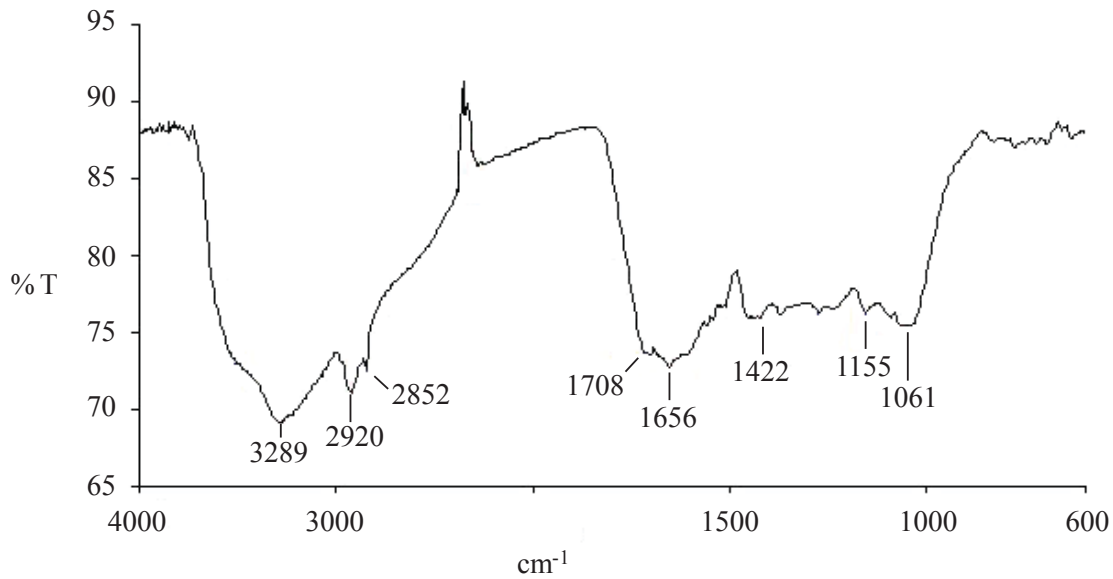


Figure II-7 : Spectre IRTF de la tourbe lyophilisée.

La bande large et intense située à 3289 cm<sup>-1</sup> est due aux vibrations d'étirement des liaisons O-H des alcools et des phénols. Les deux bandes situées à 2920 et 2852 cm<sup>-1</sup> correspondent aux vibrations d'étirements symétriques et antisymétriques des liaisons C-H des groupements aliphatiques. Les bandes de déformation des liaisons C-H, habituellement observées dans les gammes 1460-1440 cm<sup>-1</sup> et 1400-1380 cm<sup>-1</sup>, sont très peu visibles. Les deux bandes situées à 1708 et 1656 cm<sup>-1</sup> sont attribuées aux vibrations d'étirement des liaisons C=O des acides carboxyliques, des aldéhydes et des cétones (bande à 1708 cm<sup>-1</sup>) et à celles des amides primaires présents dans les protéines (bande à 1656 cm<sup>-1</sup>). Les bandes observées dans la gamme 1420-1155 cm<sup>-1</sup> peuvent être attribuées à diverses vibrations des liaisons O-H des alcools aliphatiques et des phénols et à celles des liaisons C-O d'alcools, d'esters ou d'aryl-alkyl éthers. Enfin, la bande située à 1061 cm<sup>-1</sup> est attribuée aux vibrations d'étirement des liaisons C-O des polysaccharides présents dans la matière organique.

Ces bandes d'absorption sont en accord avec celles observées pour d'autres échantillons de tourbes (Chapman et al., 2001 ; Fernandes et al., 2010). Les intensités des bandes d'absorption correspondant aux acides carboxyliques et aux polysaccharides sont cependant plus faibles pour notre échantillon de tourbe.

IV. 2 - Fractionnement de la matière organique de l'échantillon principal

IV. 2. 1 - Résultat du fractionnement

Le protocole de fractionnement utilisé est directement inspiré de la méthode recommandée par la Société Internationale des Substances Humiques (Calderoni et Schnitzer, 1984). Les différentes étapes sont résumées sur la Figure II-8.

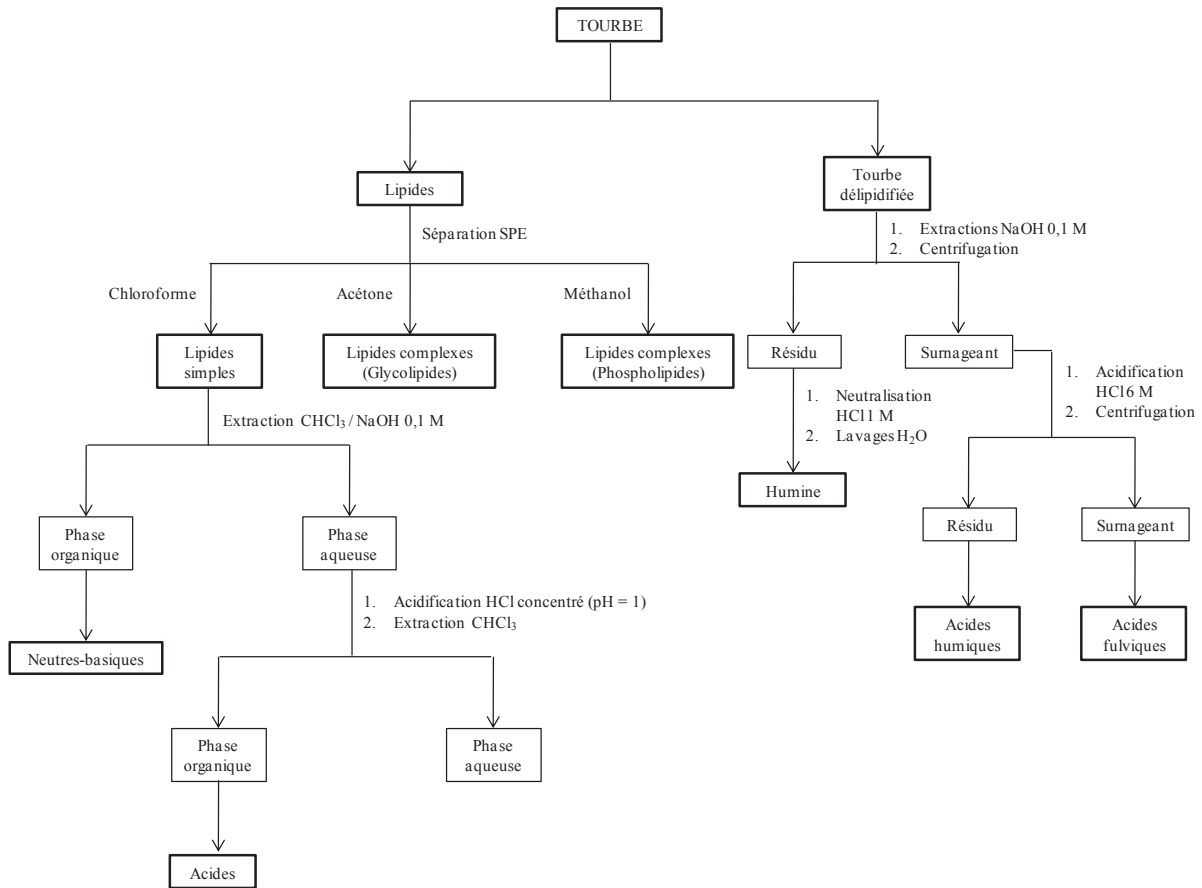


Figure II-8 : Fractionnement de la matière organique.

Les proportions des fractions organiques ainsi isolées sont indiquées dans le Tableau II-4. Les acides humiques apparaissent comme la fraction la plus importante. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de précédentes études réalisées au laboratoire (Grasset, 1997 ; Deport, 2002).

% m.	Lipides	Acides humiques	Acides fulviques	Humine
Tourbe	8,3	42,8	19,9*	29,0

Tableau II-4 : Répartition massique des fractions organiques extraites de la tourbe

(\* les acides fulviques étant obtenus sous forme de sels, la valeur indiquée est obtenue par différence).

#### IV. 2. 2 - Analyse élémentaire des substances humiques

Les teneurs en carbone, hydrogène, azote et oxygène des acides humiques et de l'humine sont données dans le Tableau II-5.

	% massique				Ratios molaires		
	% C	% H	% N	% O	H/C	O/C	C/N
Acides humiques	42,32	1,14	2,08	35,81	0,32	0,63	23,53
Humine	56,41	0,39	1,71	36,64	0,08	0,49	39,17

Tableau II-5 : Analyse élémentaire des substances humiques.

Pour les acides humiques, les teneurs en azote et en oxygène sont du même ordre de grandeur que celles données dans la littérature tandis que les teneurs en carbone et en hydrogène sont légèrement inférieures (Rice et MacCarthy, 1991 ; Fernandes et al., 2010). Les teneurs mesurées pour l'humine sont semblables à celles données dans la littérature (Rice et MacCarthy, 1991). De plus, ces valeurs sont en accord avec celles mesurées lors de précédentes études réalisées au laboratoire sur d'autres échantillons (Grasset, 1997 ; Deport, 2002).

L'étude des ratios H/C, bien qu'étonnamment faibles, permet de mettre en évidence la présence de structures plutôt aromatiques dans les acides humiques et de structures fortement aromatiques dans l'humine. L'étude des rapports atomiques O/C permet, quant à elle, de montrer une oxygénation plus importante dans les acides humiques que dans l'humine.

## V - CONCLUSION

Ce chapitre a tout d'abord permis de rappeler le fonctionnement des tourbières et de souligner l'importance de l'eau dans leur formation. La dynamique de la matière organique des tourbières a également été présentée. Ainsi, sa décomposition est principalement réalisée dans l'acrotelme.

La tourbière de Frasne a été choisie pour cette étude. Deux échantillons différents ont été utilisés. Le premier (l'échantillon principal) a été prélevé dans la partie périphérique boisée de la tourbière. Le second, une colonne de tourbe, a été collecté dans la zone active de la tourbière. Des caractérisations préliminaires de l'échantillon principal ont été détaillées. L'âge de l'échantillon sec a été estimé à  $-85 \pm 25$  ans B.P. et l'analyse élémentaire a évalué une teneur en matière organique proche de 90 %. La spectroscopie infrarouge a mis en évidence des bandes d'absorption caractéristiques des fonctions alcools, acides, carbonyles et des groupements aliphatiques. Enfin, la matière organique a été fractionnée selon le procédé IHSS. L'analyse élémentaire des substances humiques a montré une aromaticité importante des acides humiques et de l'humine.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bailly, G., 2005. Suivi floristique de la tourbière vivante de Frasne. Rapport interne.
- Bourdon, S., Laggoun-Défarge, F., Disnar, J.-R., Maman, O., Guillet, B., Derenne, S., Largeau, C., 2000. Organic matter sources and early diagenetic degradation in a tropical peaty marsh (Tritrivakely, Madagascar). Implications for environmental reconstruction during the Sub-Atlantic. *Organic Geochemistry* 31, 421-438.
- Bragg, O.M., 2002. Hydrology of peat-forming wetlands in Scotland. *The Science of The Total Environment* 294, 111-129.
- Breeuwer, A., Heijmans, M., Robroek, B., Berendse, F., 2008. The effect of temperature on growth and competition between *Sphagnum* species. *Oecologia* 156, 155-167.
- Broquet, P., Pigetvieux, G., Soulliat, A., 1978. Prospection géologique et géophysique de la région de Frasne-Bonnevaux (Doubs). C.U.E.R., Université de Franche-Comté, Besançon, France.
- Bruckert, S., Gaiffe, M., 1985. Les sols de Franche-Comté. Centre Universitaire d'Etudes, Université de Franche-Comté, Besançon, France.
- Calderoni, G., Schnitzer, M., 1984. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2045-2051.
- Campy, M., Richard, M., 1987. Dynamique et typologie des remplissages lacustres tardi-postglaciaires de la chaîne jurassienne. Documents du C.E.R.L.A.T. Mémoire 1, 165-180.
- Chapman, S.J., Campbell, C.D., Fraser, A.R., Puri, G., 2001. FTIR spectroscopy of peat in and bordering Scots pine woodland: Relationship with chemical and biological properties. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1193-1200.
- Chapman, S., Buttler, A., Francez, A.-J., Laggoun-Défarge, F., Vasander, H., Schloter, M., Combe, J., Grosvernier, P., Harms, H., Epron, D., Gilbert, D., Mitchell, E., 2003. Exploitation of northern peatlands and biodiversity maintenance: A conflict between economy and ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1, 525-532.
- Charman, D., 2002. Peatlands and environmental change. John Wiley and Sons, Chichester.
- Clymo, R., 1983. Peat. In: AJP Gore (Ed.) *Ecosystems of the World*'4A. Mires: Swamp, bog, fen and moor, general studies. Elsevier, Amsterdam.
- Clymo, R.S., 1984. The limits to peat bog growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 303, 605-654.

- Delarue, F., Laggoun-Défarge, F., Gogo, S., Albéric, P., Disnar, J.-R., 2011. Effects of short-term ecosystem experimental warming on water-extractable organic matter in an ombrotrophic *Sphagnum*-peatland. *Organic Geochemistry*, DOI:10.1016/j.orggeochem.2011.07.005
- Deport, C., 2002. Etude structurale des substances humiques en zones humides : Marais Poitevin, Marais de Rochefort, Marais de Gironde. Thèse de l'Université de Poitiers, France.
- Dickson, L., Bull, I.D., Gates, P.J., Evershed, R.P., 2009. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fatty acids from glycolipid and phospholipid fractions. *Journal of Microbiological Methods* 78, 249-254.
- Durraffourg, M., Palacio, P., 1981. Etude géologique, géophysique, gotechnique et hydrologique du synclinal de Bonnevaux (Doubs). Thèse de l'Université de Franche-Comté, Besançon, France.
- Fernandes, A.N., Giovanela, M., Esteves, V.I., Sierra, M.M.d.S., 2010. Elemental and spectral properties of peat and soil samples and their respective humic substances. *Journal of Molecular Structure* 971, 33-38.
- Francez, A.-J., 2000. Carbon dynamics in mires, from *Sphagnum* to greenhouse effect. La dynamique du carbone dans les tourbières à *Sphagnum*, de la sphaigne à l'effet de serre. *L'Année Biologique* 39, 205-270.
- Gorham, E., 1991. Northern peatlands: Role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecological Applications* 1, 182-195.
- Grandvoininnet, D., Bruckert, S., Campy, M., 1988. Formation et organisation d'une tourbe acide du Jura. *Science du Sol*, 26 55-64.
- Grasset, L., 1997. Etude de l'humine et des acides humiques des sols : importance de la composante lipidique. Thèse de l'Université de Poitiers, France.
- Gunnarsson, U., 2005. Global patterns of *Sphagnum* productivity. *Journal of Bryology* 27, 269-279.
- Heikkinen, J.E.P., Elsakov, V., Martikainen, P.J., 2002. Carbon dioxide and methane dynamics and annual carbon balance in tundra wetland in NE Europe, Russia. *Global Biogeochem. Cycles* 16, 1115.
- Joosten, H., Clarke, D., 2002. Wise use of peatlands. Backgrounds and principles including a framework for decision-making. International Mire Conservation Group, International Peat Society, Jyväskylä, Finland, 1-302.

- Maitre, C., 2003. Socio-economical approach for Franc peatlands. Annual report. Université de Franche-Comté, Besançon, France.
- Manneville, O., Vergne, V., Villepoux, O., 1999. Le monde des tourbières et des marais. France, Suisse, Belgique et Luxembourg. Coll. Bibliothèque du naturaliste, Delachaux & Nestlé, Lausanne-Paris.
- Martikainen, P.J., Nykänen, H., Alm, J., Silvola, J., 1995. Change in fluxes of carbon dioxide, methane and nitrous oxide due to forest drainage of mire sites of different trophy. *Plant and Soil* 168-169, 571-577.
- Payette, S., Rochefort, L., 2001. Écologie des tourbières du Québec-Labrador. Les Presses de l'Université de Laval, Saint-Nicolas.
- Reille, M., 1991. L'origine de la station de pin à crochets de la tourbière de Pinet (Aude) et de quelques stations isolées de cet arbre dans les Vosges et le Jura. *Bulletin de la Société Botanique de France* 138, 123-148.
- Rice, J.A., MacCarthy, P., 1991. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Organic Geochemistry* 17, 635-648.



**CHAPITRE III : APPLICATION DE LA  
METHODE "DERIVATIZATION FOLLOWED BY  
REDUCTIVE CLEAVAGE" (DFRC) A LA  
MATIERE ORGANIQUE DE SOLS ET DE  
SEDIMENTS**



## **I - CARACTERISATION DES LIPIDES LIBÉRÉS ET DES MONOLIGNOLS D'UNE TOURBIÈRE OMBROTROPHE ET DE SES SUBSTANCES HUMIQUES CORRESPONDANTES PAR LA MÉTHODE "DERIVATIZATION FOLLOWED BY REDUCTIVE CLEAVAGE" (DFRC)**

Cette partie, qui correspond à un article soumis dans la revue "Organic Geochemistry", a pour but d'identifier les lipides et les monolignols d'une tourbière ombrotrophe et de ses substances humiques correspondantes libérés par la méthode "Derivatization Followed by Reductive Cleavage" (DFRC).

Introduite par Lu et Ralph, la méthode DFRC est utilisée dans la chimie du bois pour l'analyse de matériaux lignocellulosiques. Elle implique deux étapes clés permettant la libération de monolignols : (i) la bromation des positions benzyliques et l'acétylation simultanée des groupes hydroxyles libres par le bromure d'acyle, et (ii) l'élimination réductrice des liaisons  $\beta$ -aryl éthers par coordination avec le zinc métallique. De plus, selon la réaction de Boord, les  $\beta$ -bromo éthers et les  $\beta$ -bromo esters peuvent être réduits par le zinc et libérer ainsi des *n*-alcènes, des *n*-alcan-1-ols et des acides alcanoïques. Des biopolymères contenant des motifs glycérol (acylglycérols, lignines, cutines, subérines, ...) peuvent donc être affectés par cette technique de dégradation chimique.

L'étude porte sur trois échantillons : la tourbe délipidifiée, les acides humiques et l'humine correspondants. La méthode DFRC permet la libération de composés organosolubles (50 %m. de la tourbe délipidifiée, 10 %m. des acides humiques et 30 %m. de l'humine). Les principaux motifs identifiés sont des acides *n*-alcanoïques, des *n*-alcan-1-ols, des  $\omega$ -hydroxy acides, des acides  $\alpha,\omega$ -dicarboxyliques, des *n*-alcènes, des *n*-alcanes et des composés aromatiques (principalement des monolignols).

Les lipides libérés lors de la méthode DFRC soulignent l'origine végétale de nos échantillons. Les acides alcanoïques et les *n*-alcan-1-ols sont des constituants majeurs des cires cuticulaires des végétaux supérieurs ou des macrophytes aquatiques tandis que les acides *n*-alcanoïques courts et les acides *iso* et *anteiso*-C<sub>15</sub> et C<sub>17</sub> sont caractéristiques d'une contribution bactérienne. Les  $\omega$ -hydroxy acides et les acides  $\alpha,\omega$ -dicarboxyliques sont des constituants des biopolyesters aliphatiques (cutines et subérines). De même, les *n*-alcènes identifiés semblent provenir de ces biopolymères. Les *n*-alcanes longs à chaîne impaire d'atomes de carbone sont considérés comme caractéristiques des lipides des cires

épicuticulaires et des couches protectrices des plantes vasculaires. Cependant, la présence de *n*-alcanes courts à chaîne paire d'atomes de carbone est inhabituelle. Bien qu'elle ait notamment été attribuée à la réduction diagenétique d'acides gras ou à la production de microorganismes (bactéries, champignons, levures, ...), les *n*-alcanes identifiés semblent ici être plutôt des produits secondaires de la réaction. Les composés aromatiques isolés (monolignols principalement) présentent majoritairement des unités ligneuses guaiacyles et sont en accord avec la présence récente de gymnospermes (*Picea abies* et *Pinus uncinata*) sur la tourbière.

Les différences qualitatives et quantitatives observées lors de l'étude des lipides libérés par la méthode DFRC sont probablement dues à la procédure d'isolation des substances humiques de la Société Internationale des Substances Humiques. En effet, il semblerait que la préparation des substances humiques permette d'atteindre de nouvelles catégories de composés hydrophobes (acides alcanoïques, *n*-alkan-1-ols,  $\omega$ -hydroxy acides, acides  $\alpha,\omega$ -dicarboxyliques ...) au détriment d'une catégorie de composés aromatiques hydrophiles (probablement des tannins et autres composés polyhydroxyphénoliques).

Les lipides polaires libérés après la méthode DFRC représentent 85 %m. des composés organosolubles pour la tourbe délipidifiée, 82 %m. pour les acides humiques et 74 %m. pour l'humine et montrent des bandes caractéristiques des liaisons ester en spectroscopie infrarouge. Leur saponification permet alors la libération de *n*-alcanes, de *n*-alkan-1-ols et de composés aromatiques (dont les monolignols). Les *n*-alkan-1-ols libérés sont caractéristiques des cires épicuticulaires des végétaux supérieurs mais peuvent également être produits par les sphaignes présentes sur la tourbière. Les composés aromatiques identifiés sont similaires à ceux obtenus par la méthode DFRC appliquée à différentes espèces de bois et résultent de la rupture de liaisons esters présentes sur la chaîne latérale des unités ligneuses ou reliant deux cycles aromatiques (positions *para*). Comme pour les composés aromatiques libérés après la méthode DFRC, ils sont majoritairement de type guaiacyle et sont donc en accord avec la présence récente de gymnospermes sur la tourbière.

Impliquant la rupture des liaisons  $\beta$ -aryl éthers et affectant les motifs glycérol présents dans les biopolymères végétaux, la méthode DFRC permet donc l'analyse des monomères ligneux et des lipides macromoléculaires d'une tourbière ombrotrophe et des substances humiques correspondantes. Une comparaison avec les méthodes classiques d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments, l'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre (II) et la thermochimioolyse en présence de TMAH, permet de confirmer la capacité de la méthode DFRC à tracer la lignine dans différents sols et sédiments.

## Characterisation of bound lipids and monolignols in an ombrotrophic peatland and its humic substances using the derivatization followed by reductive cleavage method

Céline Estournel-Pelardy, Laurent Grasset\*, André Amblès

Université de Poitiers, SRSN, UMR-CNRS 6514, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers Cedex, France

### Corresponding author:

Tel.: +33 5 49 45 37 59

Fax: +33 5 49 45 35 01

E-mail address: laurent.grasset@univ-poitiers.fr (L. Grasset)

### **Abstract**

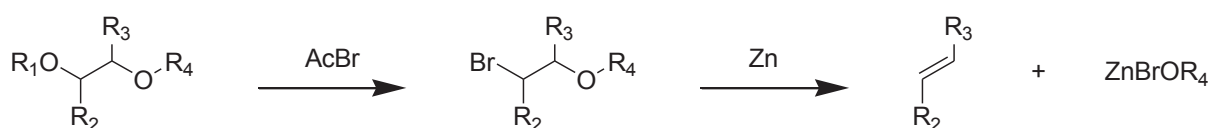
Numerous polar structures and biopolymers in soils and sediments contain glycerol moieties. The derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) method cleaves selectively these glycerol moieties. Applied to an ombrotrophic peat sample and its humic substances (humic acids and humin), it releases lipids. *n*-Alkanes, *n*-alkenes, alkanolic acids, *n*-alkan-1-ols,  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids and  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acids are mainly products of the cleavages of bio(geo)polymers (i.e. acylglycerols, cutin, suberin, etc.). It releases also aromatic compounds with mostly guaiacyl units. It is in accord with a recent gymnosperm input. A second step of alkaline hydrolysis on residual polar compounds releases *n*-alkanes, *n*-alkan-1-ols and aromatic compounds originally linked by ester bonds (with no heteroatom in the  $\beta$ -positions). Results show that the DFRC method is suitable for analysing lipid compounds linked to glycerol moieties.

### **Keywords**

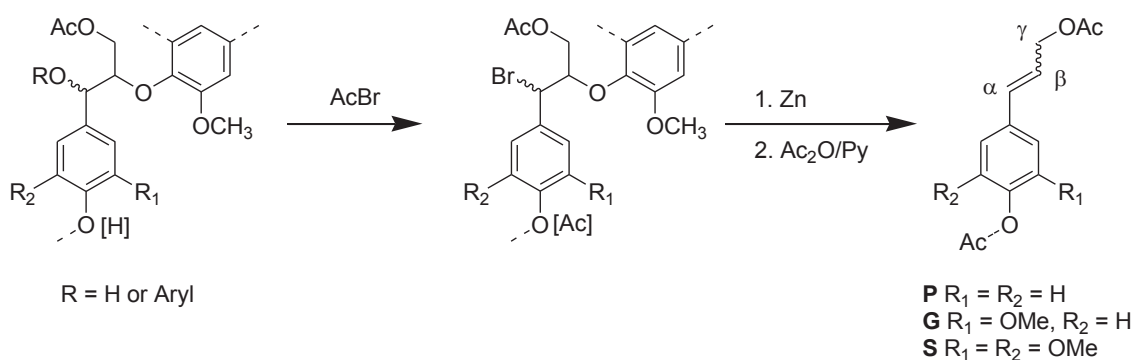
DFRC, alkaline hydrolysis, peat, humic acids, humin, lipids, monolignols

## 1. Introduction

Glycerol moieties are contained by numerous polar structures and biopolymers in soils and sediments (acylglycerols, cutin, suberin, lignin, etc.). The derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) method is an efficient method for cleaving selectively these moieties (Fig. 1).  $\alpha,\beta$ -diethers,  $\alpha,\beta$ -diesters or  $\beta$ -ether esters present in these moieties could be brominated by acetyl bromide. Then, the resulting  $\beta$ -bromo esters or  $\beta$ -bromo ethers could be cleaved by reduction with Zn according to the Boord reaction. Consequently, lipid compounds, initially linked to glycerol moieties, can be specifically released. Esters with no heteroatom in  $\beta$ -position are not cleaved by this chemical sequence. More specifically, this derivatization followed by reductive cleavage method is known as an efficient chemical degradation currently used to cleave aryl ethers in lignin (Fig. 2; Lu and Ralph, 1997a, b). It has been used for lignin characterisation for softwoods, hardwoods, and grasses (Lu and Ralph, 1998, 1999; Peng et al., 1998; Ikeda et al., 2002; Marita et al., 2003; Yamauchi and Fukushima, 2004; del Río et al., 2007, 2008), as well as soil or sediments (Grasset et al., 2010). However, to our knowledge, there is no report of the analysis of lipids with this procedure.



**Fig. 1.** Selective glycerol cleavage using DFRC method.



**Fig. 2.** Selective ether cleavages in lignin using DFRC method.

In this study, the DFRC method was applied to an ombrotrophic peat sample and its corresponding humic substances. Lipid moieties (both aliphatic and aromatic) were investigated. According to their polarity, they were divided into two groups: (i) those which could be directly analysed using gas chromatography (GC) and (ii) polar compounds. The latter accounted for a major part of the released compounds and showed the typical Fourier

transform infrared (FTIR) bands for ester bonds. These ester bonds, which have not been cleaved by the DFRC method, were submitted to alkaline hydrolysis.

The aims of this work were to characterise GC-amenable lipid compounds released with the DFRC method and the saponification of polar compounds. Their possible origins and a comparison between the results of extracted peat and those of its corresponding humic substances were also discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Acetyl bromide, dioxane, Zn dust and pyridine were from Sigma-Aldrich (St Louis, USA); acetic acid and acetic anhydride were from Acros Organics (New Jersey, USA).

### 2.2. Samples

Frasne peatland (46°49'N, 6°10'E) is an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire in the Jura Mountains (France) protected by the EU directive "Natura 2000". The sample was taken from the periphery wooded part of the peatland (covered for 50 years by *Picea abies* and *Pinus uncinata*). According to radiocarbon dating, it was  $85 \pm 25$  B.P. yr old and was submitted to Soxhlet extraction with bidistilled  $\text{CHCl}_3$  (10 x 10 h) to remove free lipids. Afterward, humic acids and humin were extracted according to the IHSS (International Humic Substances Society) procedure (Swift, 1996).

### 2.3. DFRC method

The DFRC procedure was almost identical to that reported by Lu and Ralph (1997a). Briefly, the sample (1 g) and 50 ml AcBr stock solution (acetyl bromide/acetic acid, 8:92, v/v) were gently stirred at 50 °C for 2 h. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in 50 ml of the acidic reduction solvent (dioxane/acetic acid/water, 5:4:1, v/v/v) and stirred with Zn dust (5 g) at 50 °C for 30 min. The mixture was filtered on Whatman GF/F glass microfibre filters (0.7 µm). The filtrate was quantitatively transferred to a separatory funnel with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) and a saturated solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 ml) was added. The pH of the aqueous phase was adjusted to 3 by adding HCl (6.4 M). The water phase was extracted (2 x) with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduced pressure before acetylation of the hydroxyl groups (40 minutes) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) with acetic anhydride (1.3 ml) and pyridine (1.3 ml). All volatile components were completely removed by coevaporation with EtOH under reduced pressure. Finally, after

methylation of carboxylic moieties with an excess of trimethylsilyldiazomethane in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (2:1, v/v; Hashimoto et al., 1981), the components were separated on a silica gel chromatography column (elution with petroleum ether/ $\text{Et}_2\text{O}$  with progressive increase in  $\text{Et}_2\text{O}$  from 0 to 100%, followed by successive washing with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and MeOH). Two sets of components were distinguished: GC-amenable compounds (petroleum ether/ $\text{Et}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fractions) and polar compounds (MeOH fraction). Samples, previously derivatized (hydroxyl functions were acetylated and carboxylic acids were methylated), were analysed using GC and GC-mass spectrometry (GC-MS). Mass yields were calculated according to the starting sample.

#### *2.4. Alkaline hydrolysis*

Polar lipids released via the DFRC method were saponified with 1 M KOH/MeOH (50 mg in 10 ml, 60 °C, 1 h). Saponified lipids were extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  after acidification with acetic acid (pH 4-5) and acetylated with acetic anhydride (excess) in the presence of a catalytic amount of pyridine (50 °C, 20 min) followed by stirring overnight at room temperature. The reaction was stopped with the hydrolysis of the remaining acetic anhydride by adding cold water and stirring (2 h). Acetylated compounds were extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , neutralized with a saturated solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and washed with a saturated solution of NaCl and water. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and the solvent removed under reduced pressure.

#### *2.5. Analytical techniques*

GC utilised a Hewlett-Packard 6890 instrument [split injector, 250 °C; flame ionization detector (FID), 300 °C] with a fused silica column (Supelco Equity 5%, 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and He as carrier gas (1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ). The oven temperature was programmed from 60 to 300 °C (held 15 min) at 5  $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Quantification was carried out with *n*-nonadecene as internal standard. GC-MS analysis was performed with a Trace GC instrument (Thermo Finnigan; same GC conditions as above) coupled to a Thermo Finnigan Automass spectrometer. The latter was operated in the electron ionization mode at 70eV and a quadripolar mass filter was used. Products were identified on the basis of GC retention times, mass spectra (comparison with standards) and literature data. Abundances were expressed relative to the starting peat.



### 3. Results

#### 3.1. DFRC method on the extracted peat sample

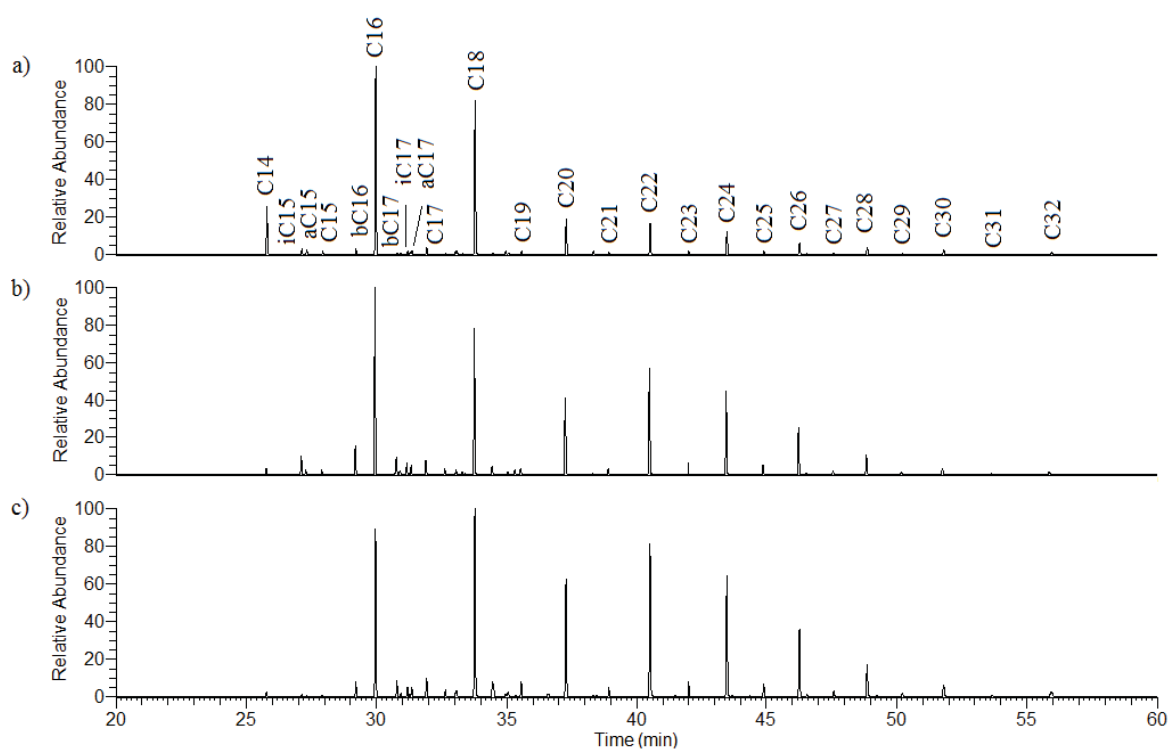
The yield of soluble DFRC products corresponded to 50% of the starting extracted peat sample and could be divided in two classes: GC-amenable compounds and polar compounds (Table 1). The first contained aliphatic compounds and included: (i) alkanolic acids (Fig. 3) from C<sub>14</sub> to C<sub>32</sub>, with an even/odd predominance and with C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> as major components (the branched *iso* and *anteiso*-C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> alkanolic acids were also detected), (ii) *n*-alkan-1-ols from C<sub>16</sub> to C<sub>30</sub> with C<sub>18</sub>, C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub> as major components (Fig. 4), (iii)  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids from C<sub>20</sub> to C<sub>24</sub> (Fig. 5), (iv) the C<sub>22</sub>  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acid, (v) *n*-alkenes ranging from C<sub>16</sub> to C<sub>34</sub>, with an even predominance (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub> major; Fig. 6), (vi) *n*-alkanes with two distinct modes, the first from C<sub>16</sub> to C<sub>34</sub>, with a strong even predominance (C<sub>20</sub> and C<sub>24</sub> major) and the second from C<sub>21</sub> to C<sub>34</sub> with no obvious carbon number predominance (Fig. 7). It contained also aromatic compounds comprising monolignols G<sub>t</sub> (*trans* coniferyl diacetate) and S<sub>t</sub> (*trans* sinapyl diacetate), propiophenone (G''-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) and vanillic acid (detected as the methyl ester: G''-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) (Table 3).

	Extracted peat	Humic acids (42.8% of extracted peat)	Humin (29.0% of extracted peat)
DFRC yields (w.%)	50.0	10.0	30.0
GC-amenable (w.%)	15.4	18.4	26.4
Polar (w.%)	84.6	81.6	73.6

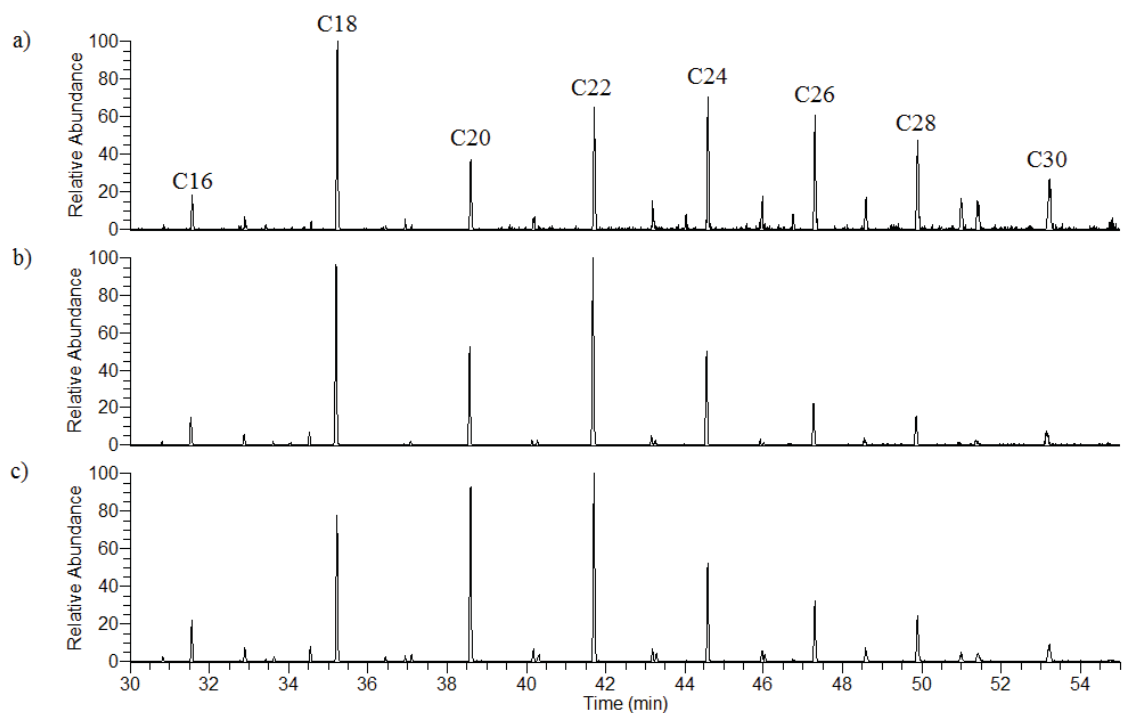
**Table 1.** Yields and repartition of organosoluble compounds released via DFRC method from extracted peat, humic acids and humin.

GC-amenable compounds	Abundance (nmol/g peat)		
	Extracted peat	Humic acids	Humin
<i>n</i> -Alkenes	198.3	278.1	19.8
<i>n</i> -Alkanes	130.2	91.4	24.4
Alkanoic acids	349.6	311.5	94.9
<i>n</i> -Alkan-1-ols	32.8	58.3	49.8
$\omega$ -Hydroxy alkanoic acids	26.5	164.5	94.8
$\alpha,\omega$ -Alkanedioic acids	5.9	66.2	4.0
Aromatic compounds	1167.2	1.6	72.1

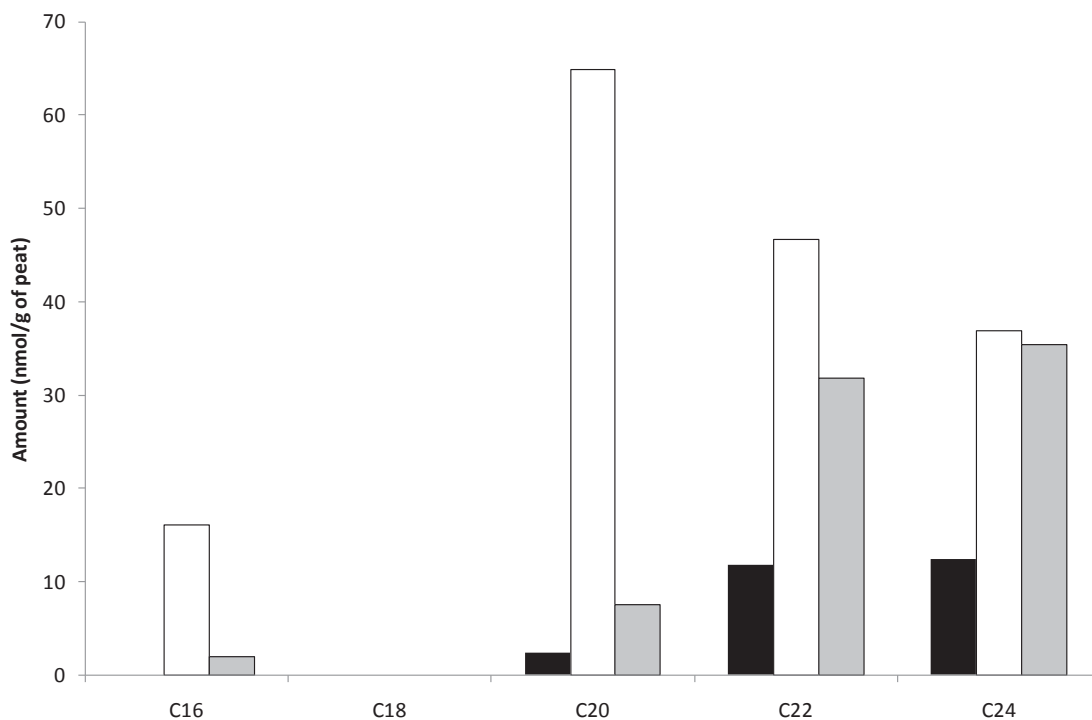
**Table 2.** GC-amenable compounds released via DFRC method from extracted peat, humic acids and humin.



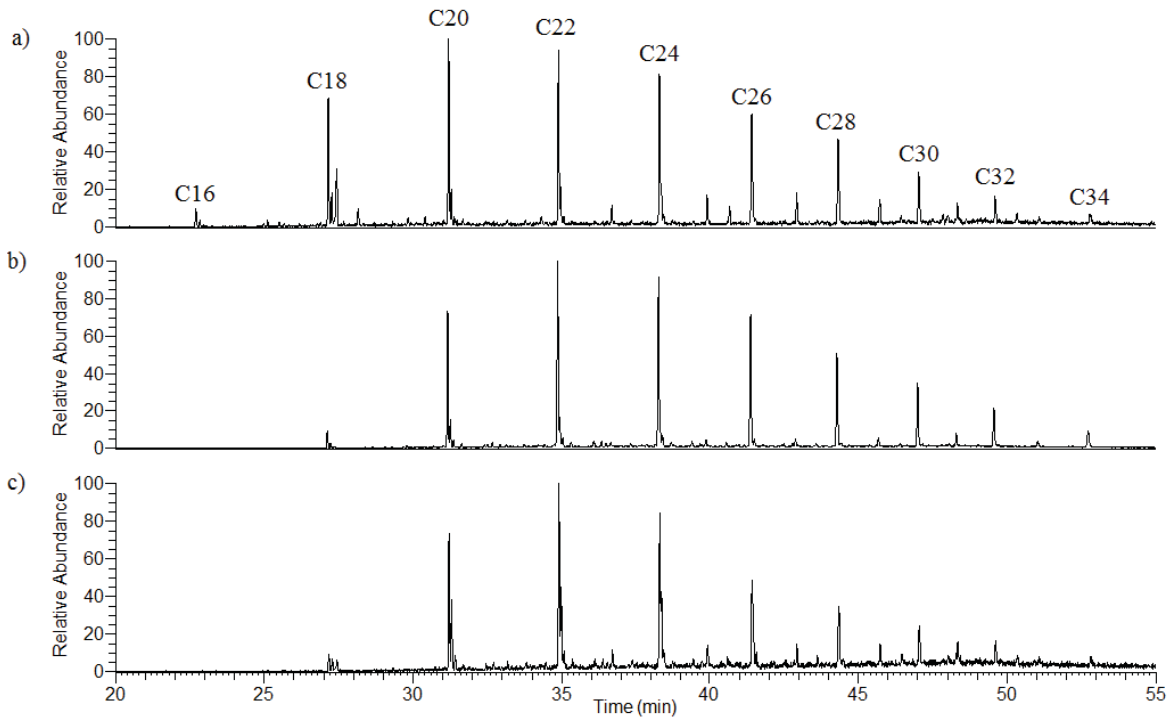
**Fig. 3.** Extracted  $m/z$  74 chromatograms of alkanolic acids (identified as methyl esters) released via DFRC method from (a) extracted peat, (b) humic acids and (c) humin.



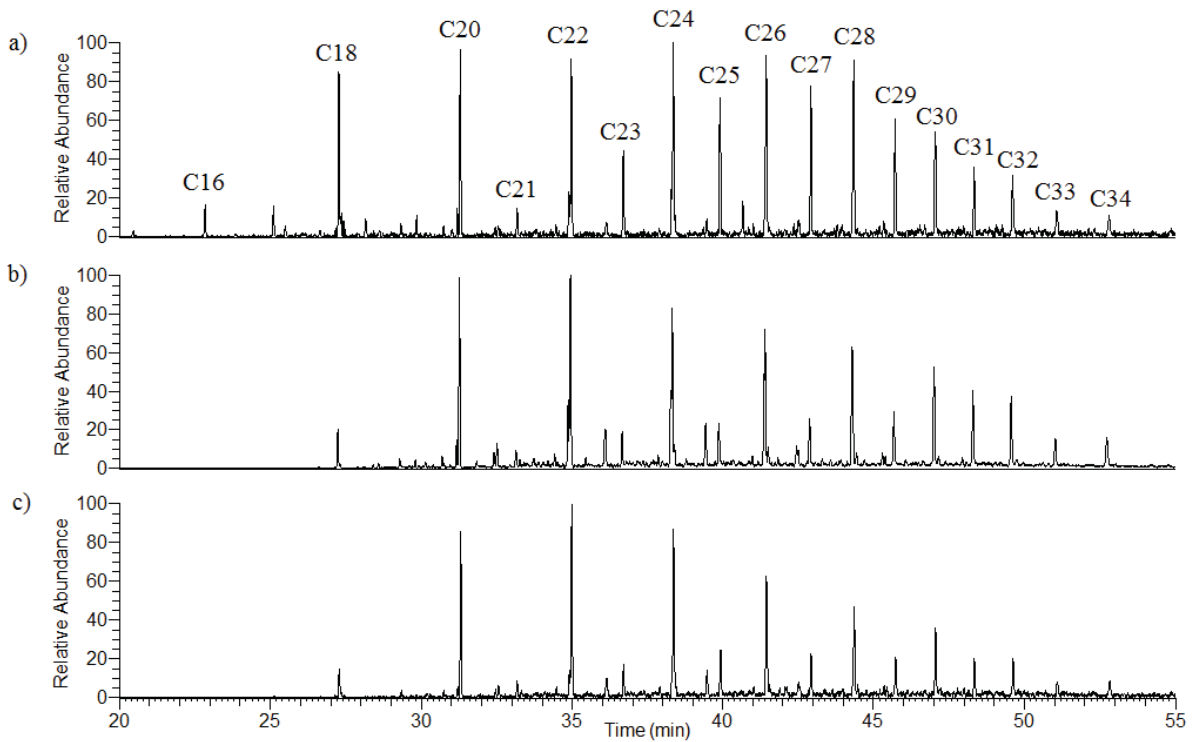
**Fig. 4.** Extracted  $m/z$  61 chromatograms of  $n$ -alkan-1-ols (identified as acetates) released via DFRC method from (a) extracted peat, (b) humic acids and (c) humin.



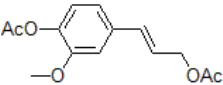
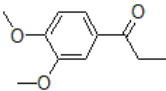
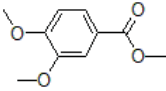
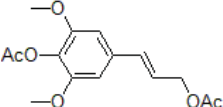
**Fig. 5.**  $\omega$ -Hydroxy alkanic acids (identified as methyl esters in extracted  $m/z$  98 chromatograms) released via DFRC method from extracted peat (■), humic acids (□) and humin (▒).



**Fig. 6.** Extracted  $m/z$  55 chromatograms of *n*-alkenes released via DFRC method from (a) extracted peat, (b) humic acids and (c) humin.



**Fig. 7.** Extracted  $m/z$  57 chromatograms of *n*-alkanes released via DFRC method from (a) extracted peat, (b) humic acids and (c) humin.

	Structure	Abundance (nmol/g peat)		
		Extracted peat	Humic acids	Humin
G <sub>t</sub> ( <i>trans</i> coniferyl diacetate)		486.3	-	67.5
G''-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> [1-(3,4-dimethoxyphenyl)-propan-1-one]		< 0.1	1.6	-
G''-CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (methyl 3,4-dimethoxybenzoate)		567.4	< 0.1	-
S <sub>t</sub> ( <i>trans</i> sinapyl diacetate)		113.6	-	4.6

**Table 3.** Aromatic compounds released via DFRC method from extracted peat, humic acids and humin.

### 3.2. DFRC method on humic acids and humin

The products released from humic acids and humin accounted for ca. 10% and 30%, respectively. They were similar to those obtained from extracted peat, with slight quantitative variation. The GC-amenable compounds comprised (Table 2 for quantification): (i) alkanolic acids from C<sub>14</sub> to C<sub>32</sub>, with an even predominance, with C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> as major components (the branched *iso* and *anteiso*-C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> alkanolic acids were also detected) and C<sub>20</sub>-C<sub>32</sub> members with a higher relative abundance than for the extracted sample in both cases (Fig. 3), (ii) *n*-alkan-1-ols from C<sub>16</sub> to C<sub>30</sub> (C<sub>18</sub> and C<sub>22</sub> major) with a lower relative abundance of C<sub>20</sub>-C<sub>30</sub> members than for the extracted peat (Fig. 4), (iii)  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids comprising the C<sub>16</sub>, C<sub>20</sub> (the major component for humic acids), C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub> (the major components for humin) members (Fig. 5), (iv) C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acid components for humin and from C<sub>16</sub> to C<sub>24</sub> (C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub> major) for humic acids, (v) *n*-alkenes from C<sub>18</sub> to C<sub>34</sub>, with an even predominance (C<sub>22</sub> major; Fig. 6), (vi) *n*-alkanes with one series of even components from C<sub>18</sub> to C<sub>34</sub> (C<sub>22</sub> major) and a second of odd carbon numbered components from C<sub>21</sub> to C<sub>33</sub> with a lower relative abundance than for the extracted peat (Fig. 7). Aromatic compounds included monolignols G<sub>t</sub> (*trans* coniferyl diacetate) and S<sub>t</sub> (*trans* sinapyl diacetate) released from humin only, propiophenone (G''-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) and vanillic

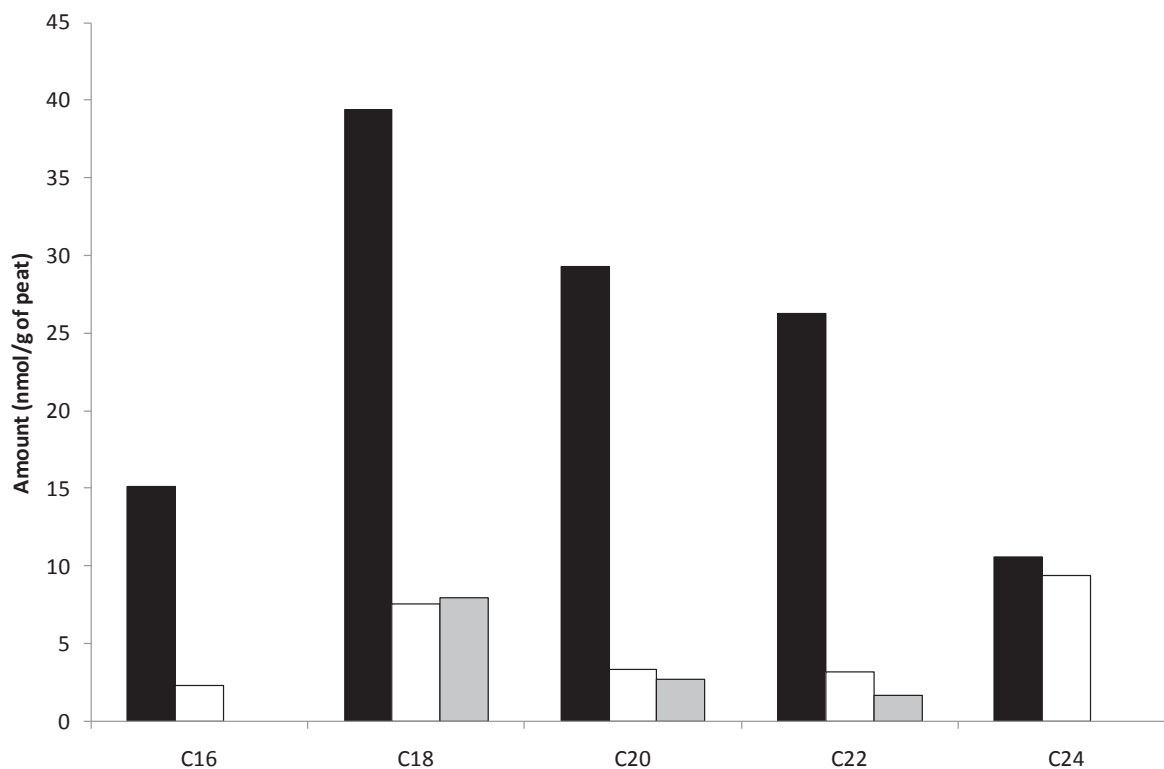
acid (detected as the methyl ester: G''-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) released from the humic acids only (Table 3).

### 3.3. Alkaline hydrolysis of polar lipids obtained after DFRC

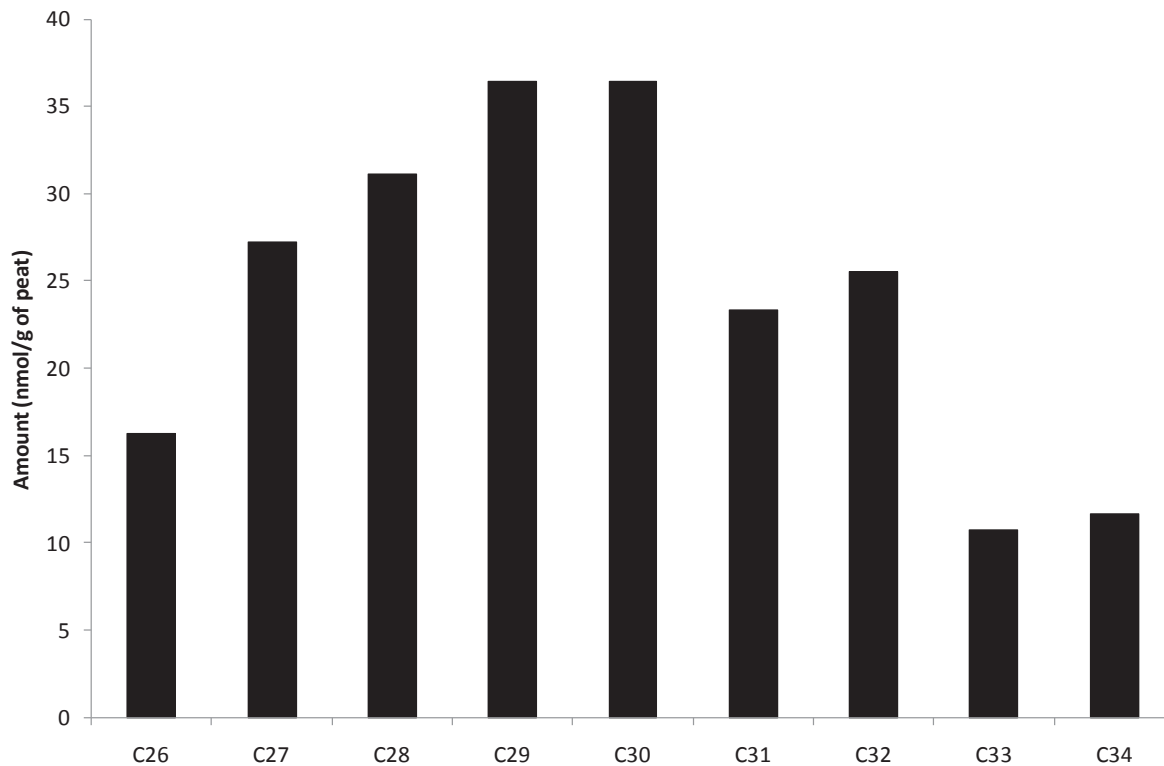
Polar lipids (84.6% of soluble compounds from extracted peat, 81.6% for humic acids and 73.6% for humin) (Table 1) showed typical ester bands in FTIR spectroscopy (1745 cm<sup>-1</sup>, C=O stretch; 1372, 1232 and 1047 cm<sup>-1</sup>, C-O stretch; data not shown). These ester bonds had not been cleaved by the DFRC method. Indeed, application of this procedure to the behenyl stearate showed that ester bonds (with no heteroatom in the β-positions) were not cleaved (data not shown). Thus, they were saponified, giving *n*-alkanes, *n*-alkan-1-ols and aromatic compounds (Table 4 for quantification of each compound class). The *n*-alkan-1-ols ranged from C<sub>16</sub> to C<sub>24</sub> (maximum at C<sub>18</sub>) and were even numbered (Fig. 8). The *n*-alkanes were only detected after the hydrolysis of the polar lipids from the extracted peat sample. Ranging from C<sub>26</sub> to C<sub>34</sub> (maximum C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub>), they did not show any even predominance (Fig. 9). Aromatic compounds released are listed in Table 5. For the extracted peat, they were mostly of the guaiacyl type (G). Coumaryl (P) type compounds were absent from the humic acid degradation products and syringyl (S) from the humin products.

	Abundance (nmol/g peat)		
	Extracted peat	Humic acids	Humin
<i>n</i> -Alkanes	218.7	-	-
<i>n</i> -Alkan-1-ols	120.6	25.7	12.2
Aromatic compounds	330.0	9.9	37.7

**Table 4.** Distribution of compounds released via alkaline hydrolysis of DFRC-released polar lipids from extracted peat, humic acids and humin.



**Fig. 8.** Aliphatic alcohols released via alkaline hydrolysis of DFRC-released polar lipids from extracted peat (■), humic acids (□) and humin (■).



**Fig. 9.** *n*-Alkanes released via alkaline hydrolysis of DFRC-released polar lipids from extracted peat.

	Structure	Abundance (nmol/g peat)		
		Extracted peat	Humic acids	Humin
G <sub>1</sub> ( <i>trans</i> coniferyl diacetate)		28.0	0.4	6.6
G <sup>2</sup> -CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (acetate of vanillic acid, methyl ester)		99.8	6.6	10.5
G <sup>2</sup> -CHO (vanillin acetate)		24.5	-	5.1
G <sup>2</sup> -CO-CH <sub>3</sub> (acetate of acetovanillone)		4.2	-	0.9
G <sup>2</sup> -CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (2-methoxy-4-propionylphenyl acetate)		41.5	-	4.6
G <sup>2</sup> -CH=CH-CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (acetate of coniferic acid, methyl ester)		51.6	-	3.1
G <sup>2'</sup> -CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-one)		3.8	-	-
G <sup>2'</sup> -CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (methyl 3,4-dimethoxybenzoate)		13.5	0.8	-
S <sub>1</sub> ( <i>trans</i> sinapyl diacetate)		5.0	< 0.1	0.7
S <sup>2</sup> -CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (2,6-dimethoxy-4-propionylphenyl acetate)		11.6	-	-
S <sup>2'</sup> -CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>3</sub> (1,2,3-trimethoxy-5-(methoxymethyl)benzene)		20.7	2.1	1.4
P <sup>2</sup> -CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (acetate of <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, methyl ester)		15.4	-	3.7
P <sup>2</sup> -CH=CH-CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (acetate of coumaric acid, methyl ester)		12.5	-	1.2
P <sup>2'</sup> -CO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> (methyl 3-(4-methoxyphenyl)propanoate)		13.6	-	-
S/G		0.14	0.27	0.07
P/G		0.16	0.00	0.16

**Table 5.** Aromatic compounds released via alkaline hydrolysis of DFRC-released polar lipids from extracted peat, humic acids and humin.



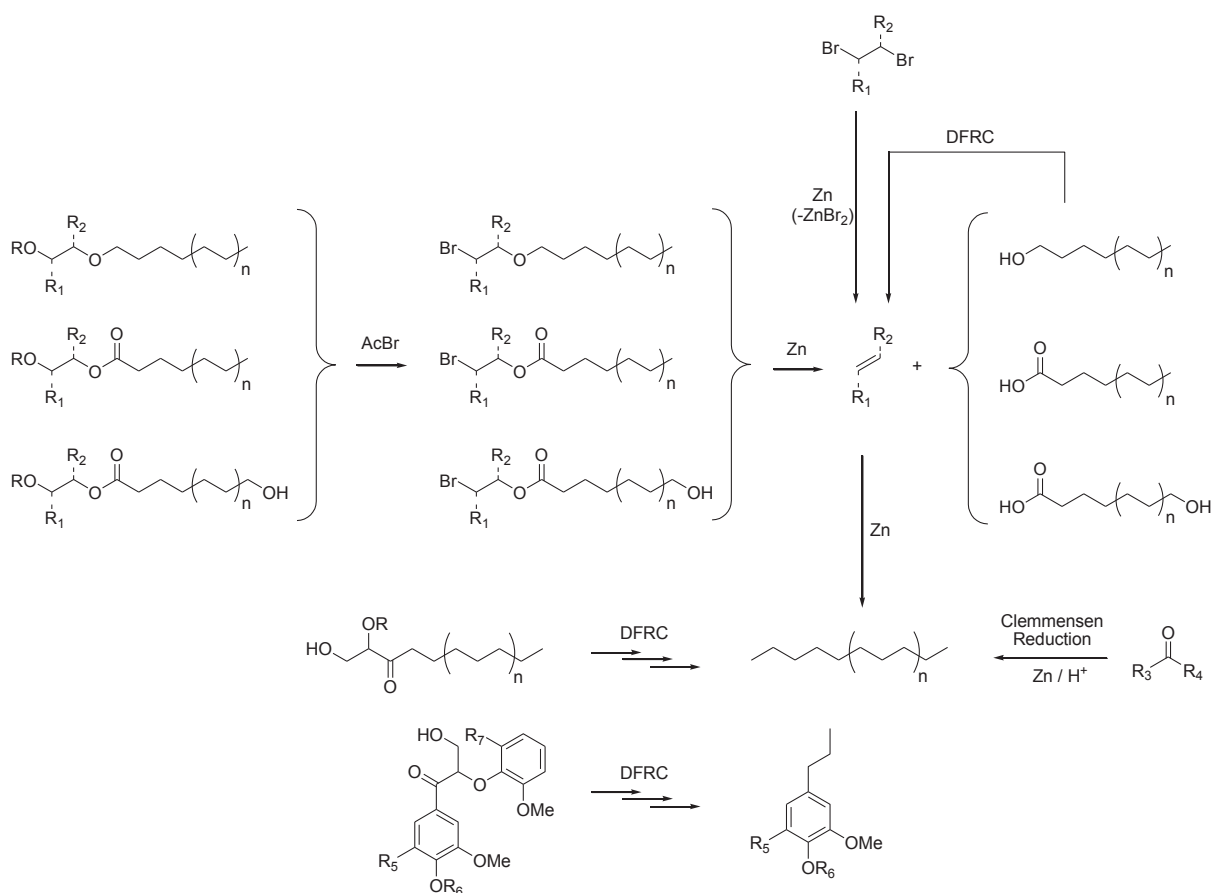
## 4. Discussion

### 4.1. DFRC mechanisms

As shown in Fig. 2, the DFRC degradation method requires two key steps: (i) bromination of the benzylic position and simultaneous acetylation of free hydroxyl groups by acetyl bromide, and (ii) reductive cleavage of the  $\beta$ -aryl ether bonds via Zn metal coordination. The final acetylation is used to acetylate free phenolic groups produced following the reduction step and reduces the number of compounds to be quantitated.

According to Boord reaction,  $\beta$ -bromo ethers and  $\beta$ -bromo esters can be reduced with Zn dust (Lu and Ralph, 1997b). This could explain the release of *n*-alkan-1-ols, alkanolic acids and  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids (Fig. 10). Such  $\beta$ -bromo ethers and  $\beta$ -bromo esters could arise from the bromination of  $\alpha,\beta$ -diethers and  $\beta$ -ether esters present in biopolymers containing glycerol moieties, such as acylglycerols, cutin or suberin. Moreover, the Boord reaction could release unsaturated compounds, which could be *n*-alkenes if the R-groups were alkyl groups (Fig. 10). These *n*-alkenes could arise from Zn dehalogenation of vicinal dihalogenated compounds. They could also be the result of the reduction of *n*-alkan-1-ols during DFRC. However, the distributions are different from those of the *n*-alkan-1-ols (Fig. 4 and Fig. 6) what could disprove the latter hypothesis. *n*-Alkanes could be produced by an additional reduction of *n*-alkenes or via Clemmensen reduction of ketones (Fig. 10). Furthermore, application of the DFRC method to lignin model compounds possessing an  $\alpha$ -carbonyl group showed that some compounds substituted with alkyl chains were obtained in small amounts (Lu and Ralph, 1997b). The mechanism of their formation is unknown but, in our case, this reaction could explain the release of *n*-alkanes (Fig. 10).

Monolignols  $G_t$  (*trans* coniferyl diacetate) and  $S_t$  (*trans* sinapyl diacetate) were the result of the  $\beta$ -ether cleavage (Fig. 2). Propiophenone ( $G''$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) and vanillic acid (detected as the methyl ester:  $G''$ -CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) did not arise from  $\beta$ -ether cleavage. Propiophenone could result from cleavage of  $\beta$ -O-4 ether compounds possessing an  $\alpha$ -carbonyl group (Lu and Ralph, 1997b). Even though vanillic acid is usually found in the CuO oxidation products of lignin (Hedges and Ertel, 1982), there is no clear mechanism to explain its formation with DFRC.



**Fig. 10.** Suggested mechanisms for release of lipid compounds via DFRC method.

## 4.2. Origin of compounds

### 4.2.1. Compounds obtained after DFRC

Long chain ( $> C_{20}$ ) *n*-alkanoic acids and *n*-alkan-1-ols are major components in higher plant cuticular waxes (Eglinton and Hamilton, 1967; Tulloch, 1976; Tulloch, 1984). They could also arise from submerged and emergent aquatic macrophytes with typical distributions showing a maximum at C<sub>22</sub> or C<sub>24</sub> and C<sub>28</sub> or C<sub>30</sub> respectively (Ficken et al., 2000). *n*-Alkanoic acids could also be the result of degradation of acylglycerols. Indeed, the short chain *n*-alkanoic acids and the *iso*- and *anteiso*-C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> acids (signature of a Gram positive bacteria contribution; Zelles, 1999) could be originally parts of short chained acylglycerols such as glycolipids, phospholipids or diglycerides resulting of the natural degradation of these.  $\alpha,\omega$ -Alkanedioic acids and  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids are unambiguous building blocks of the aliphatic bio-polyesters cutin and suberin (Kolattukudy, 1980a, 1980b; Nierop and Verstraten, 2003; Nierop et al., 2005a).

The origin of the *n*-alkenes released is unclear. However, according to the above mechanisms (Fig. 10), such compounds could be viewed as by-products of the DFRC method applied to aliphatic biopolymers containing glycerol moieties.

Odd numbered long chain *n*-alkanes are considered typical lipids of epicuticular waxes and protective layers on vascular plants (Eglinton and Hamilton, 1967; Kolattukudy, 1980b). Such compounds could be trapped in the macromolecular network and released (Grasset and Amblès, 1998). On the other hand, the distribution of the short chain *n*-alkanes, almost entirely even numbered, is more surprising. Low amounts of short chain *n*-alkanes have been described in the leaf lipids from some higher plants such as *Pinus* and *Eucalyptus* (Herbin and Robins, 1969; Nguyen Tu et al., 2000) and in some woods and grasses (Kuhn et al., 2010). Sources of even *n*-alkanes have also been attributed to diagenetic reduction of alkanolic acids or other lipid compounds (Welte and Ebhardt, 1968) or to an input from some specific bacteria or fungi (Davis, 1968; Jones, 1969; Grimalt et al., 1985, 1986; Ekpo et al., 2005). However, in our case, the even *n*-alkanes seem to be secondary reaction products of DFRC on polyester polymers (such as cutin and suberin) rather than intact trapped compounds released after degradation of the organic network, although we have no clear evidence for this.

Aromatic compounds released via DFRC method were similar to those identified in humic acids of a lignite (low rank coal) from the Czech Republic (Grasset et al., 2010). Monolignols G<sub>t</sub> (*trans* coniferyl diacetate) and S<sub>t</sub> (*trans* sinapyl diacetate) are the result of the β-ether cleavage of lignin units (Lu and Ralph, 1997b). Major G<sub>t</sub> units are the result of the recent gymnosperm input to the peatland. Vanillic acid (detected as the methyl ester, G''-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) could arise from *in situ* lignin degradation. It could also come from the aromatic domain of suberin (Bernards and Lewis, 1998; Allard and Derenne, 2009) or from condensed tannins (Garnier et al., 2003; Nierop et al., 2005b). Low amounts of the former compounds could be explained by way of physical protection from DFRC attack on the recently incorporated lignin. If wood degradation was not sufficient (i.e. if the primary cell was not degraded), the lignin would be inaccessible to DFRC. Indeed, Donaldson (2001) showed that most of the lignin of gymnosperm wood (such as *Picea Abies* and *Pinus Uncinata* in our case) is located in the secondary cell wall.

We also compared the results obtained from extracted peat with those from its humic substances (humic acids and humin). Considering the yields of degradation products, the humic fractions appear to be less reactive than the extracted peat. However, the amounts of alkanolic acids, *n*-alkan-1-ols, ω-hydroxy alkanolic acids, α,ω-alkanedioic acids and *n*-alkenes released from the extracted peat after DFRC were less important than the sum of those from

the humic substances (Table 2). Alkanoic acids released from both humic acids and humin showed similar distributions with a relatively more important presence of C<sub>20</sub>-C<sub>32</sub> members than that from the extracted peat sample (Fig. 3). For *n*-alkan-1-ols, the distribution pattern differs slightly. For the extracted peat sample, the C<sub>18</sub> member was predominant and associated with an unimodal distribution of *n*-alkan-1-ols from C<sub>20</sub> to C<sub>30</sub> with a maximum at C<sub>24</sub>. The distributions of *n*-alkan-1-ols from the humic substances were almost similar and showed C<sub>18</sub> and C<sub>22</sub> *n*-alkan-1-ols as predominant members (Fig. 4). Moreover, their C<sub>20</sub>-C<sub>30</sub> members were relatively less abundant than for the extracted peat sample. The distributions of  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids and  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acids varied according to the sample. The C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub>  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids were predominant for the humin while the C<sub>20</sub> member was the maximum for the humic acids (Fig. 5). C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub>  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acids were identified for humin while only C<sub>22</sub> member was observed for the extracted peat sample. Finally, for the *n*-alkenes, the shortest chain members (C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub>) from the extracted peat sample were almost absent from the humic fractions (Fig. 6). All these quantitative and qualitative differences could arise from the IHSS procedure for the isolation of humic substances. Indeed, the humic fraction preparation seems to change the macromolecular structure and consequently increased reactant accessibility. Thus, new pools of lipidic compounds could be revealed.

Contrary to the above lipid compounds, the amounts of *n*-alkanes and aromatic compounds released from the extracted peat were higher than those released from the humic fractions (Table 2). In this case, the isolation procedure for humic substances could lead to loss of a pool of non-ligneous aromatic compounds (i.e. tannins and other polyhydroxyphenolic compounds). On the other hand, such compounds could also be present in fulvic acids, which were not studied. The extracted peat exhibited a notable contribution of odd long chain *n*-alkanes with a maximum at C<sub>27</sub>, whereas these long chain *n*-alkanes showed a lower relative abundance for the humin and humic acid fractions. Some odd long chain *n*-alkanes, typical of epicuticular waxes, and some parent macromolecular lipids affording the shortest even *n*-alkane members after DFRC could have been lost or could become unreactive to DFRC during the preparation of humic fractions (Fig. 7). The distributions of aromatic compounds varied according to the sample. Monolignols G<sub>t</sub> and S<sub>t</sub> were predominant for extracted peat and humin, whereas they were not detected for the humic acids. The contrast between (i) peat and humin and (ii) humic acids might suggest that the formers contain non altered lignin but not the latter. It illustrates the classical organic geochemistry concepts: (i)

the part played by un- or little altered lignin in humin constitution and (ii) the formation of humic acids by lignin alteration.

#### 4.2.2. Compounds obtained after alkaline hydrolysis of polar lipids from DFRC

Long chain even *n*-alkan-1-ols obtained after alkaline hydrolysis are considered as typical components of the epicuticular waxes of higher plants with maxima generally at C<sub>22</sub> and/or C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub> (Eglinton and Hamilton, 1967; Kolattukudy, 1980a). *n*-Alkan-1-ols distributions with *n*-C<sub>24</sub> and *n*-C<sub>26</sub> members as the dominant homologues were also identified as products from *sphagnum* species (Lehtonen and Ketola, 1993; Ficken et al., 1998; Baas et al., 2000), the main original vegetation of the studied peatland. In our case, even *n*-alkan-1-ols were ranged from C<sub>16</sub> to C<sub>24</sub> with a maximum at C<sub>18</sub> (Fig. 8). They should have been released by way of the cleavage of ester bonds, but carboxylic moieties were not observed in the saponification products. These carboxylic moieties could be present in the residual polar lipids obtained after alkaline hydrolysis (not quantified). Part of these carboxylic moieties, highly hydrophilic, could also remain in the aqueous phase during the saponification work up.

The *n*-alkanes, ranging from C<sub>26</sub> to C<sub>34</sub> (maxima for C<sub>29</sub> and C<sub>30</sub>), did not show any odd or even predominance (Fig. 9). They were obtained in relatively higher quantity and with a different pattern from those obtained after DFRC. Moreover, they were only obtained for the extracted peat sample. We have no clear explanations for these results. However, they could be trapped in the organic matter network and only released after alkaline hydrolysis.

Most of the aromatic units identified after alkaline hydrolysis of polar lipids obtained after DFRC are identical to those found by Lu and Ralph (1997b) after DFRC on wood species (Table 5). These units were initially partly linked by one (or more) ester bond(s) which was (were) resistant to DFRC. Such ester bonds could be located on the side chain of ligneous units or between two aromatic rings (linking the two *para* positions). Consequently, monolignols G<sub>t</sub> and S<sub>t</sub> were identified in substantial amounts with vanillin (G'-CHO), acetovanillone (G'-CO-CH<sub>3</sub>) and propiophenones (G'-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, G''-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> and S'-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). Coumaric and coniferic acids (detected as methyl esters: P'-CH=CH-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> and G'-CH=CH-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) could be released by the cleavage of  $\gamma$ -ester bonds. They are naturally present in several woody and non-woody plants and could also arise from diagenetically modified lignin. In the same way, vanillic and *p*-hydroxybenzoic acids (detected as methyl esters: G'-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, G''-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, P'-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> and P''-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) could be initially linked by ester bonds to the polar lipids. Such compounds could originate from the aromatic domain of suberin (Bernards and Lewis, 1998; Allard and Derenne, 2009). These

results, showing a predominance of guaiacyl units, enhanced the input of woody organic matter into the peat.

## 5. Conclusion

The DFRC method cleaves selectively glycerol moieties. Applied to an ombrotrophic peat sample and its humic substances (humic acids and humin), it releases lipid compounds. *n*-Alkanes, *n*-alkenes, alkanolic acids, *n*-alkan-1-ols,  $\omega$ -hydroxy alkanolic acids,  $\alpha,\omega$ -alkanedioic acids are mainly products of the cleavages of bio(geo)polymers (such as acylglycerols, cutin, suberin, etc.). It releases also lignin units. A second step of alkaline hydrolysis on residual polar compounds releases *n*-alkanes, *n*-alkan-1-ols and aromatic compounds originally linked by ester bonds (with no heteroatom in the  $\beta$ -positions).

More specifically, lignin monomers are clearly identified using the DFRC method. A comparison with methods commonly used for lignin analysis in soil and sediment, e.g. CuO oxidation and thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide, is under progress.

## Acknowledgements

This study was part of the ANR PEATWARM project: Impacts du réchauffement climatique sur le fonctionnement des tourbières en domaine tempéré (<http://peatwarm.cnrs-orleans.fr/>).

## References

- Allard, B., Derenne, S., 2009. Microwave assisted extraction and hydrolysis: An alternative to pyrolysis for the analysis of recalcitrant organic matter? Application to a forest soil (Landes de Gascogne, France). *Organic Geochemistry* 40, 1005-1017.
- Baas, M., Pancost, R., van Geel, B., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. A comparative study of lipids in Sphagnum species. *Organic Geochemistry* 31, 535-541.
- Bernards, M.A., Lewis, N.G., 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: A changing paradigm. *Phytochemistry* 47, 915-933.
- Davis, J.B., 1968. Paraffinic hydrocarbons in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Chemical Geology* 3, 155-160.
- del Río, J.C., Martínez, Á.T., Gutiérrez, A., 2007. Presence of 5-hydroxyguaiacyl units as native lignin constituents in plants as seen by Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 79, 33-38.

- del Río, J.C., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Santos, J.I., Jiménez-Barbero, J., Zhang, L., Martínez, Á.T., 2008. Highly acylated (acetylated and/or *p*-coumaroylated) native lignins from diverse herbaceous plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9525-9534.
- Donaldson, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859-873.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf Epicuticular Waxes. *Science* 156, 1322-1335.
- Ekpo, B.O., Oyo-Ita, O.E., Wehner, H., 2005. Even-*n*-alkane/alkene predominances in surface sediments from the Calabar River, SE Niger Delta, Nigeria. *Naturwissenschaften* 92, 341-346.
- Ficken, K.J., Barber, K.E., Eglinton, G., 1998. Lipid biomarker,  $\delta^{13}\text{C}$  and plant macrofossil stratigraphy of a Scottish montane peat bog over the last two millennia. *Organic Geochemistry* 28, 217-237.
- Ficken, K.J., Li, B., Swain, D.L., Eglinton, G., 2000. An *n*-alkane proxy for the sedimentary input of submerged/floating freshwater aquatic macrophytes. *Organic Geochemistry* 31, 745-749.
- Garnier, N., Richardin, P., Cheynier, V., Regert, M., 2003. Characterization of thermally assisted hydrolysis and methylation products of polyphenols from modern and archaeological vine derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 493, 137-157.
- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *Organic Geochemistry* 29, 881-891.
- Grasset, L., Vlcková, Z., Kucerík, J., Amblès, A., 2010. Characterization of lignin monomers in low rank coal humic acids using the derivatization/reductive cleavage method. *Organic Geochemistry* 41, 905-909.
- Grimalt, J., Albaigés, J., Al-Saad, H.T., Douabul, A.A.Z., 1985. *n*-Alkane distributions in surface sediments from the Arabian Gulf. *Naturwissenschaften* 72, 35-37.
- Grimalt, J., Albaigés, J., Alexander, G., Hazai, I., 1986. Predominance of even carbon-numbered *n*-alkanes in coal seam samples of Nograd Basin (Hungary). *Naturwissenschaften* 73, 729-731.
- Hashimoto, N., Aoyama, T., Shioiri, T., 1981. New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29, 1475-1478.

- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54, 174-178.
- Herbin, G.A., Robins, P.A., 1969. Patterns of variation and development in leaf wax alkanes. *Phytochemistry* 8, 1985-1998.
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J.F., Chang, H.-M., Jameel, H., 2002. Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 129-135.
- Jones, J.G., 1969. Studies on lipids of soil micro-organisms with particular reference to hydrocarbons. *Journal of General Microbiology* 59, 145-152.
- Kolattukudy, P.E., 1980a. Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.
- Kolattukudy, P.E., 1980b. Cutin, suberin and waxes. In: Stumpf, P.K. (Ed.). *The Biochemistry of Plant Lipids Structure and Function*. Academic Press, New York, pp. 571-645.
- Kuhn, T.K., Krull, E.S., Bowater, A., Grice, K., Gleixner, G., 2010. The occurrence of short chain *n*-alkanes with an even over odd predominance in higher plants and soils. *Organic Geochemistry* 41, 88-95.
- Lehtonen, K., Ketola, M., 1993. Solvent-extractable lipids of *Sphagnum*, *Carex*, *Bryales* and *Carex-Bryales* peats: content and compositional features vs peat humification. *Organic Geochemistry* 20, 363-380.
- Lu, F., Ralph, J., 1997a. Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2590-2592.
- Lu, F., Ralph, J., 1997b. DFRC method for lignin analysis. 1. New method for  $\beta$ -aryl ether cleavage: lignin model studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4655-4660.
- Lu, F., Ralph, J., 1998. The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 547-552.
- Lu, F., Ralph, J., 1999. Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1988-1992.
- Marita, J.M., Ralph, J., Hatfield, R.D., Guo, D., Chen, F., Dixon, R.A., 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 62, 53-65.



- Nguyen Tu, T.T., Derenne, S., Largeau, C., Mariotti, A., Bocherens, H., Pons, D., 2000. Effects of fungal infection on lipid extract composition of higher plant remains: comparison of shoots of a Cenomanian conifer, uninfected and infected by extinct fungi. *Organic Geochemistry* 31, 1743-1754.
- Nierop, K.G.J., Verstraten, J.M., 2003. Organic matter formation in sandy subsurface horizons of Dutch coastal dunes in relation to soil acidification. *Organic Geochemistry* 34, 499-513.
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F., 2005a. Origin, occurrence and fate of extractable lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry* 36, 555-566.
- Nierop, K.G.J., Preston, C.M., Kaal, J., 2005b. Thermally assisted hydrolysis and methylation of purified tannins from plants. *Analytical Chemistry* 77, 5604-5614.
- Peng, J., Lu, F., Ralph, J., 1998. The DFRC method for lignin analysis. 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded loblolly pine wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 553-560.
- Swift, R.S., 1996. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 1011-1069.
- Tulloch, A., 1976. Chemistry of waxes of higher plants. In: Kolattukudy, P.E. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 235-287.
- Tulloch, A.P., 1984. Epicuticular waxes of four eragrostoid grasses. *Phytochemistry* 23, 1619-1623.
- Welte, D.H., Ehardt, G., 1968. Distribution of long chain *n*-paraffins and *n*-fatty acids in sediments from the Persian Gulf. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 32, 465-466.
- Yamauchi, K., Fukushima, K., 2004. The regulation from guaiacyl to syringyl lignin in the differentiating xylem of *Robinia pseudoacacia*. *Comptes Rendus Biologies* 327, 791-797.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.

## II - COMPARAISON DES LIPIDES SIMPLES ET DES LIPIDES LIES LIBERES PAR LA METHODE DFRC

### II. 1 - Fractionnement des lipides libres de la tourbière de Frasne

Les lipides libres de la tourbe lyophilisée ont été extraits au Soxhlet avec du dichlorométhane puis fractionnés par extraction en phase solide en trois fractions de polarités distinctes (Dickson et al., 2009) : les lipides simples, les lipides de polarité similaire à celles des glycolipides et les lipides de polarité similaire à celle des phospholipides (Figure III-1 et Tableau III-1). Les lipides simples et la fraction glycolipidique sont les deux fractions les plus abondantes. La fraction phospholipidique est très minoritaire.

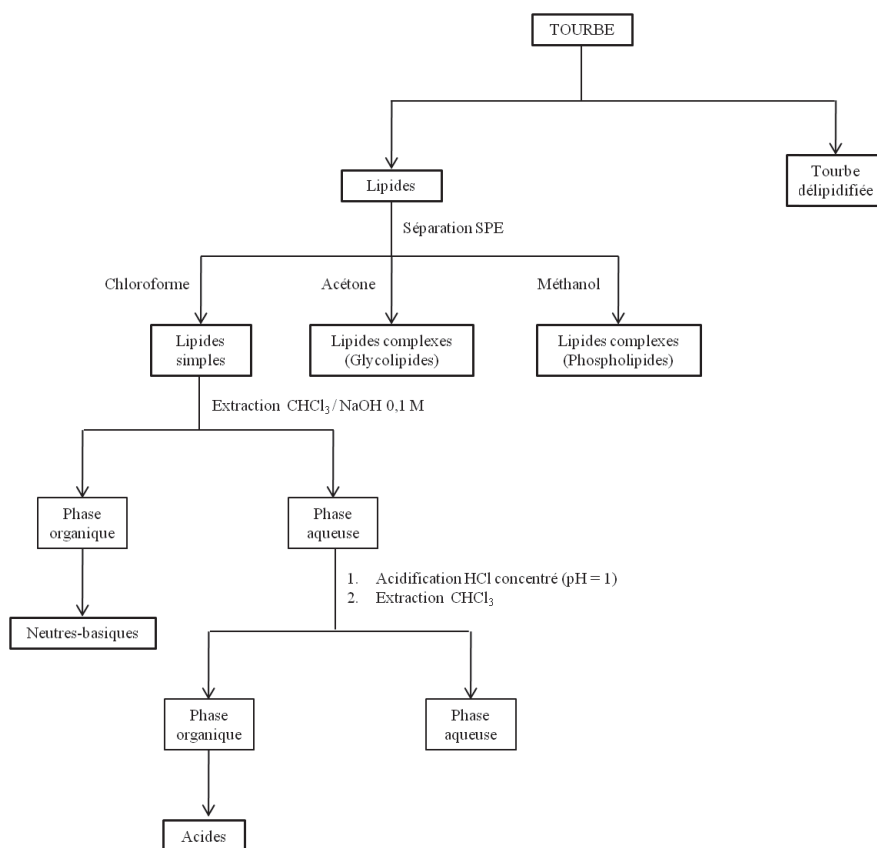


Figure III-1 : Fractionnement des lipides libres de la tourbière de Frasne.

%m.	Fraction Chloroforme	Fraction Acétone	Fraction Méthanol
Lipides libres extraits	42,7	50,1	7,2

Tableau III-1 : Répartition massique des lipides totaux extraits de la tourbe lyophilisée.

Le fractionnement des lipides simples en deux fractions, neutres-basiques et acides, a ensuite été réalisé par une extraction liquide-liquide (Figure III-1 et Tableau III-2). Les lipides neutres-basiques sont largement majoritaires.

%m.	Neutres-basiques	Acides
Lipides simples	97,3	2,7

Tableau III-2 : Répartition massique des lipides simples.

Une étude sur la séparation des fractions acétone et méthanol par chromatographie liquide haute performance a été réalisée. Cependant, malgré l'utilisation de différentes colonnes chromatographiques et de différentes conditions d'élution, aucun résultat concluant n'a pu être obtenu. Ces essais ne seront donc pas présentés dans ce mémoire.

## II. 2 - Caractérisation des lipides simples de la tourbière de Frasne

### II. 2. 1 - Lipides simples neutres-basiques

L'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) des lipides simples neutres-basiques acétylés a permis l'identification de différentes familles (Tableau III-3). La quantification a été réalisée par étalonnage interne avec le nonadécène.

	Teneurs (nmol/g de tourbe)
Composés polycycliques	99,2
Hydrocarbures	22,6
Alcools	13,6
Cétones	2,4
Autres composés	19,5
Total	157,3

Tableau III-3 : Teneurs des différentes familles identifiées dans les lipides simples neutres-basiques de la tourbe de Frasne.

#### ▪ Composés polycycliques

Les composés polycycliques représentent la famille la plus abondante. Treize structures différentes ont été identifiées. Seuls la taraxénone et le  $\beta$ -sitostérol ont été identifiés avec certitude. Leurs spectres de masse sont donnés sur la Figure III-2 et sur la Figure III-3. De telles structures sont caractéristiques des végétaux supérieurs (Killops et Killops, 2005).

Les stérols, sous forme d'acétates, sont identifiés en spectrométrie de masse grâce à des fragmentations spécifiques : perte de la chaîne latérale puis perte ultérieure de 42 unités de masse.

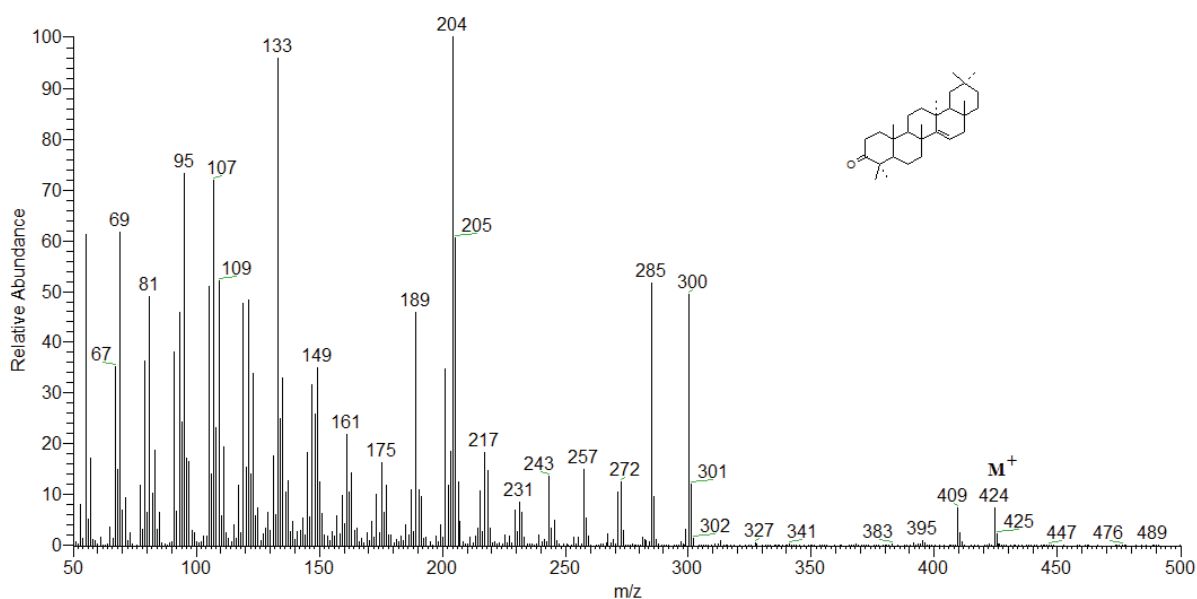


Figure III-2 : Spectre de masse de la taraxérone.

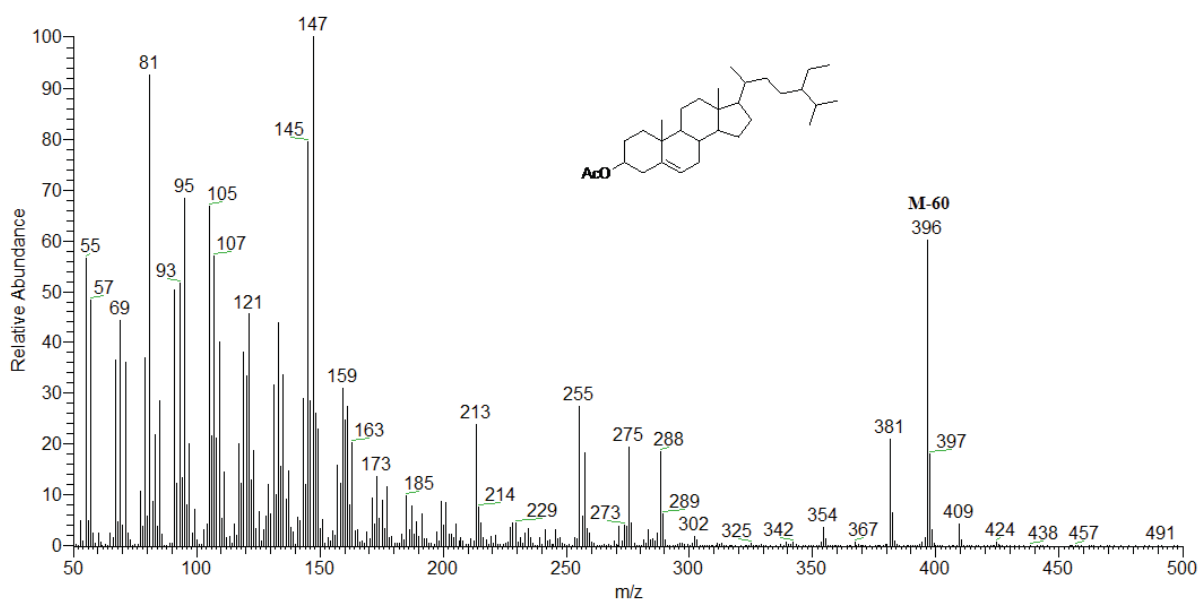


Figure III-3 : Spectre de masse de l'acétate du  $\beta$ -sitostérol.

La structure exacte des onze autres composés reste à déterminer mais ils possèdent tous des structures pentacycliques (triterpénoïdes). Leurs spectres de masse sont donnés en annexe.

▪ Hydrocarbures

Les hydrocarbures identifiés dans les lipides simples neutres-basiques sont essentiellement des *n*-alcanes dans la gamme C<sub>21</sub>-C<sub>33</sub> dont le nombre d'atomes de carbone est impair (Figure III-4). Une telle distribution est classique des végétaux supérieurs, ces *n*-alcanes impairs étant généralement associés aux cires épicuticulaires des couches protectrices des plantes vasculaires (Eglinton et Hamilton, 1967 ; Kolattukudy, 1980).

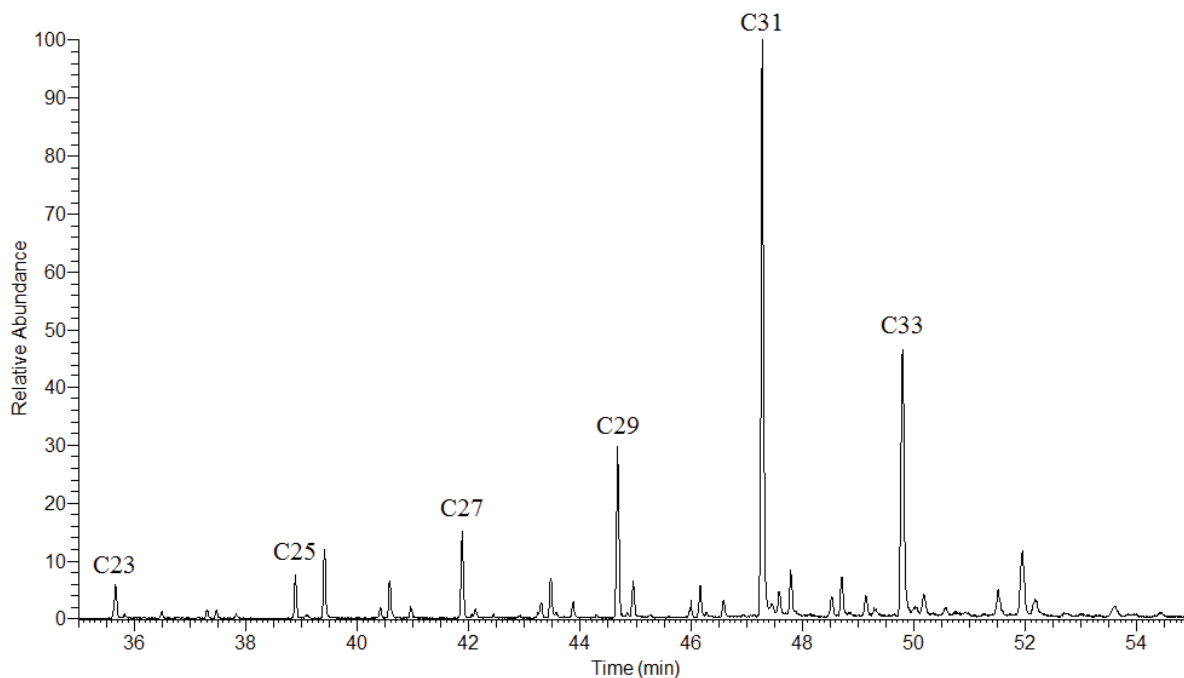


Figure III-4 : Fragmentogramme de masse pour  $m/z = 71$  des hydrocarbures de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasne.

▪ Cétones

Les cétones sont caractérisées en CG-SM par l'ion  $m/z = 43$  (coupure  $\alpha$ ) et l'ion  $m/z = 58$  issu d'un réarrangement de type Mc Lafferty (Figure III-5).

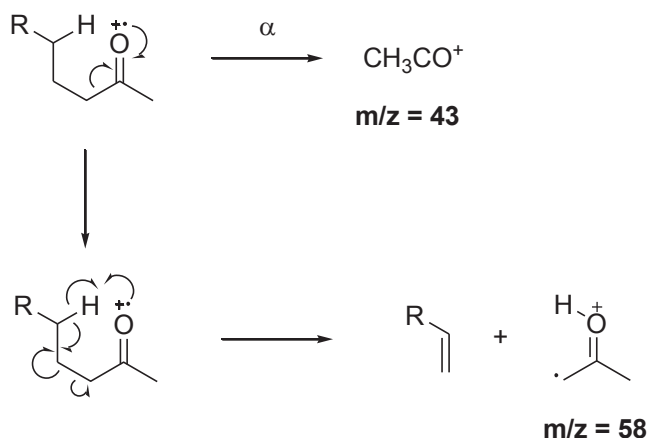


Figure III-5 : Fragmentation des cétones en CG-SM.

Elles ont été identifiées dans la gamme C<sub>21</sub>-C<sub>29</sub> et possèdent toutes un nombre impair d'atomes de carbone. La méthylcétone isoprénoïde 6,10,14-triméthylpentadéca-2-one a également été caractérisée (Figure III-6).

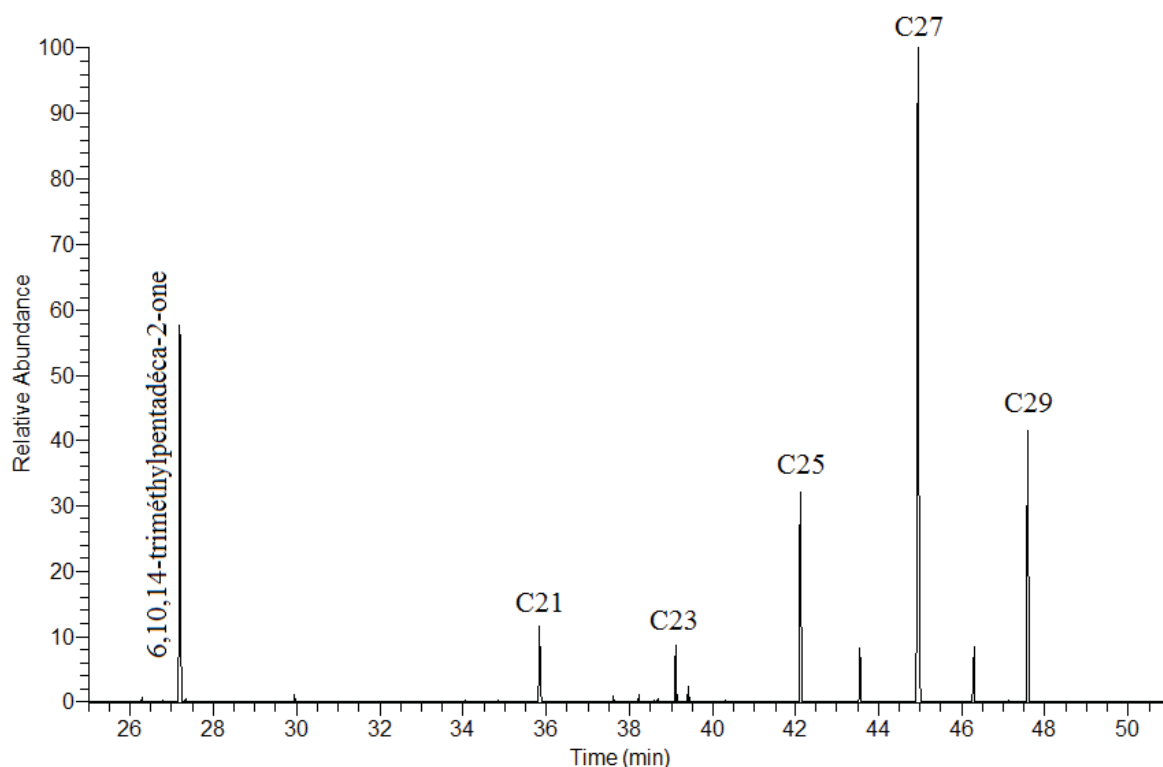


Figure III-6 : Fragmentogramme de masse pour  $m/z = 58$  des cétones de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasne.

Des méthylcétones aliphatiques ont déjà été observées dans les végétaux (Jetter et Riederer, 2000 ; Bakar et al., 2011). Leur présence peut aussi être due à une oxydation microbienne *in situ* d'autres composés lipidiques (Amblès et al., 1993). La prédominance des méthylcétones à chaîne longue (C<sub>27</sub> et C<sub>29</sub>) suggère une oxydation en position 2 de l'alcane linéaire correspondant. Un mécanisme alternatif pour la formation de ces cétones est la  $\beta$ -oxydation des acides gras (généralement pairs), suivie de leur décarboxylation (Cranwell et al., 1987 ; Meyers et Ishiwatari, 1993). Ces deux voies de synthèse sont présentées sur la Figure III-7.

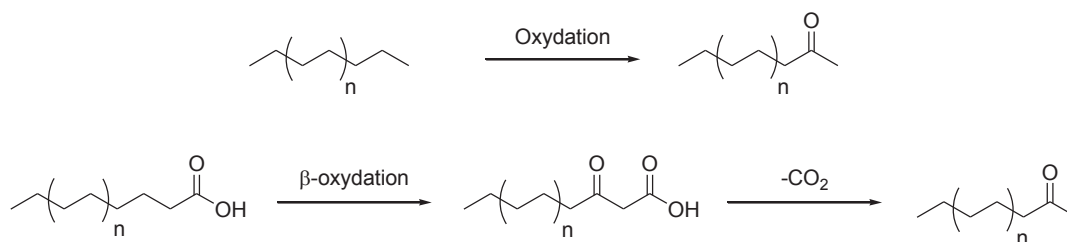


Figure III-7 : Mécanismes de formation des méthylcétones.

La cétone isoprénoïde, dont le spectre de masse est représenté sur la Figure III-8, pourrait provenir de la dégradation microbienne du phytol (Brooks et Maxwell, 1973). Un des mécanismes possibles est présenté sur la Figure III-9. Elle peut également provenir de la photodégradation de la chlorophylle lors de la sénescence des végétaux (Rontani et al., 1996).

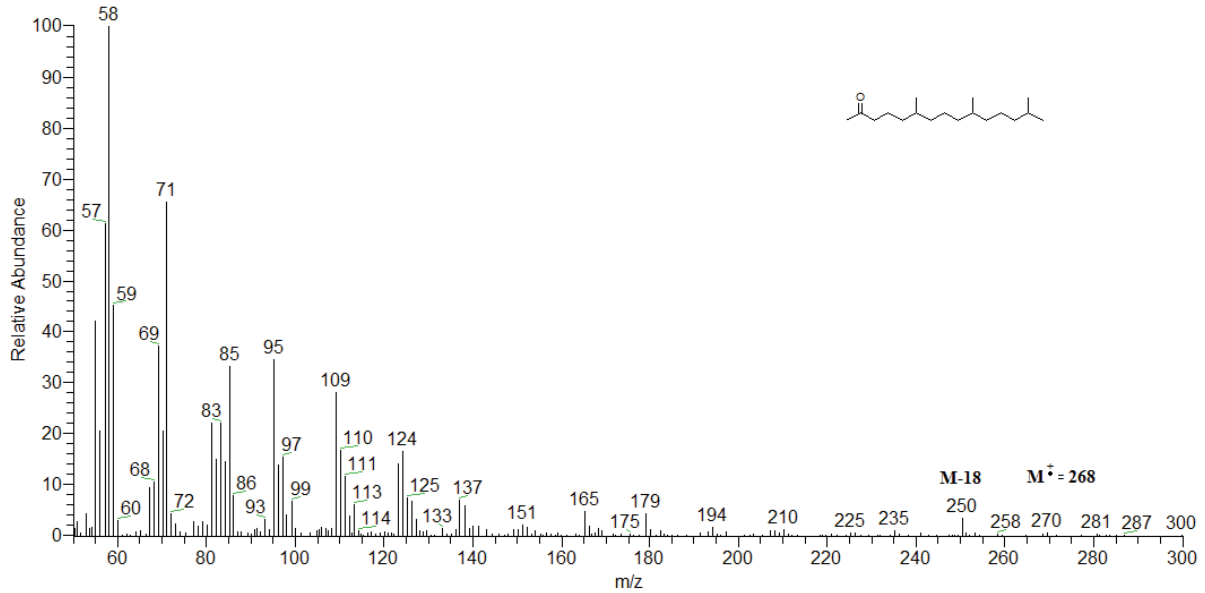


Figure III-8 : Spectre de masse de la 6,10,14-triméthylpentadéca-2-one.

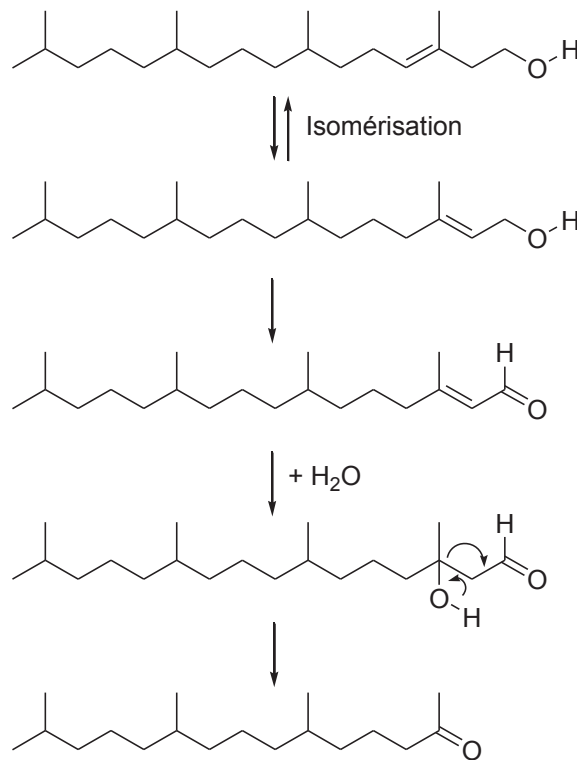


Figure III-9 : Schéma hypothétique de la bioformation de la 6,10,14-triméthylpentadécan-2-one.

▪ Alcools

Les alcools aliphatiques, sous forme d'acétates, sont identifiés en CG-SM par des fragmentations caractéristiques : l'ion  $M-60]^+$  issu de la perte d'une molécule neutre d'acide acétique, l'ion  $M-88]^+$  issu d'un réarrangement à six centres avec perte d'une molécule d'acide acétique et d'une molécule d'éthylène et l'ion  $m/z = 61$  dû à un double réarrangement d'hydrogène (Figure III-10).

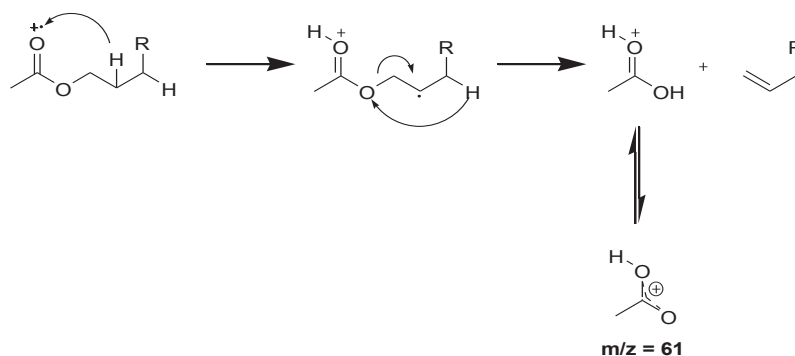


Figure III-10 : Fragmentation des acétates en CG-SM.

Les alcools identifiés possèdent tous un nombre pair d'atomes de carbone et appartiennent à la gamme  $C_{18}$ - $C_{30}$  (Figure III-11). Les maxima sont observés pour les membres en  $C_{22}$ ,  $C_{24}$  et  $C_{28}$ . Ces alcools sont typiques des cires épicuticulaires des végétaux supérieurs (Eglinton et Hamilton, 1967 ; Kolattukudy, 1980) mais peuvent également provenir des différentes espèces de sphaignes présentes sur la tourbière où les membres en  $C_{24}$  et  $C_{26}$  prédominent (Lehtonen et Ketola, 1993 ; Ficken et al., 1998 ; Baas et al., 2000).

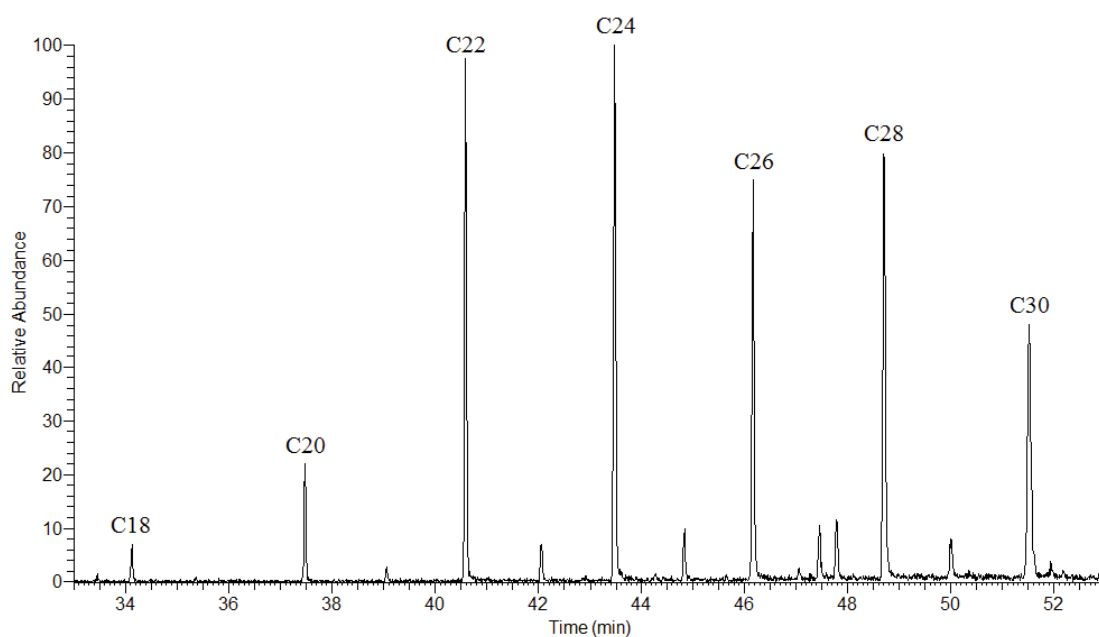


Figure III-11 : Fragmentogramme de masse pour  $m/z = 61$  des alcools de la fraction neutre-basique des lipides simples de la tourbe de Frasse.



II. 2. 2 - Lipides simples acides

L'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des lipides simples acides méthylés et acétylés a permis l'identification de différentes familles (Tableau III-4).

	Teneurs (nmol/g de tourbe)
Composés polycycliques	54,7
Acides gras	9,0
Autres composés	12,4
Total	76,1

Tableau III-4 : Teneurs des différentes familles identifiées dans les lipides simples acides de la tourbe de Frasne.

▪ Composés polycycliques

Les composés polycycliques représentent la famille la plus abondante. Les acides abiétique et déhydroabiétique ont été identifiés avec trois autres composés qui semblent être des dérivés de l'acide abiétique. Leurs spectres de masse sont donnés en annexes. De telles structures diterpéniques dérivent principalement des végétaux de type gymnosperme (conifères) (Otto et Simoneit, 2001) ce qui est en accord avec l'apport récent des gymnospermes de la tourbière de Frasne. Les spectres de masse des acides abiétique et déhydroabiétique (sous forme d'esters méthyliques) sont représentés sur la Figure III-12 et sur la Figure III-13.

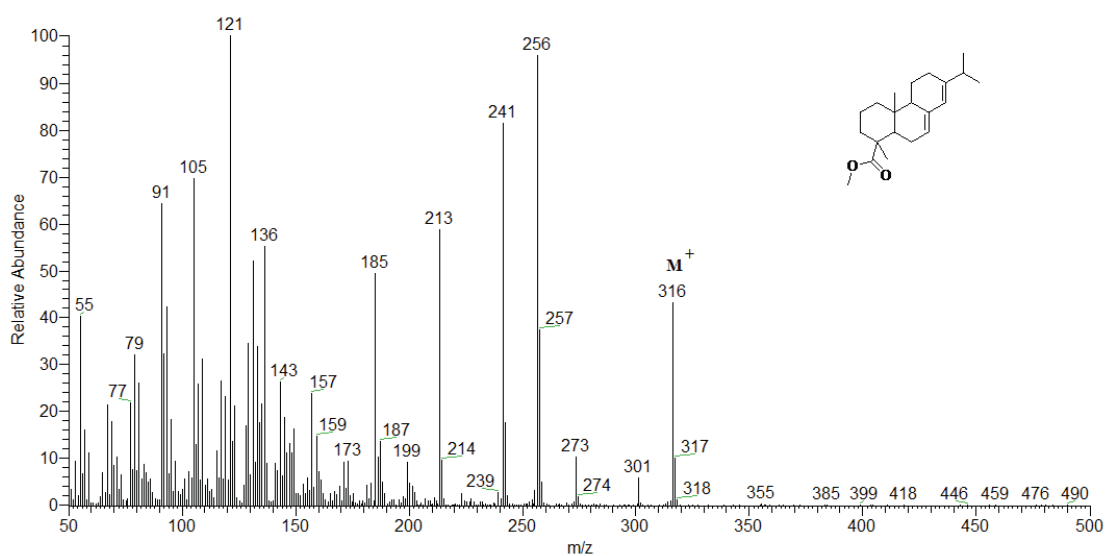


Figure III-12 : Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide abiétique.

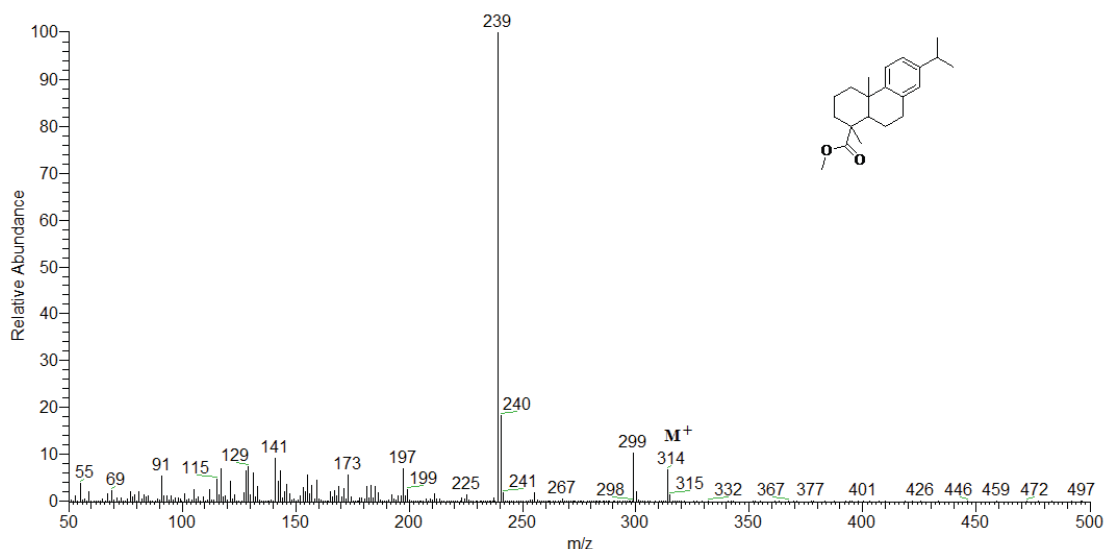


Figure III-13 : Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide déhydroabiétique.

▪ Acides gras

Les acides gras sont identifiés en CG-SM sous forme d'esters méthyliques par des fragmentations caractéristiques (Figure III-14) : l'ion  $m/z = 74$ , très intense, issu du réarrangement de McLafferty (mécanisme concerté ou non concerté), l'ion  $M-31]^+$  dû à la perte d'un radical  $CH_3O^\bullet$  et les ions  $m/z = 87$ , 143 et  $M-43]^+$ .

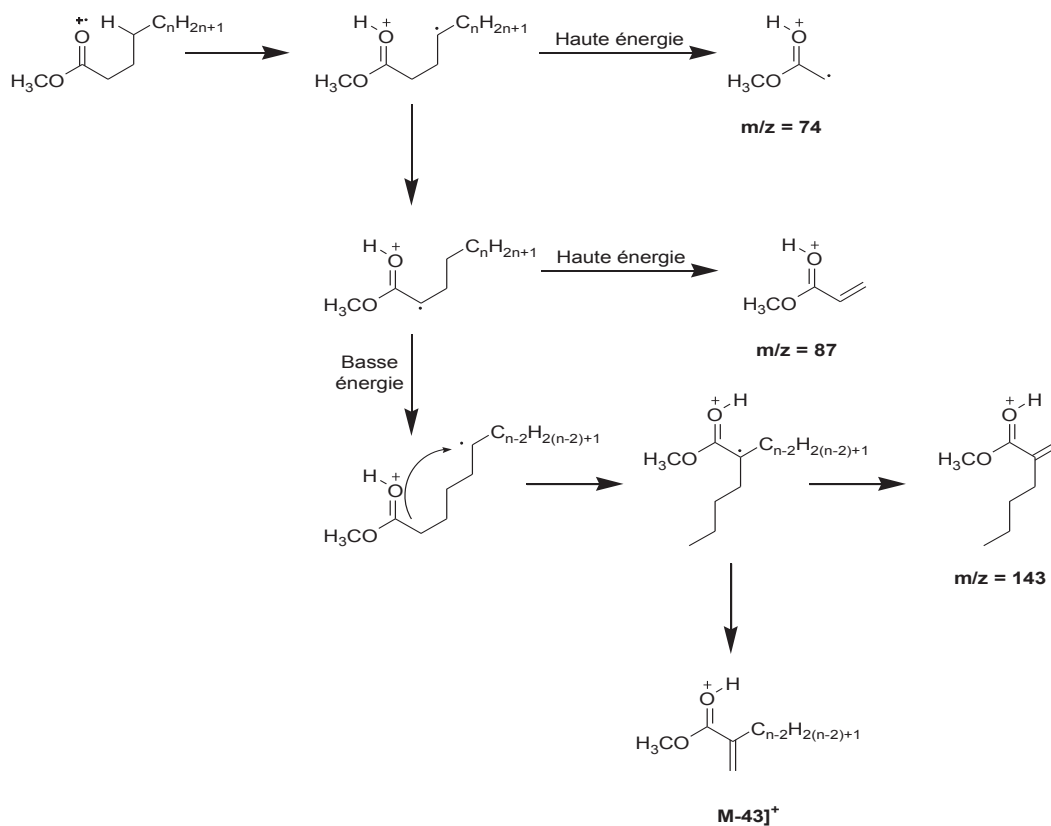


Figure III-14 : Fragmentation des esters méthyliques d'acides gras en CG-SM.

La distribution des acides gras, bimodale centrée en C<sub>16</sub> et en C<sub>24</sub>, s'étend du C<sub>12</sub> au C<sub>32</sub> avec une contribution majoritaire des composés ayant un nombre pair d'atomes de carbone et une grande proportion d'acides les plus lourds (Figure III-15). Une telle distribution est caractéristique des végétaux supérieurs (Kolattukudy et al., 1976). La présence d'acides gras ramifiés *iso* et *anteiso* en C<sub>15</sub> et C<sub>17</sub>, typiques d'une contribution bactérienne, est également observée (Zelles, 1999). L'acide gras insaturé C<sub>18:1</sub> a également été identifié en quantité égale à son homologue saturé (2,1 nmol/g de tourbe).

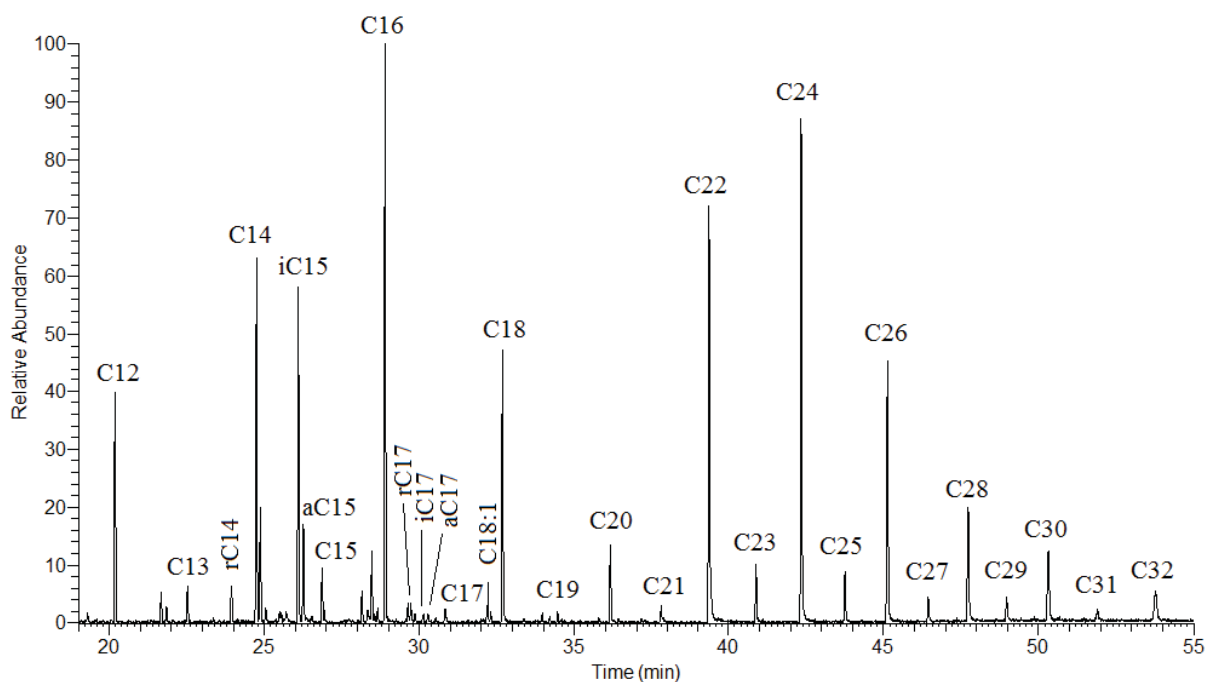


Figure III-15 : Fragmentogramme de masse pour  $m/z = 74$  des acides gras (identifiés sous la forme d'esters méthyliques) de la fraction acide des lipides simples de la tourbe de Frasne (r : ramifié ; i : iso ; a : anteiso).

### II. 3 - Comparaison des lipides simples de la tourbière de Frasne et des lipides liés libérés par la méthode DFRC

Les lipides liés libérés par la méthode DFRC montrent une teneur environ dix fois supérieure à celles des lipides simples (Tableau III-5). Cela souligne l'importance quantitative des lipides liés à la matrice macromoléculaire ou piégés à l'intérieur de celle-ci.

	Teneurs (nmol/g de tourbe)	
	Lipides simples	Lipides liés libérés par la méthode DFRC
Composés polycycliques	153,9	50,5
<i>n</i> -alcanes	22,6	130,2
Alcools	13,6	32,8
Acides gras	9,0	349,6
Autres composés	34,2	1397,9
Total	233,3	1961,0

Tableau III-5 : Teneurs des lipides simples et des lipides liés libérés par la méthode DFRC de la tourbière ombrotrophe de Frasne.

▪ Composés polycycliques

Les composés polycycliques sont principalement identifiés dans les lipides simples et semblent donc peu liés à la matrice macromoléculaire. Dix-huit composés polycycliques différents ont été détectés dans les lipides simples. Cependant, seules les structures exactes de quatre composés ont pu être identifiées : la taraxénone, le  $\beta$ -sitostérol, l'acide abiétique et l'acide déhydroabiétique. De même, huit composés polycycliques ont été identifiés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC : le  $\beta$ -sitostérol,  $\beta$ -sitostanol, le 24-éthyl-5 $\alpha$ (H)-cholest-3-ène, le stigmastane, le friedelan-3 $\beta$ -ol, l'oléan-12-ène, l'hopane C<sub>30</sub> et le DL- $\alpha$ -tocophérol (Figure III-16). Seul le  $\beta$ -sitostérol est présent dans les lipides simples et dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC.

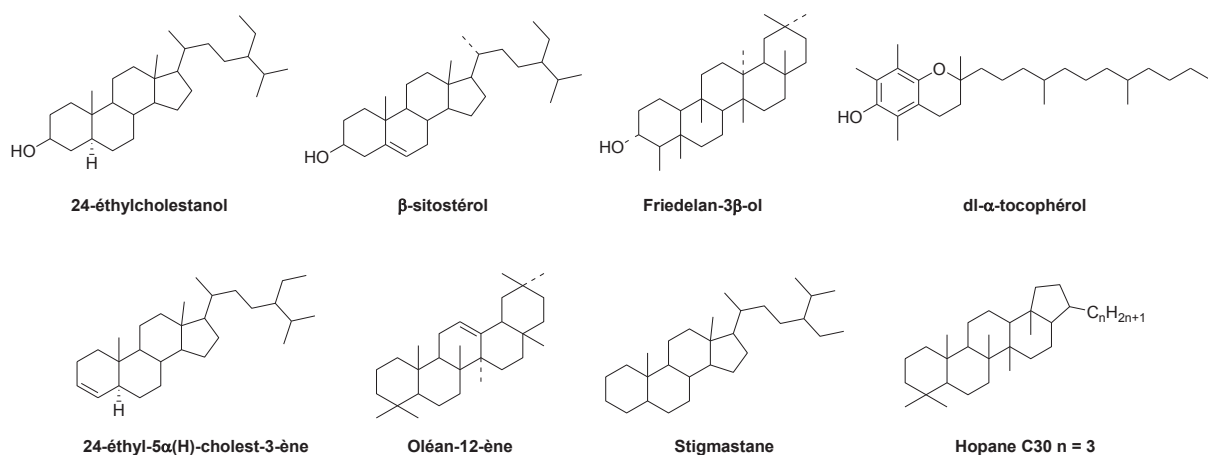


Figure III-16 : Structures des composés polycycliques identifiés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC.

- *n*-alcanes

Les *n*-alcanes sont principalement identifiés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC et présentent une distribution très différente de celle des *n*-alcanes identifiés dans les lipides simples (Figure III-17). Les lipides simples montrent une distribution classique des végétaux supérieurs caractérisée par des *n*-alcanes impairs longs (maximum pour C<sub>31</sub>) (Eglinton et Hamilton, 1967 ; Kolattukudy, 1980). Ce mode long, bien que décalé (maximum pour C<sub>27</sub>), est également observé dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC mais est minoritaire par rapport au mode court, dominé par des *n*-alcanes pairs, dont l'origine demeure inexpliquée.

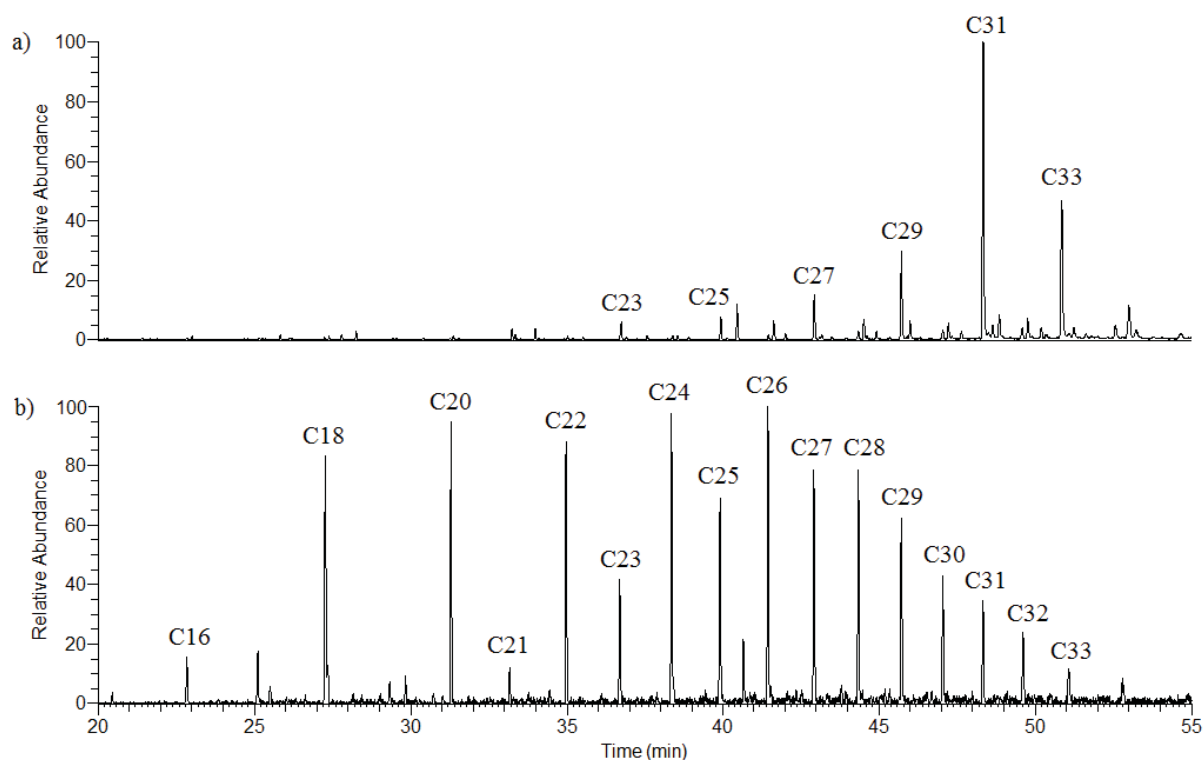


Figure III-17 : Fragmentogrammes de masse pour  $m/z = 71$  des *n*-alcanes identifiés dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC.

- Alcools

Les alcools sont principalement identifiés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC. Leur distribution est similaire à celle observée pour les lipides simples avec cependant une présence plus importante des membres courts C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub> (Figure III-18). Ces alcools sont typiques des cires épicuticulaires des végétaux supérieurs (Eglinton et Hamilton, 1967 ; Kolattukudy, 1980) mais peuvent également provenir de différentes espèces de sphaignes présentes sur la tourbière où les membres en C<sub>24</sub> et C<sub>26</sub> prédominent. L'origine des alcools courts C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub> demeure inconnue.

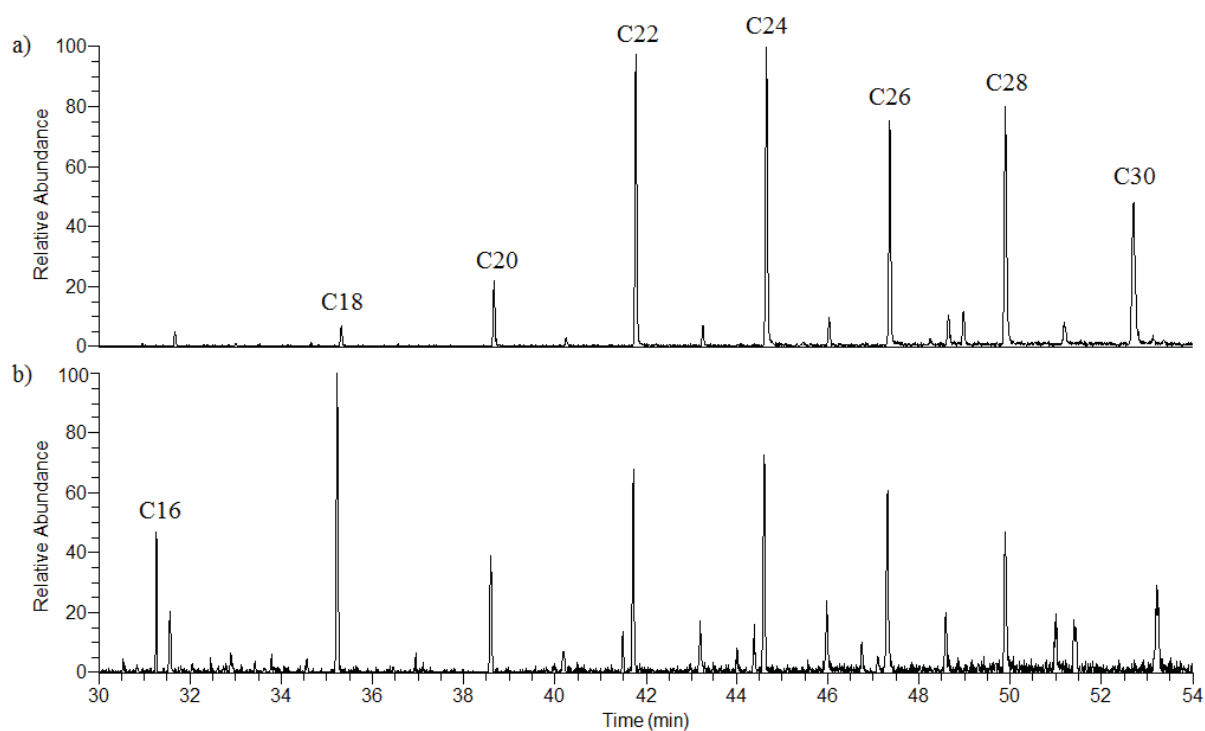


Figure III-18 : Fragmentogrammes de masse pour  $m/z = 61$  des alcools identifiés sous la forme d'acétates dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC.

- Acides gras

Comme pour les alcools, les acides gras sont majoritairement observés dans les lipides liés libérés par la méthode DFRC. Ainsi, il semblerait que ces composés soient fortement liés à la matrice macromoléculaire. Leur distribution diffère cependant de celle observée pour les acides gras des lipides simples (Figure III-19). En effet, une perte du mode long ( $C_{20}$ - $C_{32}$ ) et des acides gras ramifiés *iso* et *anteiso* en  $C_{15}$  et  $C_{17}$  est mise en évidence.

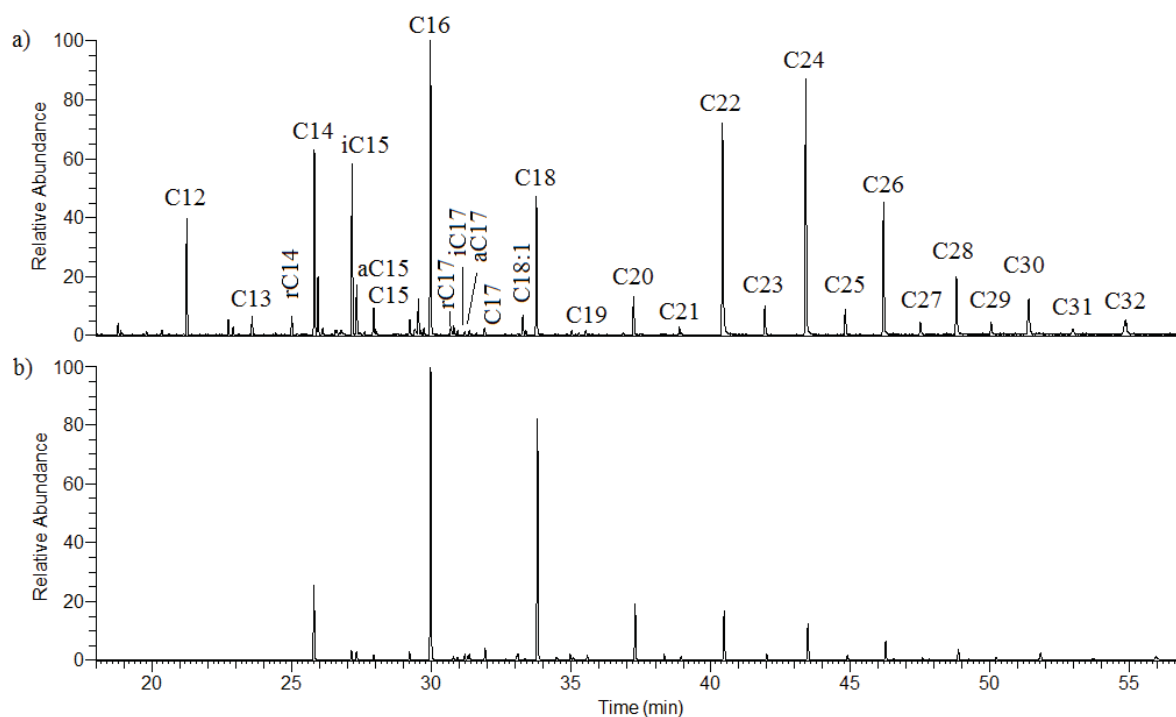


Figure III-19 : Fragmentogrammes de masse pour  $m/z = 74$  des acides gras identifiés sous la forme d'esters méthyliques dans (a) les lipides simples et (b) les lipides liés par la méthode DFRC (r : ramifié ; i : iso ; a: anteiso).

#### II. 4 - Conclusion

L'analyse des lipides simples de la tourbière de Frasne a permis la mise en évidence de composés polycycliques, d'hydrocarbures, de cétones et d'alcools dans les lipides neutres-basiques et de composés polycycliques et d'acides gras dans les lipides acides. Ces résultats soulignent principalement une origine végétale de l'échantillon.

Par ailleurs, la comparaison des lipides simples avec les lipides liés libérés par la méthode DFRC a permis de montrer l'importance des composés lipidiques liés à la matrice macromoléculaire ou piégés au coeur de celle-ci.

### **III - COMPARAISON DE TROIS METHODES D'ANALYSE DE LA LIGNINE DANS LES SOLS ET LES SEDIMENTS : L'OXYDATION ALCALINE EN PRESENCE DE CuO, LA THERMOCHIMIOLYSE EN PRESENCE DE TMAH ET LA METHODE DFRC**

Cette partie, qui correspond à un article préparé pour la revue "Biogeochemistry", a pour but de comparer trois méthodes d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments : l'oxydation alcaline en présence de CuO, la thermochemiolyse (THM) en présence de TMAH et la méthode DFRC. Différents mécanismes sont impliqués dans chaque procédé : oxydation et hydrolyse avec CuO, hydrolyse et méthylation avec TMAH et acétylation-bromation simultanées suivies d'une élimination réductrice en présence de zinc pour la méthode DFRC. De telles différences pouvant biaiser la détection de certains composés, il apparaît nécessaire de comparer les résultats obtenus pour ces trois méthodes d'analyse de la lignine.

Cette étude comparative porte sur trois échantillons : (i) un sol sous forêt acide sableux collecté dans la couche supérieure d'une forêt de pins maritimes (*Pinus pinaster*) à Cestas (Landes de Gascogne, France), (ii) une tourbe issue de la tourbière boisée de Frasne (Montagnes du Jura, France) et (iii) un lignite de Hodonín (Moravie, République Tchèque).

Les monomères ligneux libérés après l'oxydation alcaline en présence de CuO et après la thermochemiolyse en présence de TMAH sont similaires à ceux décrits dans la littérature. Les composés possédant des unités guaiacyles prédominent et soulignent l'influence de végétaux gymnospermes. La méthode DFRC permet la libération de monolignols provenant de la coupure des liaisons  $\beta$ -éthers de la lignine ainsi que d'autres composés secondaires, possédant principalement des unités guaiacyles, issus d'autres structures.

Le rendement total en lignine, noté  $\Lambda$ , a initialement été défini pour l'oxydation alcaline en présence de CuO. Il est calculé comme la somme des concentrations de tous les dérivés ligneux normée à 100 mg de carbone organique. De la même façon,  $\Lambda_{THM}$  a été employé pour la thermochemiolyse en présence de TMAH mais reste à définir pour la méthode DFRC.  $\Lambda_{DFRC}$  a donc été introduit comme la somme des concentrations des monolignols normée à 100 mg de carbone organique. En s'affranchissant des composés secondaires,  $\Lambda_{DFRC}$  fournit une meilleure évaluation de la quantité de lignine totale,  $\Lambda_{THM}$  et  $\Lambda_{CuO}$  étant supérieurs à  $\Lambda_{DFRC}$ . Ces différences peuvent s'expliquer par les différences des mécanismes impliqués pour chaque procédé.



De plus, l'étude du ratio acide/aldéhyde, noté Ad/Al, permettant de suivre la dégradation de la lignine, peut être employée pour l'oxydation alcaline en présence de CuO et pour la thermochimioolyse en présence de TMAH. La méthode DFRC ne libérant pas d'aldéhyde, un tel ratio ne peut être calculé. Il apparaît cependant que la teneur en monolignols soit un bon indicateur pour suivre la dynamique et la dégradation de la lignine dans l'environnement.

Enfin, les ratios S/G et P/G permettent de déterminer l'origine végétale d'un échantillon, la lignine des gymnospermes étant majoritairement constituée d'unités guaiacyles alors que celle des angiospermes contient des quantités équivalentes d'unités guaiacyles et syringyles. Les trois méthodes montrent des ratios proches de zéro en accord avec l'origine gymnosperme de nos échantillons. Comme pour le rendement total en lignine, les disparités observées sont probablement dues aux différences des mécanismes impliqués pour chaque procédé.

L'oxydation alcaline en présence de CuO, la thermochimioolyse en présence de TMAH et la méthode DFRC ne réagissent pas avec les mêmes catégories de composés aromatiques. L'avantage de la méthode DFRC reste sa spécificité, sa capacité à analyser de façon particulière les monolignols (encore) présents dans les sols et les sédiments.

## Comparison of three methods for the analysis of lignin in soils and sediments: CuO oxidation, tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis and Derivatization Followed by Reductive Cleavage method

Céline Estournel-Pelardy<sup>(a)</sup>, Laurent Grasset<sup>\*(a)</sup>, Leoš Doskočil<sup>(b)</sup>, André Amblès<sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> Université de Poitiers, SRSN, UMR-CNRS 6514, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers Cedex, France

<sup>(b)</sup> Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyòova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

Corresponding author:

Tel.: +33 5 49 45 37 59

Fax: +33 5 49 45 35 01

E-mail address: laurent.grasset@univ-poitiers.fr (L. Grasset)

### **Abstract**

In this study, lignin analysis by CuO oxidation, tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and DFRC procedures were compared. These methods were applied to three samples: (1) a sandy acid forest soil sample, (2) a peat sample and (3) a low rank coal lignite sample. Different mechanisms are involved in each process: oxidation and hydrolysis with CuO, hydrolysis and methylation with TMAH, acetylation-bromination followed by reductive cleavage with zinc dust for the DFRC method. Lignin monomers obtained after CuO oxidation and TMAH thermochemolysis procedures were similar to those described in the literature. Compounds with guaiacyl units were predominantly identified while components with a syringyl or *p*-hydroxyphenyl structures were less abundant. The DFRC method released monolignols (*trans* coniferyl diacetate and *trans* sinapyl diacetate) that arose from  $\beta$ -ether cleavage and minor components with predominantly guaiacyl units originating from other structures. Total lignin yields  $\Lambda$ , S/G, P/G and Ad/Al ratios were calculated and compared for the three procedures. Because the three methods do not react with the same lignin pools (differences could be due to chemical and/or physical

arrangements), direct comparisons should be made carefully but could be viewed rather than complementary methods for a fine characterization of lignin in soils and sediments.

## Keywords

Lignin, CuO oxidation, TMAH thermochemolysis, DFRC method

## 1. Introduction

Lignin is the second most abundant natural biopolymer after cellulose which accounts for approximately 30% of the organic carbon in the biosphere (Boerjan et al. 2003). It is an amorphous polymer consisting of phenylpropane units which precursors are three hydroxycinnamyl alcohol monomers (monolignols): *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols. Lignin monomers are among the most effective biomarkers for woody material because they provide an unambiguous fingerprint for vascular plants.

Much of the work examining lignin in soils and sediments has been conducted using CuO oxidation (Hedges and Ertel 1982; Hänninen 1992; Hu et al. 1999; Hyötyläinen et al. 1995; Kiem and Kögel-Knabner 2003; Loh et al. 2008; Miltner and Emeis 2001; Spielvogel et al. 2007). This method being time-consuming and insufficiently specific, an alternative thermochemolytic method using alkylating or silylating agents has been introduced (Clifford et al. 1995; del Río et al. 2007; Filley et al. 1999; Filley et al. 2006; Kuroda 2000; Kuroda and Nakagawa-izumi 2006; Martín et al. 1995; Nakagawa-izumi et al. 2004; Nierop and Filley 2007). Comparisons of these two procedures have been reported in the literature (Hatcher et al. 1995; Wysocki et al. 2008). Because they differ in the mechanism of degradation, each method results in a different suite of lignin products and compound ratios.

Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC) method is highly efficient for cleaving lignin  $\alpha$ - and  $\beta$ -aryl ethers. It is a three step pathway: bromination of the benzylic position and simultaneous acetylation of free hydroxyl groups by acetyl bromide followed by the reductive cleavage of the  $\beta$ -aryl ether bonds via zinc metal coordination and acetylation of the newly generated phenolic hydroxyl groups (Figure 1). Commonly used in wood chemistry, it is therefore suitable for lignocellulose materials (del Río et al. 2008; Ikeda et al. 2002; Lu and Ralph 1998; Lu and Ralph 1999; Marita et al. 2003; Peng et al. 1998; Yamauchi and Fukushima 2004) but also for lignite (Grasset et al. 2010).

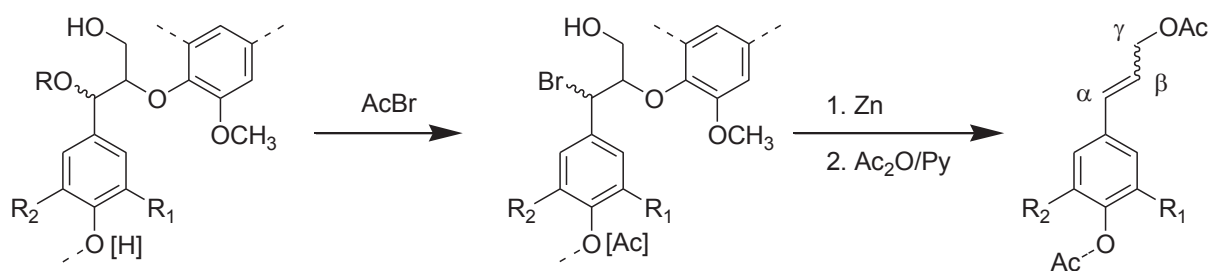


Figure 1. Selective ether cleavage in lignins by DFRC method.

The purpose of this study was to compare lignin analysis by CuO oxidation, tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and DFRC procedures on a set of samples of soil and sediments. These methods were applied to three samples: (1) a sandy acid forest soil sample collected from the upper layer (0-30 cm) of a plot located in a maritime pine (*Pinus pinaster*) forest (Cestas, Landes de Gascogne, France); (2) a peat sample from a wooded *Sphagnum*-dominated mire (Frasne, Jura Mountains, France) and (3) a low rank coal lignite sample (Hodonín, Moravia, Czech Republic).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The sandy acid forest soil sample was collected from the upper layer (0-30 cm) of a plot located near to Cestas (southwest France) in a maritime pine (*Pinus pinaster*) forest. This acid soil (pH 4.3 measured in water) is a sandy spodosol and has been regularly fertilized with inorganic fertilizer of about 40 years for wood production. Coarse fresh plant debris were removed by sieving at 2 mm. The sieved soil exhibits a total carbon content of 2.6 wt%.

The peat sample was obtained from the Frasne peatland (46°49'N, 6°10'E). It is an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire situated in the Jura Mountains (France). The site is protected by the EU Directive "Natura 2000". Sample was taken in the wooded part of the peatland (covered since 50 years by *Picea Abies* and *Pinus Uncinata*). According to radiocarbon dating, sample was 85 ± 25 B.P. years old. Roots were removed manually. The peat exhibits a total carbon content of 47.3 wt%.

The low rank coal lignite sample was obtained from the Mír mine located in the Southern part of Moravia (Czech Republic) nearby Hodonín. The lignite exhibits a total carbon content of 40.0 wt%.

### *2.2. CuO oxidation*

The CuO oxidation procedure was similar to the one reported in the literature (Hedges and Ertel 1982). Briefly, sample (50 mg),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (100 mg) and CuO (1 g) were introduced in an acid digestion bomb (Parr Instrument Company, Moline, IL). The bomb was first purged of air and 7 ml of the NaOH solution (2 M, preboiled and stored under  $\text{N}_2$ ), were added under anoxic conditions. The bomb was heated to 170 °C in an oil bath during 3 hours. After cooling overnight, the content is washed with 1 M NaOH into a 50-ml centrifuge tube and rotated at about 4000 rpm (~3850 g) for 10 minutes in a Sigma Laboratory Centrifuge (Model 3-15). After the supernatant was decanted and saved, the residue was washed twice with 20 ml of 1 M NaOH (after dispersion with ultrasonic dispersion) and centrifuged as before. The combined basic extracts were acidified to pH 1 with 6.4 M HCl, rested it one hour and filtered on Whatman GF/F glass microfiber filters (0.7  $\mu\text{m}$ ). The filtrate was extracted with dichloromethane (3  $\times$  20 ml), dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. Then, the organic fraction was methylated with trimethylsilyldiazomethane in dichloromethane/methanol (Hashimoto et al. 1981) and acetylated with acetic anhydride in presence of pyridine before analysis by gas chromatography (GC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS).

### *2.3. TMAH thermochemolysis*

The thermochemolysis used was based in the off-line procedure developed by Grasset and Amblès (1998). Samples (1 g) were milled and thoroughly mixed with an excess of a 50% (w/w) solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) in methanol. After one hour of impregnation, the sample was transferred to a 60  $\times$  3 cm i.d. Pyrex<sup>®</sup> tube and heated at 400 °C (30 minutes isothermal). Thermochemolysis products were swept using  $\text{N}_2$  (flow rate at 100  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) to a trap containing dichloromethane. When pyrolysis was complete, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator before analysis by GC and GC-MS.

### *2.4. DFRC method*

The DFRC procedure was almost identical to the one reported in the literature (Lu and Ralph 1997a). Briefly, the sample (4 g) and 200 ml of AcBr stock solution (acetyl bromide/acetic acid, 8/92, v/v) were gently stirred at 50 °C for 2 hours. After the complete evaporation of the solvent, the residue was dissolved in 200 ml of the acidic reduction solvent (dioxane/acetic acid/water, 5/4/1, v/v/v) and stirred with zinc dust (20 g) at 50 °C for 30

minutes. The mixture was filtered on Whatman GF/F glass microfiber filters (0.7  $\mu\text{m}$ ). The filtrate was quantitatively transferred into a separatory funnel with dichloromethane (100 ml) and a saturated solution of ammonium chloride (100 ml) was added. The pH of the aqueous phase was adjusted to 3 by adding hydrochloric acid (6.4 M). The mixture was vigorously mixed and the organic layer was separated. The water phase was extracted twice more with dichloromethane. The combined organic fractions were dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure before acetylation for 40 min in dichloromethane (100 ml) with acetic anhydride (16 ml) and pyridine (8 ml). All volatile components were completely removed by coevaporation with ethanol under reduced pressure and methylated with trimethylsilyldiazomethane in dichloromethane/methanol (Hashimoto et al. 1981) before analysis by GC and GC-MS.

### *2.5. Analytical techniques*

Products were analysed by capillary gas chromatography (GC) using a Hewlett-Packard 6890 GC (split injector, 250 °C; flame ionization detector (FID), 300 °C) with a fused silica capillary column (Supelco Equity 5%, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and helium as carrier gas (1 mL.min<sup>-1</sup>). The oven temperature was programmed from 60 to 300 °C at 5 °C.min<sup>-1</sup> and held there for 15 minutes. Quantification was done with *n*-nonadecene or methyl nonadecanoate as internal standard. The GC-Mass Spectroscopy (MS) analyses were performed on a Trace GC Thermo Finnigan coupled to a Thermo Finnigan Automass (with the same GC conditions). The MS was operated in the electron ionization mode at 70 eV and the ion separation was operated in a quadripolar mass filter. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards) and literature data.

## **3. Results**

Extracted ion chromatograms at *m/z* 77 of ligneous compounds released after CuO oxidation, DFRC method and TMAH thermochemolysis on the sandy acid forest soil sample are shown in Figure 2.

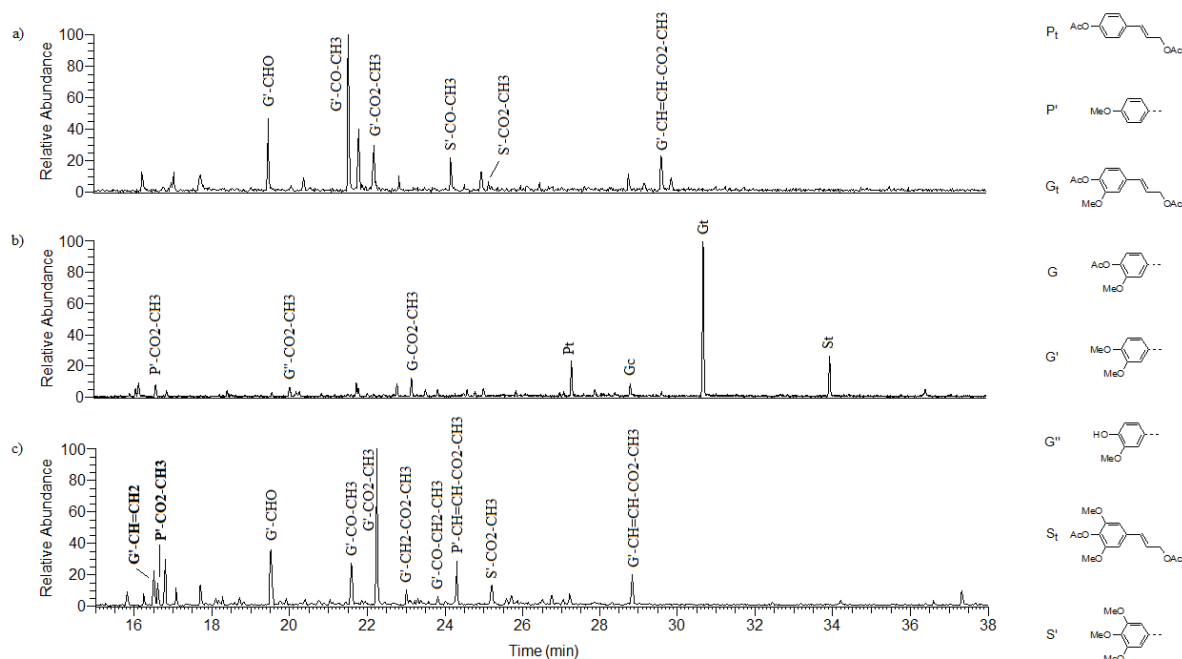


Figure 2. Extracted ion chromatograms at  $m/z$  77 of ligneous compounds released after (a) CuO oxidation, (b) DFRC method and (c) TMAH thermochemolysis on the sandy acid forest soil sample.

In the CuO method, polar phenolic compounds are released by the one electron oxidation of polymer linkages in dilute alkaline solution and must then be derivatized to be analysed using gas chromatography (Figure 3). Quantitative analysis of the respective monomers provides quantitative measures of the lignin content. However, an obvious drawback of the technique is that the CuO method does not recover *ortho*-phenols derived from tannins or demethylated lignin. Indeed, microbially demethylated lignin monomers (catechols) are not analysed because the CuO method oxidizes catechols, inducing ring rupture to form low molecular weight aliphatic acids unrecognizable as lignin derivatives.

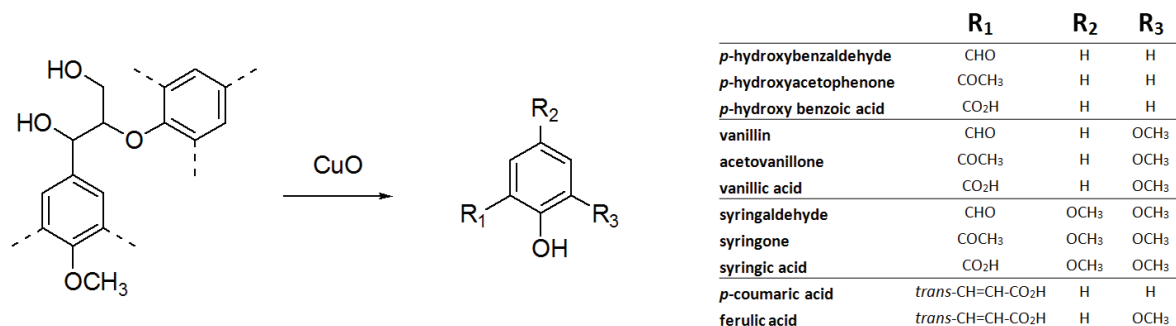


Figure 3. CuO oxidation.

The major lignin-derived CuO oxidation products are given in the Table 1. These phenols can be divided into four different structural families: *p*-hydroxyl (P), guaiacyl or vanillyl (G), syringyl (S) and cinnamyl (C). Compounds with guaiacyl units were predominantly identified while components with syringyl or *p*-hydroxyphenyl structures were less abundant.

		Abundance (nmol/100 mg of organic C)		
		Sandy acid forest soil	Peat	Low rank coal lignite
<b>P</b>	<i>p</i> -methoxybenzaldehyde	-	1.7	-
	<i>p</i> -methoxyacetophenone	-	14.3	-
<b>G</b>	Vanillin <sup>(a)</sup>	87.9	21.5	5.1
	Acetovanillone <sup>(a)</sup>	261.7	93.6	24.2
	Vanillic acid <sup>(a,b)</sup>	228.5	-	12.1
<b>S</b>	Acetosyringone <sup>(a)</sup>	130.1	8.0	3.6
	Syringic acid <sup>(a,b)</sup>	51.6	-	-
<b>C</b>	Ferulic acid <sup>(a,b)</sup>	59.3	-	-

Table 1. CuO oxidation products (a: phenol was identified as methoxy form; b: carboxylic acid was identified as methyl ester form).

The TMAH thermochemolysis induces high temperature saponification and subsequent methylation of polar hydroxyl and carboxyl functional groups, resulting in greater diversity of methylated compounds. This method was widely used to investigate comprehensively the lignin structural network based on the unique chemical bonds between subunits (Kuroda et al. 2002; Kuroda and Nakagawa-izumi 2005a; Kuroda and Nakagawa-izumi 2005b; Kuroda and Nakagawa-izumi 2006; Kuroda et al. 2009; Nakagawa-izumi et al. 2004). In particular, one study on TMAH thermochemolysis of softwood lignin has shown that it effectively cleaves  $\beta$ -aryl ether linkages in lignin (Figure 4) (Kuroda and Nakagawa-izumi 2006). Moreover, the TMAH products tend to retain their side chains and can include tannin-derived or polyphenolic lignin-like structures which allows determination of microbial demethylation, hydrolysable tannin input and side chain oxidation when <sup>13</sup>C-labeled TMAH is used (Filley et al. 1999; Nierop and Filley 2007).



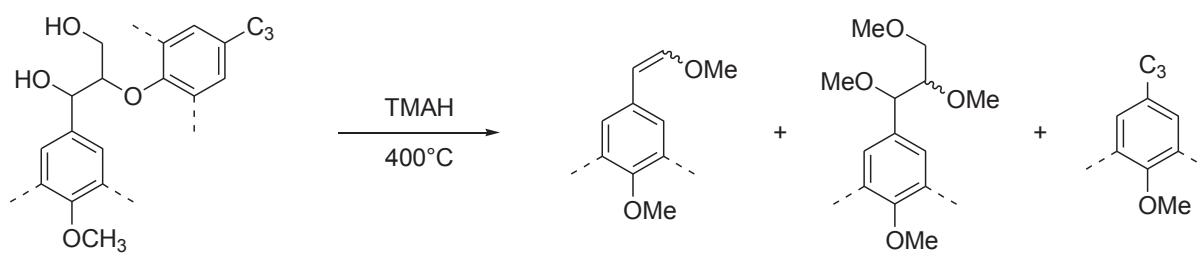


Figure 4. TMAH thermochemolysis products of arylglycerol-β-ether subunits (Kuroda and Nakagawa-izumi 2006).

The TMAH thermochemolysis (THM) procedure has been shown to produce a series of lignin-derived methylated monomers whose quantitative analysis should reflect the lignin contents of the samples (Kuroda and Nakagawa-izumi 2006; Kuroda et al. 2002; Nakagawa-izumi et al. 2004). *p*-Methoxyacetophenone, *p*-methoxybenzoic acid methyl ester, 3,4-dimethoxybenzaldehyde, 3,4-dimethoxyacetophenone, methyl 3,4-dimethoxybenzoate and methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate were predominantly identified (Table 2). As for CuO oxidation, compounds with guaiacyl units were predominantly identified while components with syringyl or *p*-hydroxyphenyl structures were less abundant.

		Abundance (nmol/100 mg of organic C)		
		Sandy acid forest soil	Peat	Low rank coal lignite
<b>P</b>	<i>p</i> -methoxybenzaldehyde	5.5	88.8	1.2
	<i>p</i> -methoxyacetophenone	-	223.5	2.7
	<i>p</i> -methoxybenzoic acid, methyl ester	21.2	346.4	4.6
	Methyl (4-methoxyphenyl)acetate	4.3	104.7	-
	4-methoxycinnamic acid, methyl ester	23.4	196.7	1.2
<b>G</b>	3,4-dimethoxytoluene	-	-	2.2
	4-ethyl-1,2-dimethoxybenzene	-	61.7	1.2
	3,4-dimethoxystyrene	14.9	300.7	3.3
	Methyleugenol	2.9	-	2.4
	1,2,4-trimethoxybenzene	10.0	225.0	1.1
	3,4-dimethoxybenzaldehyde	34.9	-	34.9
	3,4-dimethoxyacetophenone	22.6	194.3	16.5
	1-(3,4-dimethoxyphenyl)propan-1-one	5.2	38.8	4.5
	3,4-dimethoxyphenylacetone	-	-	1.5
	Vanillic acid, methyl ester	-	37.6	-
	Methyl 3,4-dimethoxybenzoate	86.0	778.2	21.7
	Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate	6.2	38.8	7.4
	(E)-methyl 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate	16.2	98.2	-
	1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-methoxyethene	-	131.4	2.1
4-(2-ethoxy-1,2-dimethoxyethyl)-1,2-dimethoxybenzene	8.6	-	3.4	
<b>S</b>	Methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate	12.0	97.0	2.1

Table 2. TMAH thermochemolysis products.

As shown in Figure 1, the DFRC degradation method requires two key steps: (1) bromination of the benzylic position and simultaneous acetylation of free hydroxyl groups by acetyl bromide, and (2) reductive cleavage of the  $\beta$ -aryl ether bonds via zinc metal coordination. Final acetylation is used to acetylate free phenolic groups that are produced following the reduction step and reduce the number of compounds to be quantitated. The DFRC method mainly released monolignols (*trans p*-coumaryl diacetate, *cis/trans* coniferyl diacetate and *cis/trans* sinapyl diacetate) that arose from  $\beta$ -ether cleavage (Lu and Ralph

1997b). Minor components with predominantly guaiacyl units, originating from other structures, were also identified (Table 3). 2-Methoxytoluene derived from *p*-hydroxybenzaldehyde after the Zn reduction step or from *p*-coumaric alcohol brominated with AcBr, forming the toluene derivative in the Zn reduction step. Isoeugenol may arise from coniferyl alcohol end groups. Coumaric and coniferic acids (detected as methyl esters) are naturally present in several woody and non-woody plants and could also arise from diagenetically modified lignin. However, there is no plausible mechanism for the release of 3,4-dimethoxyacetophenone and 1-(4-hydroxy-3-methylphenyl)propan-2-one with the DFRC method.

		Abundance (nmol/100 mg of organic C)		
		Sandy acid forest soil	Peat	Low rank coal lignite
<b>P</b>	<i>trans p</i> -coumaryl diacetate	7.0	-	-
	<i>p</i> -methoxybenzoic acid, methyl ester	2.6	-	0.1
	<i>cis</i> coniferyl diacetate	2.2	-	-
	<i>trans</i> coniferyl diacetate	32.7	102.9	0.1
	Vanillic acid	2.6	-	0.1*
	Methyl 4-acetoxybenzoate	3.9	-	-
<b>G</b>	Methyl 3,4-dimethoxybenzoate	-	120.0	0.2
	3,4-dimethoxyacetophenone	-	-	0.1
	2-methoxytoluene	1.9	-	-
	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-one	-	-	< 0.1
	Isoeugenol	-	-	0.1
<b>S</b>	<i>cis</i> sinapyl diacetate	0.4	-	-
	<i>trans</i> sinapyl diacetate	8.2	24.0	0.1

Table 3. DFRC products (\*: detected as methyl ester).

## 4. Discussion

### 4.1. Total lignin content and lignin degradation proxies

The sum of the various monomer derivatives obtained from CuO oxidation provides a measure of the total lignin content if normalized to 100 mg of organic carbon. The parameter for such a measurement in the CuO oxidation procedure has been referred to as "Λ" (Hatcher

et al. 1995). A similar sum of the various lignin-derived products in the TMAH procedure could also be obtained (Hatcher et al. 1995; Wysocki et al. 2008).

In our study, total lignin yields for CuO oxidation and TMAH thermochemolysis methods, reported as  $\Lambda_{\text{CuO}}$  and  $\Lambda_{\text{TMAH}}$ , were calculated as the sum of the concentrations of lignin-derived compounds normalized to 100 mg of organic carbon. For the DFRC method,  $\Lambda_{\text{DFRC}}$  was introduced as the sum of the concentrations of monolignols normalized to 100 mg of organic carbon. Other aromatic components possibly originating from other structures were not considered. Results are summarized in Table 4.

	$\Lambda_{\text{CuO}}$	$\Lambda_{\text{TMAH}}$	$\Lambda_{\text{DFRC}}$
Sandy acid forest soil	819.0	273.9	50.5
Peat	139.1	2961.8	126.9
Low rank coal lignite	45.0	113.9	0.1

Table 4. Total lignin yields.

Results showed that  $\Lambda_{\text{TMAH}}$  is higher than  $\Lambda_{\text{DFRC}}$  for the three samples and higher than  $\Lambda_{\text{CuO}}$  for peat and low rank coal lignite. In the same way,  $\Lambda_{\text{CuO}}$  is higher than  $\Lambda_{\text{DFRC}}$  for sandy acid forest soil and low rank coal lignite. Moreover, the TMAH thermochemolysis and the DFRC method gave the same distributions:  $\Lambda_{\text{Peat}}$  was higher than  $\Lambda_{\text{Sandy acid forest soil}}$  which was higher than  $\Lambda_{\text{Low rank coal lignite}}$  while the CuO oxidation induced an inversion between  $\Lambda_{\text{Peat}}$  and  $\Lambda_{\text{Sandy acid forest soil}}$ . Total lignin yields disparity could be explained by the inherent differences in chemolytic mechanisms (oxidation and hydrolysis with CuO, hydrolysis and methylation with TMAH, acetylation-bromination followed by reductive cleavage with zinc dust for the DFRC method) which resulted in selective bias in detection of some compounds. Specifically, whereas the CuO method does not recover *ortho*-phenols derived from tannins or demethylated lignin, the TMAH method was highly selective for these polyphenolic compounds and could not distinguish between them and lignin once they are methylated (Filley et al. 2006; Nierop and Filley 2007). However, only monolignols were considered for the calculation of  $\Lambda_{\text{DFRC}}$ . Such compounds arose unequivocally from  $\beta$ -ether cleavage of lignin units. In this way, bias in detection of some compounds should be avoided with the DFRC method.

Moreover, ratios of the more oxidized derivatives (carboxylic acids) with the corresponding aldehyde provide a measure of lignin degradation (Ertel and Hedges 1985; Hedges et al. 1988; Hedges and Mann 1979). The degradative index acid/aldehyde (Ad/Al) was calculated as the ratio of vanillic acid to vanillin for CuO oxidation and as the ratio of

those compounds' permethylated analogs, 3,4-dimethoxybenzoic acid methyl ester to 3,4-dimethoxybenzaldehyde for TMAH thermochemolysis (Wysocki et al. 2008). Because the DFRC method does not release aldehydes, Ad/Al ratios were only calculated for CuO oxidation and TMAH thermochemolysis procedures (Table 5). However,  $\Lambda_{DFRC}$  seems to be correlated with the degradation of lignin. Considering sediment samples of our study,  $\Lambda_{DFRC}$  decreases from 126.9 nmol/100 mg of organic C for the peat to 0.1 nmol/100 mg of organic C for the low rank coal lignite.  $\Lambda_{DFRC}$  is lower for the old sediment than for the recent one which is in accordance with the lignin degradation dynamic. Thus, because the DFRC method is the most specific one to analyse intact monolignols, it will be interesting to use it to follow lignin degradation in environment.

	CuO oxidation	TMAH Thermochemolysis
Peat	0.0	-
Low rank coal lignite	2.4	0.6
Sandy acid forest soil	2.6	2.5

Table 5. Ad/Al ratios.

#### 4.2. Source identification: S/G and P/G ratios

CuO oxidation method oxidizes the lignin macromolecule and produces a series of *p*-hydroxyphenyl (P), guaiacyl (G) and syringyl (S) compounds such as the aldehyde, carboxylic acid and methyl ketone derivatives. Comparison of the relative yields of P, G and S units provides an estimation of the various contributing plant types (Goñi and Hedges 1992; Hedges and Ertel 1982; Hedges and Mann 1979), since contrasting distribution of G- and S-type lignins are observed in gymnosperms and angiosperms. Gymnosperms mainly contain lignin units of the G-type, while angiosperms contain similar proportions of G- and S-type units and P-type units are frequent in gramineous plants (Harris and Hartley 1980). In the same way, with the results obtained after thermochemolysis, the proxy ratios of syringyl or *p*-hydroxyphenyl to guaiacyl (S/G and P/G respectively) can be used for discrimination between vegetation type origins (Clifford et al. 1995). Similar ratios could be introduced from the proportions of the monolignols liberated from the DFRC method.

In our study, S/G and P/G ratios were calculated as the sum of syringyl or *p*-hydroxyphenyl products over the sum of guaiacyl compounds for CuO oxidation and TMAH thermochemolysis. For the DFRC method, S/G and P/G ratios were calculated as the sum of

syringyl or *p*-hydroxyphenyl monolignols over the sum of guaiacyl monolignols. Results are summarized in Table 6.

	CuO oxidation		THM		DFRC method	
	S/G	P/G	S/G	P/G	S/G	P/G
Sandy acid forest soil	0.3	0.0	0.1	0.3	0.2	0.2
Peat	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.0
Low rank coal lignite	0.1	0.0	< 0.1	0.1	0.8	0.0

Table 6. S/G and P/G ratios.

Compound ratio source identification plot are given for the three samples analysed with CuO oxidation, TMAH thermochemolysis and DFRC methods in Figure 5. The regions representing compound ratios typical of the defined plant and tissue types are the traditional delineations used for CuO analysis.

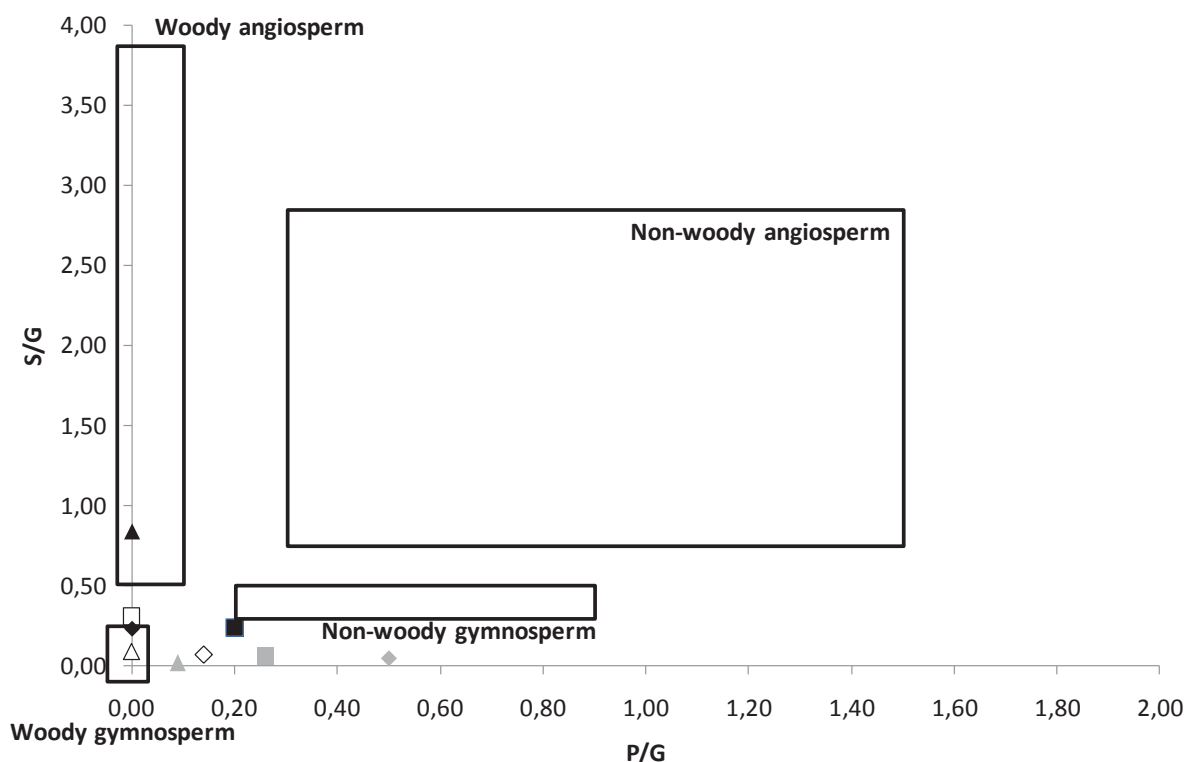


Figure 5. Compound ratio source identification plot for sandy acid forest soil (■), peat (◆), low rank coal lignite (▲) samples extracted with CuO oxidation (white), with TMAH thermochemolysis (gray) and with DFRC method (black)

With the three procedures, the S/G and P/G ratios, near to zero, confirm the gymnosperm origin of our three samples. Nevertheless, for the DFRC method, the S/G ratio of the low rank coal lignite is close to one and suggest an angiosperm input. This result is the

only one which is in accord with the real vegetation input. Thus, CuO oxidation and TMAH thermochemolysis seems to underestimate the S/G ratios and provide biased results. Such differences could be explained by the inherent differences in chemolytic mechanisms as previously explained. In particular, TMAH thermochemolysis could react on tannins and release monomers similar to the ligneous ones which could decrease the S/G ratio. In this way, the DFRC method appears as the most appropriate method to estimate the various contributing plant types.

## 5. Conclusion

Lignin analysis by CuO oxidation, tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and DFRC procedures were compared on a set of samples of soil and sediments. Lignin monomers obtained after CuO oxidation and TMAH thermochemolysis procedures were similar to those described in the literature. Compounds with guaiacyl units were predominantly identified while components with a syringyl or *p*-hydroxyphenyl structures were less abundant. The DFRC method released monolignols (*trans* coniferyl diacetate and *trans* sinapyl diacetate) that arose from  $\beta$ -ether cleavage and minor components with predominantly guaiacyl units originating from other structures. Total lignin yields  $\Lambda$ , S/G, P/G and Ad/Al ratios were calculated and compared for the three procedures. Differences could be explained by the mechanisms involved in each process: oxidation and hydrolysis with CuO, hydrolysis and methylation with TMAH and acetylation-bromination followed by reductive cleavage with zinc dust for the DFRC method. The DFRC method is the most specific one for analysing intact monolignols and seems to provide a relevant measure of the state of lignin degradation. Because the three methods do not react with the same lignin pools (differences could be due to chemical and/or physical arrangements), direct comparisons should be made carefully but could be viewed rather than complementary methods for a fine characterization of lignin in soils and sediments.

## References

- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546
- Clifford DJ, Carson DM, McKinney DE, Bortiatynski JM, Hatcher PG (1995) A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: Thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23(2): 169-175

- del Río JC, Gutiérrez A, Rodríguez IM, Ibarra D, Martínez ÁT (2007) Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 79(1-2): 39-46
- del Río JC, Rencoret J, Marques G, Gutiérrez A, Ibarra D, Santos JI, Jiménez-Barbero J, Zhang L, Martínez ÁT (2008) Highly acylated (acetylated and/or *p*-coumaroylated) native lignins from diverse herbaceous plants. *J. Agric. Food Chem.* 56(20): 9525-9534
- Ertel JR, Hedges JI (1985) Sources of sedimentary humic substances: Vascular plant debris. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49(10): 2097-2107
- Filley TR, Minard RD, Hatcher PG (1999) Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis: Proposed mechanisms based upon the application of <sup>13</sup>C-labeled TMAH to a synthetic model lignin dimer. *Org. Geochem.* 30(7): 607-621
- Filley TR, Nierop KGJ, Wang Y (2006) The contribution of polyhydroxyl aromatic compounds to tetramethylammonium hydroxide lignin-based proxies. *Org. Geochem.* 37(6): 711-727
- Goñi MA, Hedges JI (1992) Lignin dimers: Structures, distribution, and potential geochemical applications. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56(11): 4025-4043
- Grasset L, Amblès A (1998) Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47(1): 1-12
- Grasset L, Vlcková Z, Kucerík J, Amblès A (2010) Characterization of lignin monomers in low rank coal humic acids using the derivatization/reductive cleavage method. *Org. Geochem.* 41(9): 905-909
- Hänninen K (1992) Cupric oxide oxidation of peat and coal humic acids. *Sci. Tot. Environ.* 117-118: 75-82
- Harris PJ, Hartley RD (1980) Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons. *Biochem. Syst. Ecol.* 8(2): 153-160
- Hashimoto N, Aoyama T, Shioiri T (1981) New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 1475-1478
- Hatcher PG, Nanny MA, Minard RD, Dible SD, Carson DM (1995) Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: The CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 23(10): 881-888



- Hedges JI, Mann DC (1979) The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43(11): 1803-1807
- Hedges JI, Ertel JR (1982) Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Anal. Chem.* 54(2): 174-178
- Hedges JI, Blanchette RA, Weliky K, Devol AH (1988) Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52(11): 2717-2726
- Hu FS, Hedges JI, Gordon ES, Brubaker LB (1999) Lignin biomarkers and pollen in postglacial sediments of an Alaskan lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63(9): 1421-1430
- Hyötyläinen J, Knuutinen J, Vilén E (1995) Characterization of high molecular mass fractions of receiving waters and sediments of a pulp mill by CuO-oxidation and HPLC. *Chemosphere* 30(5): 891-906
- Ikeda T, Holtman K, Kadla JF, Chang H-M, Jameel H (2002) Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 50(1): 129-135
- Kiem R, Kögel-Knabner I (2003) Contribution of lignin and polysaccharides to the refractory carbon pool in C-depleted arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 35(1): 101-118
- Kuroda K-I (2000) Pyrolysis-trimethylsilylation analysis of lignin: Preferential formation of cinnamyl alcohol derivatives. *J. Anal. Applied Pyrol.* 56(1): 79-87
- Kuroda K-I, Nakagawa-izumi A, Dimmel DR (2002) Pyrolysis of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH): Products stemming from  $\beta$ -5 substructures. *J. Agric. Food Chem.* 50(12): 3396-3400
- Kuroda K-I, Nakagawa-izumi A (2005a) Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Behavior of 4-O-etherified cinnamyl alcohols and aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* 53(23): 8859-8865
- Kuroda K-I, Nakagawa-izumi A (2005b) Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis of guaiacyl-syringyl and guaiacyl dehydrogenation polymers. *Org. Geochem.* 36(1): 53-61
- Kuroda K-I, Nakagawa-izumi A (2006) Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Improvement of the distribution profile of products derived from  $\beta$ -aryl ether subunits. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 75(2): 104-111
- Kuroda K-I, Nakagawa-izumi A, Ashitani T, Fujita K (2009) Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of 2-arylcoumaran lignin model compounds. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 86(1): 185-191

- Loh PS, Reeves AD, Harvey SM, Overnell J, Miller AEJ (2008) The fate of terrestrial organic matter in two Scottish sea lochs. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76(3): 566-579
- Lu F, Ralph J (1997a) Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem.* 45(7): 2590-2592
- Lu F, Ralph J (1997b) DFRC method for lignin analysis. 1. New method for  $\beta$ -aryl ether cleavage: Lignin model studies. *J. Agric. Food Chem.* 45(12): 4655-4660
- Lu F, Ralph J (1998) The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignins. *J. Agric. Food Chem.* 46(2): 547-552
- Lu F, Ralph J (1999) Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins. *J. Agric. Food Chem.* 47(5): 1988-1992
- Marita JM, Ralph J, Hatfield RD, Guo D, Chen F, Dixon RA (2003) Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 62(1): 53-65
- Martín F, del Río JC, González-Vila FJ, Verdejo T (1995) Pyrolysis derivatization of humic substances 2. Pyrolysis of soil humic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 31: 75-83
- Miltner A, Emeis K-C (2001) Terrestrial organic matter in surface sediments of the Baltic Sea, Northwest Europe, as determined by CuO oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65(8): 1285-1299
- Nakagawa-izumi A, Kuroda K-I, Ozawa T (2004) Thermochemolytic behavior of  $\beta$ - $\beta$  lignin structures in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 35(6): 763-774
- Nierop KGJ, Filley TR (2007) Assessment of lignin and (poly-)phenol transformations in oak (*Quercus robur*) dominated soils by  $^{13}\text{C}$ -TMAH thermochemolysis. *Org. Geochem.* 38(4): 551-565
- Peng J, Lu F, Ralph J (1998) The DFRC method for lignin analysis. 4. Lignin dimers isolated from DFRC-degraded loblolly pine wood. *J. Agric. Food Chem.* 46(2): 553-560
- Spielvogel S, Prietzel J, Kögel-Knabner I (2007) Changes of lignin phenols and neutral sugars in different soil types of a high-elevation forest ecosystem 25 years after forest dieback. *Soil Biol. Biochem.* 39(2): 655-668

- Wysocki LA, Filley TR, Bianchi TS (2008) Comparison of two methods for the analysis of lignin in marine sediments: CuO oxidation versus tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis. *Org. Geochem.* 39(10): 1454-1461
- Yamauchi K, Fukushima K (2004) The regulation from guaiacyl to syringyl lignin in the differentiating xylem of *Robinia pseudoacacia*. *Comptes Rendus Biologies* 327(9-10): 791-797

## IV - CONCLUSION

L'application de la méthode DFRC à une tourbière ombrotrophe a permis de valider la capacité de cette méthode à donner des informations moléculaires originales sur la composition de la matière organique des sols et des sédiments. La rupture des liaisons  $\beta$ -aryl éthers permet l'analyse des monomères ligneux. L'"attaque" des motifs glycérol présents dans les biopolymères végétaux (acylglycérols, cutines, subérines, ...) permet l'analyse de fragments de lipides macromoléculaires. Ainsi, les lipides liés libérés par la méthode DFRC soulignent l'origine végétale de la tourbière de Frasne tandis que les composés aromatiques, principalement de type guaiacyl, sont en accord avec l'apport récent des gymnospermes présents sur la partie boisée de la tourbière (*Picea abies* et *Pinus uncinata*).

D'autre part, la comparaison des lipides simples avec les lipides liés libérés par la méthode DFRC a permis de montrer l'importance des composés lipidiques liés à la matrice macromoléculaire ou piégés au cœur de celle-ci.

Enfin, la comparaison de la méthode DFRC avec d'autres méthodes courantes d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments, l'oxydation alcaline en présence de CuO et la thermochimiolysse en présence de TMAH, a permis de montrer la complémentarité de ces trois méthodes d'analyse pour la caractérisation de la lignine dans les sols et les sédiments. L'étude de la teneur en monolignols, spécifique à la méthode DFRC, semble être d'intérêt pour suivre la dynamique de la lignine dans l'environnement.

La méthode DFRC apparaît donc comme une nouvelle technique innovante de dégradation chimique pour l'analyse des sols et des sédiments. Cependant, de nouveaux essais restent à réaliser de façon à optimiser les conditions opératoires (nouveaux solvants moins toxiques et moins polluants, nouvelles conditions de température permettant de réduire la durée des différentes étapes). Enfin, l'application de la méthode DFRC à l'analyse des lipides polaires complexes peut être envisagée et permettre par exemple l'analyse des chaînes aliphatiques liées aux motifs glycérol.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambler, A., Jambu, P., Jacquesy, J.-C., Parlanti, E., Secouet, B., 1993. Changes in the ketone portion of lipidic components during the decomposition of plant debris in a hydromorphic forest-podzol. *Soil Science* 156, 49-56.
- Baas, M., Pancost, R., van Geel, B., Sinninghe Damsté, J.S., 2000. A comparative study of lipids in *Sphagnum* species. *Organic Geochemistry* 31, 535-541.
- Bakar, N.A., Tay, K.S., Omar, N.Y.M.J., Abas, R.M.B., Simoneit, B.R.T., 2011. The geochemistry of aliphatic and polar organic tracers in sediments from Lake Bera, Malaysia. *Applied Geochemistry* 26, 1433-1445.
- Brooks, P.W., Maxwell, J.R., 1973. The origin and fate of lipids. In: Japan Trench in *Advances in Organic Geochemistry*. Technip, Paris.
- Cranwell, P.A., Eglinton, G., Robinson, N., 1987. Lipids of aquatic organisms as potential contributors to lacustrine sediments-II. *Organic Geochemistry* 11, 513-527.
- Dickson, L., Bull, I.D., Gates, P.J., Evershed, R.P., 2009. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fatty acids from glycolipid and phospholipid fractions. *Journal of Microbiological Methods* 78, 249-254.
- Eglinton, G., Hamilton, R.J., 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156, 1322-1335.
- Ficken, K.J., Barber, K.E., Eglinton, G., 1998. Lipid biomarker,  $\delta^{13}\text{C}$  and plant macrofossil stratigraphy of a Scottish montane peat bog over the last two millennia. *Organic Geochemistry* 28, 217-237.
- Jetter, R., Riederer, M., 2000. Composition of cuticular waxes on *Osmunda regalis* fronds. *Journal of Chemical Ecology* 26, 399-412.
- Killops, S., Killops, V., 2005. *Introduction to organic geochemistry*, Second Edition. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Kolattukudy, P.E., Croteau, R., Buckner, J.S., 1976. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam.
- Kolattukudy, P.E., 1980. Cutin, suberin and waxes. In: P.K, S. (Ed.). *The biochemistry of plant lipids structure and function*. Academic Press, New York, pp. 571-645.
- Lehtonen, K., Ketola, M., 1993. Solvent-extractable lipids of *Sphagnum*, *Carex*, *Bryales* and *Carex-Bryales* peats: Content and compositional features vs peat humification. *Organic Geochemistry* 20, 363-380.

- Meyers, P.A., Ishiwatari, R., 1993. Lacustrine organic geochemistry-an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organic Geochemistry* 20, 867-900.
- Otto, A., Simoneit, B.R.T., 2001. Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 3505-3527.
- Rontani, J.-F., Cuny, P., Grossi, V., 1996. Photodegradation of chlorophyll phytyl chain in senescent leaves of higher plants. *Phytochemistry* 42, 347-351.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.

**CHAPITRE IV : APPLICATION DE LA  
THERMOCHIMIOLYSE PREPARATIVE A LA  
MATIERE ORGANIQUE D'UNE TOURBIERE  
OMBROTROPHE**





La thermochemiolyse, utilisee en presence d'agents alkylants ou silylants, est une technique de degradation thermique couramment utilisee pour l'analyse de la matiere organique des sols.

Ici, differents agents de derivation ont ete employes pour analyser un echantillon de tourbe prealablement delipidifie : l'hydroxyde de tetramethylammonium (TMAH) a 400 °C, l'acetate de tetraethylammonium (TEAAc) a 400 °C, le bromure de tetramethylammonium (TMABr) a 400 °C, l'hydroxyde de trimethylsulfonium (TMSH) a 300 et 400 °C, l'hexamethyldisilazane (HMDS) a 300, 350 et 400 °C, le 4,4-dimethyloxazoline a 400 °C et le L-alaninol a 300 et 400 °C. De la meme facon, differentes combinaisons *multi-shot* ont ete testees telles que : (i) HMDS a 300 °C puis TMAH a 400 °C, (ii) TMSH a 300 °C puis TMAH a 400 °C et (iii) HMDS a 300 °C, TMSH a 300 °C puis TMAH a 400 °C.

Dans ce chapitre, seront uniquement presentes : (i) les resultats de l'analyse des sucres libres et de la cellulose de la tourbiere ombrotrophe de Frasne par thermochemiolyse en presence de TMAH, et (ii) les resultats d'une sequence de thermochemiolyse *double-shot*, appliquee a la fraction delipidifiee et aux substances humiques correspondantes d'une tourbe ombrotrophe, impliquant deux thermochemiolysees successives : la premiere en presence de HMDS a 300 °C puis la seconde en presence de TMAH a 400 °C.

## **I - ANALYSE ET QUANTIFICATION DE LA CELLULOSE ET DES SUCRES LIBRES D'UNE TOURBIERE PAR THERMOCHIMIOLYSE EN PRESENCE D'HYDROXYDE DE TETRAMETHYLAMMONIUM**

Cette partie correspond a un article publie dans la revue "Journal of Analytical and Applied Pyrolysis". Elle a pour but d'apprécier dans quelle mesure la thermochemiolyse en presence d'hydroxyde de tetramethylammonium (TMAH) permet d'analyser et de quantifier la cellulose et les sucres libres presents dans les 50 premiers centimetres d'une tourbiere ombrotrophe. En effet, le TMAH est l'agent de derivation le plus utilise en thermochemiolyse et permet l'analyse de composés complexes. Pour les sols et les sediments, la thermochemiolyse en presence de TMAH fournit simultanément un nombre important d'informations sur divers marqueurs : lipides, lignines, tannins, proteines et sucres. De plus, de par sa capacite a rompre les liaisons ethers et esters, elle permet l'analyse de composés piègés dans le reseau macromoleculaire. Cependant, compte tenu de sa faible sensibilite vis-à-

vis des sucres, peu d'études s'intéressent à l'identification de ces composés dans les sols et les sédiments.

La thermochemiolyse en présence de TMAH de monosaccharides produit, entre autres, des esters méthyliques d'acides 3-déoxyaldoniques provenant de l'isomérisation de la position C-2 et de la déshydratation de la position C-3. Ces produits conservent leurs configurations originales en positions C-4 et C-5. Ainsi, les aldohexoses (glucose, mannose et allose) conduisent à la formation de produits identiques mais qui diffèrent de ceux obtenus pour leurs épimères en position C-4 (galactose, gulose et idose). De la même façon, les aldopentoses (xylose, arabinose, ribose et lyxose) conduisent aux mêmes esters méthyliques d'acides sacchariniques alors que les 6-déoxyhexoses, le fucose et le rhamnose (épimère en C-4 du fucose) conduisent à des esters méthyliques d'acides sacchariniques différents. Les formes méthylés de ces composés sacchariniques montrent le même pic de base à  $m/z = 129$  en spectrométrie de masse. De plus, bien que leurs spectres de masse ne présentent pas de différences significatives, ils montrent des comportements différents en chromatographie gazeuse (temps de rétention différents). Quant à la thermochemiolyse en présence de TMAH de la cellulose, elle entraîne la formation d'une paire spécifique d'épimères d'acides isosacchariniques méthylés produisant des ions spécifiques en spectrométrie de masse ( $m/z = 173$  en particulier). Ainsi, les suivis de masse pour  $m/z = 129$  et pour  $m/z = 173$  permettent la détection des monosaccharides et de la cellulose par thermochemiolyse en présence de TMAH dans des matériaux complexes.

L'étude porte sur une colonne de tourbe de 50 cm. Six niveaux ont été analysés : (i) deux collectés dans la partie supérieure aérobie de la tourbière (acrotelme), (ii) deux collectés dans la zone de battement des eaux (mésotelme) et (iii) deux collectés dans la partie anaérobie (catotelme). Les résultats obtenus par thermochemiolyse en présence de TMAH sont comparés à ceux obtenus par hydrolyse acide, méthode classique d'analyse des sucres dans les sols et les sédiments.

L'analyse des sucres par hydrolyse acide a mis en évidence des teneurs constantes en sucres hémicellulosiques dans les 20 premiers centimètres. Par contre, l'analyse de la variation de la teneur en sucres celluloses, sucres structuraux des tissus végétaux, en fonction de la profondeur montre qu'ils sont une première cible de dégradation.

De par leur diversité et leur abondance, les sucres sont potentiellement de bons indicateurs moléculaires de la matière organique des sols. Ils peuvent notamment permettre l'étude des changements de communautés végétales ayant colonisé la tourbière. Ainsi, avec le

temps, il apparait que la contribution des sphaignes tend a decroitre tandis que celle des *carex* augmente.

La thermochemiolyse en presence de TMAH revele une diminution des sucres libres et de la cellulose avec la profondeur dans l'acrotelme liee aux processus de decomposition puis une augmentation dans le catotelme due aux changements de vegetation et/ou aux processus d'humification. Ces resultats, differents de ceux obtenus pour l'hydrolyse acide, sont dus aux differents mecanismes impliquees dans chaque procede analytique : (i) la thermochemiolyse en presence de TMAH ne permet que l'analyse specifique des sucres libres ou terminaux alors que l'hydrolyse acide permet d'analyser tous les types de sucres (hemicellulosiques et celluloses), et (ii) de par sa capacite a rompre les liaisons ester et ether, la thermochemiolyse en presence de TMAH permet d'analyser les sucres celluloses pieges dans le reseau macromoleculaire.

Bien que l'analyse des sucres hemicellulosiques et la distinction de chaque monosaccharide ne soient pas possibles lors de la thermochemiolyse en presence de TMAH, elle permet cependant l'analyse d'un *pool* de cellulose non atteint par l'hydrolyse acide et l'analyse specifique des sucres libres et terminaux. Compte tenu des differents mecanismes impliquees dans chaque procede, la thermochemiolyse en presence de TMAH doit plutot etre consideree, et utilisee, comme une methode complementaire a l'hydrolyse acide pour l'analyse des sucres.

## Tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis for the analysis and quantification of cellulose and free carbohydrates in a peatbog

Céline Estournel-Pelardy<sup>(a)</sup>, Frédéric Delarue<sup>(b)</sup>, Laurent Grasset<sup>\*(a)</sup>, Fatima Laggoun-Défarge<sup>(b)</sup>, André Amblès<sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> Université de Poitiers, SRSN, UMR-CNRS 6514, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers Cedex, France

<sup>(b)</sup> Université d'Orléans, Université François Rabelais – Tours, CNRS/INSU. Institut des Sciences de la Terre d'Orléans – UMR 6113. Campus Géosciences. 1A rue de la Férellerie, 45071 Orléans cedex 2, France

### Corresponding author:

Tel.: +33 5 49 45 37 59

Fax: +33 5 49 45 35 01

E-mail address: laurent.grasset@univ-poitiers.fr (L. Grasset)

### **Abstract**

We have compared TMAH thermochemolysis with the classical method using acid hydrolysis for carbohydrates analysis in a peat core. Even if TMAH thermochemolysis does not analyse hemicellulosic carbohydrates and discriminate each individual carbohydrate *sensu stricto*, it allows the analysis of a cellulose pool hidden to acid hydrolysis and the specific analysis of free and terminal carbohydrates. Simple direct comparisons of thermochemolysis data with data generated from acid hydrolysis cannot be done because of the different mechanisms involved in each process. TMAH thermochemolysis must be viewed and used as a pertinent and complementary method for the analysis of carbohydrates protected and trapped by the organic matter in complex environmental systems.

### **1. Introduction**

Because of their ubiquity and abundance, carbohydrates are potentially useful compounds in elucidating sources, processes and pathways of biologically important organic materials in natural environments.

Acid hydrolysis is currently used to liberate carbohydrates from soils. It involves acid hydrolysis and purification before their analysis by liquid chromatography or by gas chromatography after derivatization. Recommended procedures either use H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1-6], HCl [1, 6-8] or TFA [1, 9-10] to cleave glycosidic bonds of polysaccharides yielding sugar monomers. These methods can be applied to a wide range of soil samples and are easy to perform but yet time-consuming.

Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) is the most common reagent used for thermochemolysis (more than 90% of published thermochemolysis applications have used TMAH [11]). It is used for the analysis of complex and intractable samples such as soils and sediments. For that kind of samples, TMAH thermochemolysis provides useful information simultaneously on a wide range of compounds related to lipids, lignins, tannins, proteins and carbohydrates markers. Due to its capability to cleave common ester and ether bonds and to methylate acidic functional groups, TMAH thermochemolysis allows also the analyses of compounds entrapped in macromolecular network [12].

However, few studies have identified these products in soil samples [13-14]. It could be partly due to the relative poor sensitivity of TMAH thermochemolysis to carbohydrates both at high temperature (up to 600°C) [15-16] or with extended reaction time (250°C during 30 min in sealed tube) [17].

On the other hand, several studies have shown that TMAH thermochemolysis of individual sugars releases, beside products formed by recombination of previously cleaved fragments, 3-deoxyaldonic acids methyl esters resulting from the isomerisation of the C-2 position and dehydration of the C-3 position. These products have conserved their original conformation at the C-4 and C-5 positions [13, 18-19]. As a consequence, aldohexoses such as glucose, mannose and allose give identical 3-deoxyaldonic acids methyl esters but different ones from their C-4 epimers (i.e. galactose, gulose and idose). In the same way, the 6-deoxyhexoses, fucose and rhamnose (the C-4 epimer of fucose), give different saccharinic acids methyl esters. For the same reason, aldopentoses (xylose, arabinose, ribose and lyxose) give the same saccharinic acid methyl esters (Fig. 1). The methylated forms of these saccharinic products have mass spectra with  $m/z$  129 as base peak (for the interpretation of the electron impact MS fragmentation of permethylated saccharinic acids see Fabbri and Helleur (1999) [13] and Bleton et al. (1996) [20]). Furthermore, although their mass spectra present no evident differences, they present different chromatographic behaviour with different retention times in gas chromatography. Moreover, TMAH thermochemolysis of cellulose produces a specific epimeric pair of methylated isosaccharinic acids producing specific ions

in EI mass spectroscopy (i.e.  $m/z$  173) [13]. Then, to detect monosaccharides and glycosidic units from cellulose with TMAH thermochemolysis, single ion monitoring at  $m/z$  129 and 173 can be used to reveal their presence in complex materials.

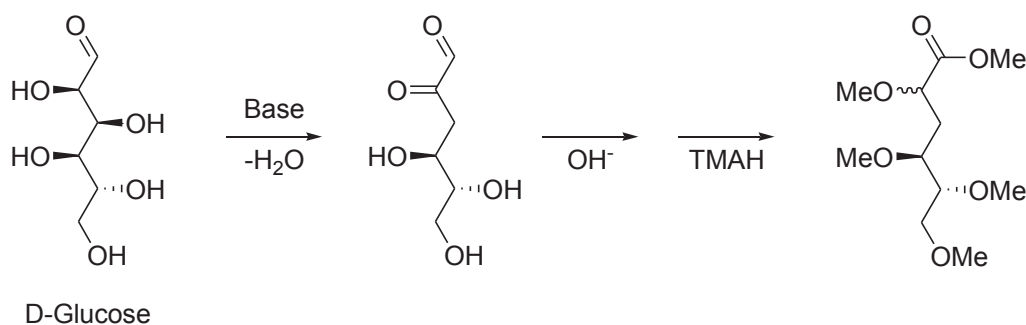


Fig. 1. Mechanism proposed by Fabbri and Helleur (1999) [13] of the formation of methylated saccharinic acids from the TMAH thermochemolysis of glucose.

Soil organic matter is composed of more or less altered and inherited biochemical compounds such as hemicellulose, cellulose and microbial sugars (i.e. mainly exopolysaccharides). Depending on organic matter sources and degradation, carbohydrate monomers exhibit distinctive composition patterns. Ombrotrophic peat bogs are covered mainly by *Sphagnum spp.* with *Eriophorum* as the dominant vascular species. *Cyperaceae* are rich in xylose (one of the most abundant aldopentoses in living kingdom) [8, 21] as well as in arabinose [22-24]. Conversely, galactose, mannose and rhamnose are adequate indicators for mosses, in particular *Sphagnum spp.* [22, 25]. In addition, fucose could be considered as a microbial marker in peat bogs [22].

At 400°C, a recent study has shown that the identification of carbohydrates derivatives in soil samples is possible with TMAH thermochemolysis [14]. In addition, TMAH thermochemolysis can be applied to precise and large quantities of material (up to 1 g) since an off-line preparative technique was developed [12].

Samples collected at different depths of a peat core were submitted to TMAH thermochemolysis.

Under the same thermochemolysis conditions, cellulose and the most abundant monosaccharides encountered in peat bog were submitted to thermochemolysis allowing their assignment among the peat samples products based both on the mass spectra and on the retention times in gas chromatography of their thermochemolysis derivatives. Despite unavoidable matrix effects, this off-line preparative thermochemolysis also allows a semi-quantification of thermochemolysis products when known quantities of standards were analysed in the same conditions than the studied complex samples.

Results were compared with those obtained using a classical method for carbohydrates analyses (acid hydrolysis with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) to have insight on the capability of TMAH thermochemolysis for the carbohydrate analyses in soils and sediments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Aldopentoses (D-xylose, L-arabinose, D-ribose), aldohexoses (D-glucose, D-mannose, D-galactose), deoxyhexoses (L-rhamnose, L-fucose), cellulose, deoxy-6-glucose, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, LiClO<sub>4</sub> and TMAH were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA) and BSTFA+TMCS (99:1) from Supelco (Bellefonte, USA).

### 2.2. Peat samples

Samples were collected in June 2008 at the open bog part of an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire in the Jura Mountains (Le Forbonnet peatland, France), which has been described in detail [26]. The site is protected by the EU Habitat Directive of Natura 2000 and has been classified as a Region Natural Reserve for more than 20 yr. Annual precipitation is about 1300-1500 mm per year, with a mean annual air temperature of 7-8 °C. Samples were collected at different depths: (i) two samples were collected in the upper oxalic part (acrotelm), (ii) two in the water table zone (mesotelm) and (iii) two in the anoxic part (catotelm) (Fig. 2). They were air dried (40 °C), finely ground and stored at -20 °C before further analysis.

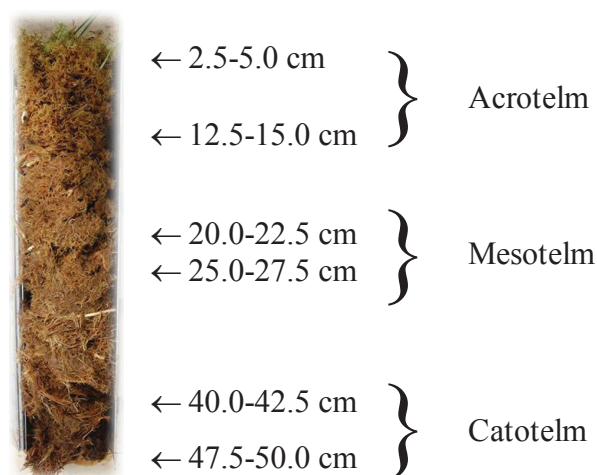


Fig. 2. Peat core and depths of sampling

### 2.3. Carbohydrates analysis by hot water extraction and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysis

The detailed H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysis method has been described elsewhere [22]. The analysis is carried out in two experiments. The first operating procedure for total sugar analysis can be summarized as follows: 1 ml of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12 M) was added to 20 to 30 mg of dry peat in a Pyrex<sup>®</sup> test tube. After 16 h at room temperature, the samples were diluted with 9 ml of H<sub>2</sub>O to a 1.2 M concentration in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The tube was tightly closed under vacuum and heated at 100 °C for 4 h. After cooling, deoxy-6-glucose (0.4 mg.ml<sup>-1</sup> in water) was added as internal standard [21]. The sample was subsequently neutralised with CaCO<sub>3</sub>. The precipitate was removed by centrifugation and the supernatant evaporated to dryness. The sugars were then dissolved in CH<sub>3</sub>OH and the solution purified by centrifugation. After transferring the solution to another vessel, the solvent was evaporated under vacuum. The sugars were dissolved in pyridine containing 1% (v/v) of LiClO<sub>4</sub> and left 16 h at 60 °C for anomer equilibration [27]. In both cases, they were silylated by BSTFA+TMCS (99:1) and analysed using a Perkin–Elmer AutoSystem XL GC (split injector, 240 °C; flame ionization detector (FID), 300 °C) with a fused silica capillary column (CPSil5CB, 25 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and helium as carrier gas. The GC was temperature programmed from 60 to 120 °C at 30 °C.min<sup>-1</sup> (isothermal for 1 min) and raised to 240 °C at 5 °C.min<sup>-1</sup> and finally at 20 °C.min<sup>-1</sup> to 310 °C and maintained at that temperature for 10 min.

The second, consisting of the same procedure without H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12 M) treatment, yielded only hemicellulose and free monomers. Consequently, the cellulose content was calculated by subtraction of the results obtained for the first experiment from those obtained for the second one.

A mixture of ten monosaccharides (ribose, arabinose, xylose, rhamnose, fucose, glucose, mannose and galactose, lyxose and allose) was used as external standard for compound identification through peak retention times and for individual response coefficient determination. Analyses gave an analytical precision between 10 to 15% [22].

### 2.4. Carbohydrate analysis by preparative thermochemolysis

Each monosaccharide standard and cellulose (10 mg) was placed in a ceramic boat after one hour moistening with 2 ml of a 50% (w/w) aqueous solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). Each sample was transferred in a Pyrex<sup>®</sup> tube (70 cm length, 3 cm i.d.) and heated at 400 °C (30 min isothermal period) in a tubular furnace. Thermochemolysis products were swept by nitrogen (flow rate: 100 ml.min<sup>-1</sup>) to a trap



containing dichloromethane. After partial evaporation of the solvent under reduce pressure, trapped pyrolysates were analysed by GC-MS using a Trace GC Thermo Finnigan (split injector, 250 °C; FID, 300 °C) with a fused silica capillary column (Supelco Equity 5%, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and helium as carrier gas. The oven was initially kept at 60 °C for 1 min, next it was heated at a rate of 5 °C/min to 300 °C and maintained at that temperature for 15 min. The column was coupled to a Finnigan Trace MS quadrupole mass spectrometer (ionization energy 70 eV, mass range  $m/z$  45–600, cycle time 1 s). Peak integration for the permethylated deoxy aldonic acids was performed in the extracted ion chromatogram at  $m/z$  129 and at  $m/z$  173 for those from cellulose. Thermochemolysis conditions for the analysis of carbohydrates in peat samples (90 mg) are identical as above. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards) and literature data. Semi-quantification was achieved by comparison of the peak area of a chosen permethylated isosaccharinic acid product specific to a type of carbohydrate with the peak area of the same permethylated isosaccharinic acids obtained after TMAH thermochemolysis of model compounds. Fig. 3 shows the extracted ion chromatograms at  $m/z$  129 for an aldohexose (glucose), an aldopentose (xylose) and a 6-deoxyhexoses (fucose). With the same approach, the abundance of cellulose was estimated following the mass fragment  $m/z$  173 response for each peat sample.

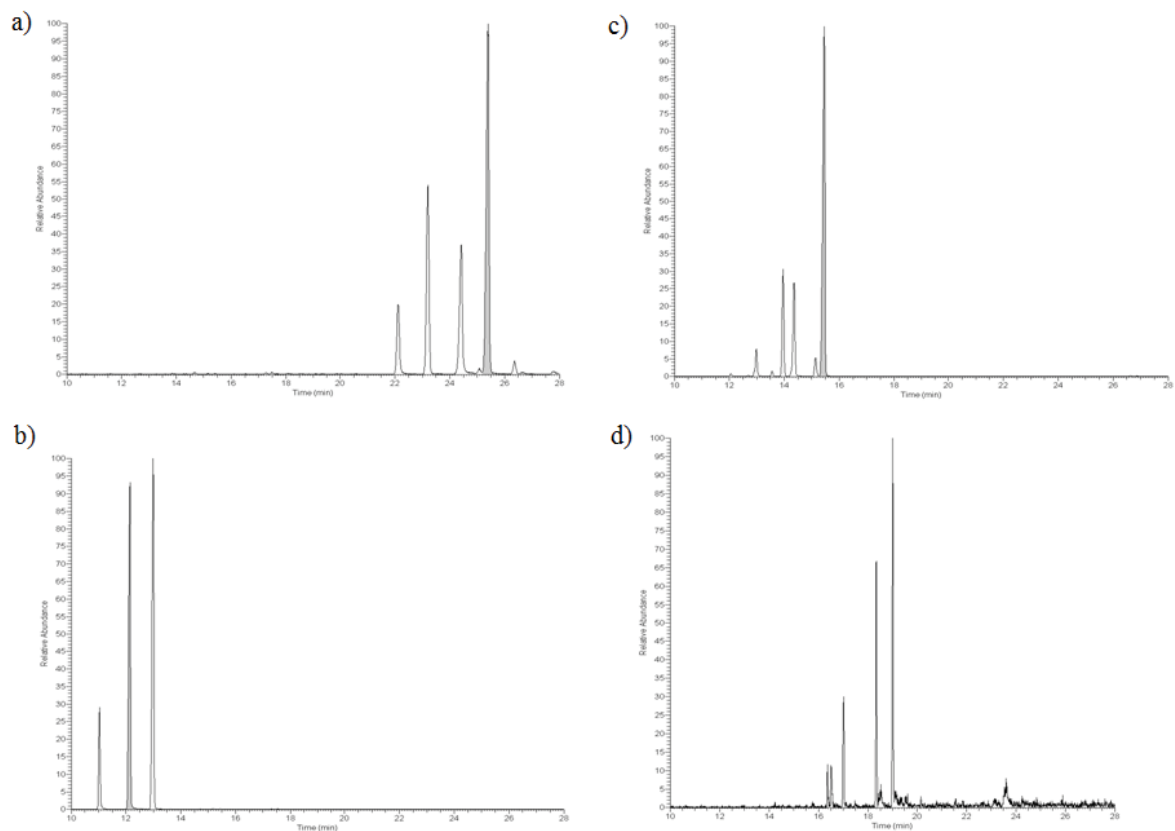


Fig. 3. Extracted Ion Chromatograms at  $m/z$  129 of permethylated saccharinic acids obtained after TMAH thermochemolysis of glucose (a), xylose (b) and fucose (c) and at  $m/z$  173 of permethylated saccharinic acids obtained after TMAH thermochemolysis of cellulose (d).

Peaks in gray are peaks corresponding to permethylated saccharinic acids used for quantification.

### 3. Results

Fig. 4 presents the depth distributions of carbohydrate concentrations within the peat core released both by hydrolysis with  $H_2SO_4$  and TMAH thermochemolysis.

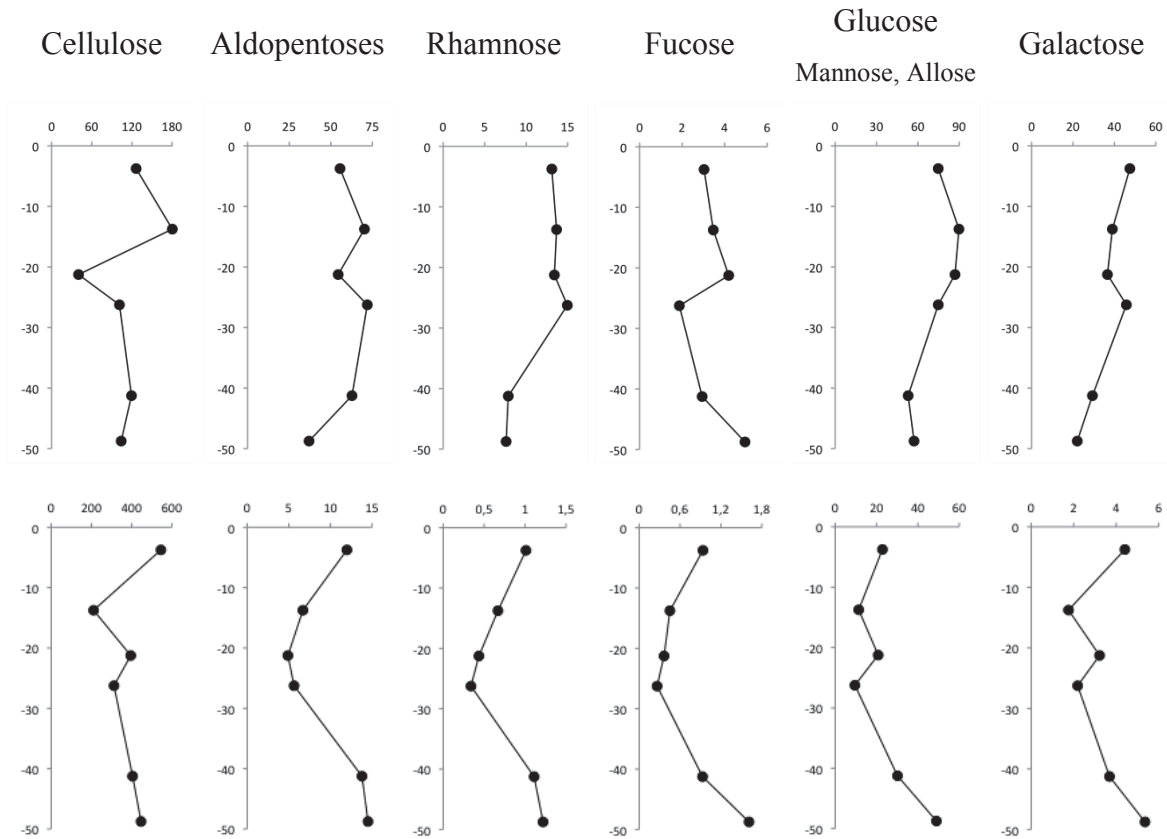


Fig. 4. Depth distributions of carbohydrate concentrations within the peat core released after  $H_2SO_4$  hydrolysis (up) and TMAH thermochemolysis (down) (in  $mg/g$  of dry sample).

### 3.1. $H_2SO_4$ hydrolysis

The highest concentration of galactose is in the upper part of the acrotelm ( $47 mg.g^{-1}$ ). Its concentration shows a distinct decrease in the water table zone (around 20 cm) ( $37 mg.g^{-1}$ ) before the concentrations increase to  $46 mg.g^{-1}$  at 30 cm before decreasing again to  $22 mg.g^{-1}$  in the remaining part of the core. Gulose was not detected.

As for galactose, the concentration of glucose, mannose and allose are higher in the acro- and mesotelm and lower in the catotelm. In the uppermost subsurface layer, concentration was  $74 mg.g^{-1}$  and increased to  $88 mg.g^{-1}$  at 15 cm, then regularly decreased to around  $55 mg.g^{-1}$  at 50 cm.

The concentration of fucose shows a slight increase between the subsurface and the upper part of the mesotelm with values around ca.  $4.2 mg.g^{-1}$ , before the concentration decreases to around  $2 mg.g^{-1}$  at the upper part of the catotelm. Finally an increase to  $5 mg.g^{-1}$  was observed in the deepest part of the core. The concentration of rhamnose shows relatively constant values of 12–14  $mg.g^{-1}$  in the acrotelm and mesotelm before decreasing to  $7 mg.g^{-1}$  in the catotelm.

The aldopentoses (mainly xylose and arabinose) content slightly increases from the subsurface (55 mg.g<sup>-1</sup>) to the end of the acrotelm (70 mg.g<sup>-1</sup>) before decreasing in the mesotelm (54 mg.g<sup>-1</sup>) and then decreasing with depth (from 72 to 37 mg.g<sup>-1</sup>) in the lower anoxic part.

Cellulose concentration increases through the acrotelm (from 124 to 161 mg.g<sup>-1</sup>) before strongly decreasing in the uppermost mesotelm to 66 mg.g<sup>-1</sup> and dropping to relatively constant values around 105 mg.g<sup>-1</sup> in the catotelm.

### 3.2. TMAH thermochemolysis

After TMAH thermochemolysis, series of permethylated deoxy aldonic acids were identified in the six peat samples. In all samples, the main permethylated deoxy aldonic acids observed arose from cellulose and from free forms of glucose (and mannose/allose). Free forms of aldopentoses, 6-deoxyhexoses and galactose (with gulose and idose) were detected in lower amounts (Fig. 4).

In the acrotelm (0 to 20 cm), all the permethylated deoxy aldonic acids products of free carbohydrates decrease with depth (from 12.0 to 6.7 mg.g<sup>-1</sup> for aldopentoses, from 22.8 to 11.4 mg.g<sup>-1</sup> for glucose, mannose and allose, from 4.4 to 1.8 mg.g<sup>-1</sup> for galactose, from 1.0 to 0.7 mg.g<sup>-1</sup> for rhamnose and from 0.9 to 0.5 mg.g<sup>-1</sup> for fucose). Cellulose concentration decreases also with depth from 546 to 211 mg.g<sup>-1</sup>.

Through the mesotelm, the concentration of aldopentoses, rhamnose and fucose continues to decrease to values around 5.0, 0.4 and 0.3 mg.g<sup>-1</sup> respectively. Glucose (with mannose and allose), galactose and cellulose concentrations drop in the uppermost mesotelm and decrease again (from 20.8 to 9.5, from 3.2 to 2.2 and from 396 to 312 mg.g<sup>-1</sup> respectively).

All the concentrations of free carbohydrates show a distinct increase in the deepest part of the peat core (the catotelm) to values higher than in the upper part of the acrotelm. The concentration of cellulose increases in lower proportion up to ca. 447 mg.g<sup>-1</sup> (Fig. 4).

## 4. Discussion

Acid hydrolysis carbohydrates showed high amounts in agreement with previous works [22]. Amounts of carbohydrates, and especially of hemicellulose sugars content, are almost constant in the first 20 cm denoting a high preservation of these biopolymers (Fig. 4). With depth, the substantial variations in cellulose sugars, that are the structural sugars of plant tissues, reflect that this polymer is a prime target of degradation.

Carbohydrates monomers could also be used to infer vegetation communities changes. As an example, some sugars such as galactose and rhamnose are considered as mosses indicators [22, 25] whereas arabinose and xylose (aldopentoses) are considered as sedges indicators [8, 21-24]. Therefore, carbohydrates patterns with depth tended to indicate a decrease of mosses contribution and therefore, an enhanced sedges contribution to organic matter inputs with increasing age.

Similar distribution was not apparent for the TMAH results. With thermochemolysis, amounts of all the analysed free carbohydrate types and cellulose decrease with depth in the acrotelm before increasing in the catotelm. Poor agreement between the two methods occurs because of inherent differences in chemolytic mechanisms, which resulted in bias in detection of carbohydrates pools. Specifically, whereas the acid hydrolysis method is a classical way for the analysis of almost all types of carbohydrates, the TMAH thermochemolysis allows the specific analyses of free (or terminal) carbohydrates. As a consequence, amounts of non-cellulosic carbohydrates obtained by TMAH thermochemolysis are lower than those obtained by the acid hydrolysis method.

Contrary to acid hydrolysis, TMAH thermochemolysis is able to cleave common ester and ether bonds and to methylate acidic functional groups. Hydrolysable ester and labile ether bonds are present in acid-insoluble substances such as biopolymers (i.e. lignin, cutins, waxes or tannins) and products formed during decomposition (i.e. humic substances) [28-29]. Because of the capability of TMAH thermochemolysis to cleave macromolecular structures (i.e. cleavage of  $\beta$ -O-4 bonds in lignin [30-32]), it allows the analyses of compounds entrapped in macromolecular network [12]. It results in the possible recovery of entrapped carbohydrates and consequently in a greater cellulosic carbohydrates yield than for acid hydrolysis.

In the oxic acrotelm, free carbohydrates and cellulose decreased. This might be link with decomposition dynamic occurring in the oxic acrotelm. With depth, organic matter was more decomposed. Therefore, deeper peat layers present lower yields of decomposable organic matter than in the upper part where fresh plant inputs occurred. In the oxic acrotelm, TMAH thermochemolysis of carbohydrates might thus reflected a decrease of decomposability potential of organic matter with depth. Below the oxic acrotelm, the mesotelm is considered as the compartment where water-level changes [33] and were peat decomposition might be enhanced [34]. At this depth, cellulose, glucose and galactose presented enhanced amounts at ca. 20 cm depth. Therefore, TMAH thermochemolysis of carbohydrates might reflect this enhanced decomposition dynamic of the mesotelm by the

way of an increased of available free carbohydrates and cellulose amounts under microbial activity. Finally in the lower anoxic part, i.e. the catotelm, simple carbohydrates and cellulose amounts increased. The catotelm is considered as the deeper peat compartment characterised by low decomposition processes and by the accumulation of refractory compounds. Among these refractory biopolymers, lignin forms a resistant shield around cellulose to form lignocellulose in plant cell walls [35-36]. As also suggested by the acid analysis of sugars, the increase with depth of cellulose analysed by TMAH thermochemolysis could indicate therefore a greater contribution from vascular plants (i.e. *Eriophorum spp.*) with increasing age. Peatland evolution involves a number of dynamic stages characterised by specific plant communities, changing from a fen characterised by the predominance of *Cyperaceae spp.* to a raised bog with vegetation dominated by *Sphagnum spp.* communities [37]. Our results could thus document this typical change in peatland evolution (from sedges in the bottom to *Sphagnum spp.* in the top).

On the other hand, a micro-morphological characterisation of the same peat core [38] has shown that the relative abundance of well-preserved tissues decreased with increasing depth (from 66 to 11%) while mucilage contents (partly derived from *in situ* microbial syntheses [39] increased (from 7 to 30%). In addition, the relative amounts of the acid-insoluble organic matters increase gradually as the decomposition proceeds [40]. Therefore, the increased amounts of refractory neosynthetic organic compounds (the so-called humic substances) with depth could be another way to explain the enhanced amount of carbohydrates obtained by TMAH thermochemolysis in the catotelm. In such a case, refractory neosynthetic organic compounds might act as a trap for carbohydrates. Because of the lack of complementary information, we can not argue if the enhanced carbohydrates amounts were due to past vegetation changes and/or to past humification processes. Combined with other analyses, TMAH thermochemolysis of carbohydrates might be considered as a useful tool to provide information about recent organic matter decomposition but also on past depositional environments.

## 5. Conclusion

When compared with the widely used acid hydrolysis developed for carbohydrates analysis, the application of TMAH thermochemolysis to our sediment samples did not analyse hemicellulosic carbohydrates and discriminate each individual carbohydrates. However, TMAH thermochemolysis allows the analysis of a cellulose pool hidden to acid hydrolysis and the specific analysis of free and terminal carbohydrates. As a consequence, we caution

against making simple direct comparisons of thermochemolysis data with data generated from acid hydrolysis because of the different mechanisms involved in each process. Nevertheless, and because of their differences, they would be viewed and used as pertinent complementary methods for the analysis of carbohydrates in complex environmental systems.

## References

- [1] W. Amelung, M.V. Cheshire, G. Guggenberger, Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis, *Soil Biol. Biochem.* 28 (1996) 1631-1639.
- [2] J.E. Modzeleski, W.A. Laurie, B. Nagy, Carbohydrates from Santa Barbara Basin sediments: gas chromatographic mass spectrometric analysis of trimethylsilyl derivatives, *Geochim. Cosmochim. Acta* 35 (1971) 825-838.
- [3] G.L. Cowie, J.I. Hedges, Carbohydrate sources in a coastal marine environment, *Geochim. Cosmochim. Acta* 48 (1984) 2075-2087.
- [4] S. Hu, D.C. Coleman, M.H. Beare, P.F. Hendrix, Soil carbohydrates in aggrading and degrading agroecosystems: influences of fungi and aggregates, *Agric. Ecosyst. Environ.* 54 (1995) 77-88.
- [5] N. Koivula, K. Hänninen, Concentrations of monosaccharides in humic substances in the early stages of humification, *Chemosphere* 44 (2001) 271-279.
- [6] P. Rovira, V.R. Vallejo, Labile, recalcitrant, and inert organic matter in Mediterranean forest soils, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 202-215.
- [7] S. Ogier, J.-R. Disnar, P. Albéric, G. Bourdier, Neutral carbohydrate geochemistry of particulate material (trap and core sediments) in an eutrophic lake (Aydat, France), *Org. Geochem.* 32 (2001) 151-162.
- [8] S. Bourdon, F. Laggoun-Défarge, J.-R. Disnar, O. Maman, B. Guillet, S. Derenne, C. Largeau, Organic matter sources and early diagenetic degradation in a tropical peaty marsh (Tritivakely, Madagascar), *Org. Geochem.* 31 (2000) 421-438.
- [9] C. Rumpel, M.-F. Dignac, Chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction-acetylation, *Soil Biol. Biochem.* 38 (2006) 1478-1481.
- [10] S. Spielvogel, J. Prietzel, I. Kögel-Knabner, Changes of lignin phenol and neutral sugar pools in different soil types of a high-elevation forest ecosystem 25 years after forest dieback, *Soil Biol. Biochem.* 39 (2007) 655-668.

- [11] F. Shadkami, R. Helleur, Recent applications in analytical thermochemolysis, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 89 (2010) 2-16.
- [12] L. Grasset, A. Amblès, Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47 (1998) 1-12.
- [13] D. Fabbri, R. Helleur, Characterisation of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 49 (1999) 277-293.
- [14] L. Grasset, P. Rovira, A. Amblès, TMAH-preparative thermochemolysis for the characterization of organic matter in densimetric fractions of a Mediterranean forest soil, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1-2 (2009) 435-441.
- [15] D.J. Clifford, D.M. Carson, D.E. McKinney, M. Bortiatynski, P.G. Hatcher, A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), *Org. Geochem.* 23 (1995) 169-175.
- [16] A. Gauthier, S. Derenne, C. Largeau, L. Dupont, E. Guillon, J. Dumonceau, M. Aplincourt, Comparative study of ligno-cellulosic material from wheat straw and of pure and mixed standard compounds via solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, conventional pyrolysis and TMAH thermochemolysis, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 67 (2003) 277-293.
- [17] B. Chefetz, Y. Chen, C.E. Clapp, P.G. Hatcher, Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH), *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64 (2000) 583-589.
- [18] C. Schwarzingler, On the mechanism of thermally assisted hydrolysis and methylation of carbohydrates: the contribution of aldol and retroaldol reactions, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68-69 (2003) 137-149.
- [19] I. Tanczos, C. Schwarzingler, H. Schmidt, J. Balla, THM-GC/MS analysis of model uronic acids of pectin and hemicellulose, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68-69 (2003) 151-162.
- [20] J. Bleton, P. Mejanelle, J. Sansoulet, S. Goursaud, A. Tchaplà, Characterization of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethyl-silylation for recognition of plant gums, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 27-49.
- [21] R.J. Wicks, M.A. Moran, L.J. Pittman, R.E. Hodson, Carbohydrate signatures of aquatic macrophytes and their dissolved degradation products as determined by a sensitive high-performance ion chromatography method, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 3135-3143.



- [22] L. Comont, F. Laggoun-Défarge, J.-R. Disnar, Evolution of organic matter indicators in response to major environmental changes: the case of a formerly cutover peatbog (Le Russey, Jura Mountains, France), *Org. Geochem.* 37 (2006) 1736-1751.
- [23] M.E.C. Moers, J.J. Boon, J.W. De Leeuw, M. Baas, P.A. Schenck, Carbohydrate speciation and Py-MS mapping of peat samples from a subtropical open marsh environment, *Geochim. Cosmochim. Acta* 53 (1989) 2011-2021.
- [24] M.E.C. Moers, M. Baas, J.W. De Leeuw, J.J. Boon, P.A. Schenck, Occurrence and origin of carbohydrates in peat samples from a red mangrove environment as reflected by abundances of neutral monosaccharides, *Geochim. Cosmochim. Acta* 54 (1990) 2463-2472.
- [25] Z.A. Popper and S.C. Fry, Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes, *Ann. Bot.* 91 (2003) 1-12.
- [26] V.E.J. Jassey, G. Chiapusio, D. Gilbert, A. Buttler, M.-L. Toussaint, P. Binet., Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog gradient in *Sphagnum fallax*, *Global Change Biology* (2011) DOI 10.1111/j1365-3486-2011-02437-x.
- [27] P.O. Bethge, C. Holmström, S. Juhlin, Quantitative gas chromatography of mixtures of simple sugars, *Svensk Papperst.* 69 (1966) 60-63.
- [28] W. Zech, M.-B. Johansson, L. Haumaier, R.L. Malcolm, CPDAS <sup>13</sup>C NMR and IR spectra of spruce and pine litter and of the Klason lignin fraction at different stages of decomposition, *Z. Pflanzenern. Bodenk.* 150 (1987) 262-265.
- [29] C.M. Preston, J.R. Nault, J.A. Trofymow, Chemical Changes During 6 Years of Decomposition of 11 Litters in Some Canadian Forest Sites. Part 2. <sup>13</sup>C Abundance, Solid-State <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy and the Meaning of "Lignin", *Ecosystems* 12 (2009) 1078-1102.
- [30] J.M. Challinor, Characterisation of wood by pyrolysis derivatisation-gas chromatography/mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol* 35 (1995) 93-107.
- [31] P.G. Hatcher, M.A. Nanny, R.D. Minard, S.D. Dible, D.M. Carson, Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), *Org. Geochem.* 23 (1995), 881-888.
- [32] L.A. Wysocki, T.R. Filley, T.S. Bianchi, Comparison of two methods for the analysis of lignin in marine sediments: CuO oxidation versus tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis, *Org. Geochem.* 39 (2008) 1454-1461.

- [33] R.S. Clymo, C.L. Bryant, Diffusion and mass flow of dissolved carbon dioxide, methane, and dissolved organic carbon in a 7-m deep raised peat bog, *Geochim. Cosmochim. Acta* 72 (2008) 2048-2066.
- [34] A. Haraguchi, C. Hasegawa, A. Hirayama, H. Kojima, Decomposition activity of peat soils in geogenous mires in Sasakami, central Japan, *Eur. J. Soil Biol.* 39 (2003) 191-196.
- [35] T. Osono, Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition, *Ecol. Res.* 22 (2007) 955-974.
- [36] R.C. Cooke, A.D.M. Whipps, *Ecophysiology of fungi*, Blackwell, Oxford, 1993.
- [37] O. Manneville, V. Vergne, O. Villepoux, *Le monde des tourbières et des marais : France, Suisse, Belgique et Luxembourg*, Delachaux et Niestlé, Paris-Lausanne, 1999.
- [38] F. Delarue, F. Laggoun-Défarge, J.R. Disnar, N. Lottier, S. Gogo, Organic matter sources and decay assessment in a Sphagnum-dominated peatland (Le Forbonnet, Jura Mountains, France): impact of moisture conditions, *Biogeochem.* (2011) DOI 10.1007/s10533-010-9410-0
- [39] F. Laggoun-Défarge, S. Bourdon, C. Chenu, Etude des transformations morphologiques précoces des tissus végétaux de tourbe. Apport du marquage histochimique en MET et du cryo-MEB haute resolution, in: F. Elsass F, A.M. Jaunet (Eds.), *Structure et ultrastructure des sols et des organismes vivants*, INRA, Paris, 1999, pp. 169-182.
- [40] C. McClaugherty, B. Berg, Cellulose, lignin and nitrogen concentration as rate regulating factors in late stages of forest litter decomposition, *Pedobiologia* 30 (1987) 101-112.

## II - THERMOCHIMIOLYSE *DOUBLE-SHOT* APPLIQUEE A LA FRACTION ORGANIQUE DELIPIDIFIEE ET AUX SUBSTANCES HUMIQUES CORRESPONDANTES D'UNE TOURBIERE OMBROTROPHE

La thermochemiolyse peut etre appliquee a une large variete de polymeres organiques incluant des echantillons complexes tels que les sols et les sediments. Differeents agents de derivations alkylants ou silylants peuvent etre utilises afin de caracteriser la structure et de determiner l'origine des echantillons.

Recemment, une pyrolyse *multi-shot* a permis d'analyser les produits liberes successivement par la desorption thermique puis par le craquage thermique d'un meme echantillon. Pour notre etude, nous nous sommes interesses a l'application de ce procede *multi-shot* a la thermochemiolyse.

Differeentes combinaisons *multi-shot* ont ete testees : (i) HMDS a 300 °C puis TMAH a 400 °C, (ii) TMSH a 300 °C puis TMAH a 400 °C et (iii) HMDS a 300 °C, TMSH a 300 °C puis TMAH a 400 °C. La combinaison (i) a conduit aux meilleurs resultats.

Cette partie, correspond a un article en preparation pour la revue "Journal of Analytical and Applied Pyrolysis". Elle presente les resultats obtenus par un procede de thermochemiolyse *double-shot* impliquant deux thermochemiolysees successives : la premiere en presence de HMDS a 300 °C et la seconde en presence de TMAH a 400 °C. Cette etude porte sur trois echantillons : la fraction delipidifiee d'une tourbe (Frasne, France), les acides humiques et l'humine correspondantes.

La premiere thermochemiolyse en presence de HMDS a 300 °C libere des composes thermolabiles apres derivation. Des derives de sucres sont majoritairement observes pour les trois echantillons. Des composes aromatiques pertrimethylsilyles (di- ou trihydroxybenzenes et methoxyphenols) sont egalement identifies. Pour les substances humiques, cette premiere thermochemiolyse revele aussi la presence d'acides gras et d'alcools gras pertrimethylsilyles. La seconde thermochemiolyse en presence de TMAH a 400 °C libere des monomeres issus des biopolymeres aliphatiques (lignines, cutines, suberines ou cires) : acides gras (sous la forme d'esters methyliques),  $\omega$ -methoxy esters,  $\alpha,\omega$ -diesters et composes aromatiques.

Contrairement a la thermochemiolyse classique realisee en presence de TMAH, ce procede de thermochemiolyse *double-shot* permet donc de distinguer les composes

thermolabiles de ceux possédant une stabilité thermique élevée (monomères issus des biopolymères aliphatiques) et/ou piégés dans le réseau macromoléculaire. Il apparait donc comme un outil intéressant pour collecter des indices quant à la composition, l'origine et la nature de la matière organique des sols et des sédiments.

## Double-shot thermochemolysis applied to lipid-free organic fraction and humic substances from an ombrotrophic peatland. Comparison with classical tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis

Céline Estournel-Pelardy, Laurent Grasset\*, André Amblès

Université de Poitiers, SRSN, UMR-CNRS 6514, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers Cedex, France

### Corresponding author:

Tel.: +33 5 49 45 37 59

Fax: +33 5 49 45 35 01

E-mail address: laurent.grasset@univ-poitiers.fr (L. Grasset)

### **Abstract**

Double-shot thermochemolysis was performed on three samples: the lipid-free organic fraction isolated from a peat sample from a wooded *Sphagnum*-dominated mire (Frasne, Jura Mountains, France) and its humic acid and humin fractions. Reactants with increasing strength were used: hexamethyldisilazane (HMDS) followed by tetramethylammonium hydroxide (TMAH). Analysis of the thermolysates showed conspicuous differences between the shots regarding the nature and/or the distribution of the numerous products indentified in the two thermolysates. The material thus appears to exhibit an expected complex and heterogeneous composition, including various types of labile compounds released during the first shot with HMDS (mostly carbohydrates) and units with a relatively higher thermal stability (monomers from biopolymers such as lignin and cutin, suberin or waxes) during the second shot with TMAH. Important differences were observed between the two shots and afforded important additional information in relation to the composition and sources of the original material, the nature of its components, and the large differences in reactivity between some of the (macro)molecular constituents. Multi-shot thermochemolysis thus appears as an interesting tool to help deciphering the composition, origin and nature of soil and sediment organic matter.

## Keywords

Thermochemolysis, double-shot, HMDS, TMAH, soil organic matter

### 1. Introduction

Thermochemolysis was applied to a wide variety of polymeric organic materials, including complex and intractable samples (i.e. soils and sediments) for rapid structural characterization, chemical profiling or source determination of the original material [1, 2].

Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) is the most common reagent used for thermochemolysis. More than 90% of the published thermochemolysis applications have used TMAH [2]. It allows the analysis of both free and bound carboxylic and alcoholic moieties because of its relatively strong alkaline character. Consequently, the discrimination between the different moieties originally present in samples were done using TMAH combined alternatively with less reactive reagents [2]. As an example, the use of tetraethylammonium acetate (TEAAc) to derivatize free fatty acids only and TMAH to react with and derivatize both free and bound fatty acids showed that fatty acids in humic acid samples were mostly in their free forms, trapped within the organic network [3, 4].

An other possibility is the insertion of a trimethylsilyl (TMS) group using a silylating agent. Hexamethyldisilazane (HMDS) has been proposed for the analysis of natural products formed by polar molecules as in the case of proteins [5], lipids [6], carbohydrates [7, 8] and humic acids [9]. Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) was successfully used in the analysis of lignin [10].

"Multi-shot" pyrolysis was used in the last few years for the analysis of complex natural organic matters by the sequential examination of the products released successively by thermal desorption and by thermal cracking from the same sample [11-13]. Here, we present the results obtained after a double-shot thermochemolysis based on reactivity differences with selected chemical agents. Two reactants with increasing strength were used: HMDS (silylation) followed by TMAH (transmethylation). Products generated from each successive step were recovered in cold traps before being analysed by GC-MS. It was performed on three samples: the lipid-free organic fraction isolated from a peat sample from a wooded *Sphagnum*-dominated mire (Frasne, Jura Mountains, France) and its humic acid and humin fractions. In order to determine the additional information provided by the double-shot

method, the results obtained by double-shot thermochemolysis were compared with those obtained for the same samples using classical thermochemolysis with TMAH.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The peat sample was obtained from the Frasné peatland. It is an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire situated in the Jura Mountains (France). The site is protected by the EU Directive "Natura 2000". Sample was collected from 30 to 50 cm in the wooded part of the peatland (covered since 50 years by *Picea Abies* and *Pinus Uncinata*). According to radiocarbon dating, sample is  $85 \pm 25$  B.P. yr old. Peat sample was submitted to Soxhlet extraction (10 x 10 h) with bidistilled chloroform to remove free lipids. Afterward, humic acids and humin were extracted according to the International Humic Substances Society (IHSS) procedure [14].

### 2.2. Double-shot thermochemolysis

The thermochemolysis procedure was based on the off-line procedure developed by Grasset and Amblès [15]. For the first shot, samples (1 g) were milled and thoroughly mixed with an excess of hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma-Aldrich, St Louis, USA). After one hour of impregnation, the sample was transferred to a  $60 \times 3$  cm i.d. Pyrex<sup>®</sup> tube and heated at 300 °C (30 minutes isothermal). Thermochemolysis products were swept using N<sub>2</sub> (flow rate at 100 ml.min<sup>-1</sup>) to a trap containing dichloromethane. When pyrolysis was complete, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator before analysis by gas chromatography coupled with mass-spectrometry (GC-MS).

For the second shot, residues of HMDS thermochemolysis were thoroughly mixed with an excess of a 50% (w/w) solution of tetramethylammonium hydroxide (TMAH; Acros Organics, New Jersey, USA) in methanol. After one hour of impregnation, the sample was transferred to a  $60 \times 3$  cm i.d. Pyrex<sup>®</sup> tube and heated at 400 °C (30 minutes isothermal). Thermochemolysis products were swept using N<sub>2</sub> (flow rate at 100 ml.min<sup>-1</sup>) to a trap containing dichloromethane. When pyrolysis was complete, the dichloromethane was removed using a rotary evaporator before analysis by GC-MS.

### 2.3. Analytical gas chromatography-mass spectrometry

The GC-Mass Spectroscopy (MS) analyses were performed on a Trace GC Thermo Finnigan coupled to a Thermo Finnigan Automass. The Trace GC Thermo Finnigan (split injector, 250 °C; flame ionization detector (FID), 300 °C) was equipped with a fused silica capillary column (Supelco Equity 5%, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) and helium as carrier gas (1 mL.min<sup>-1</sup>). The oven temperature was programmed from 60 to 300 °C at 5 °C.min<sup>-1</sup> and held there for 15 minutes. The MS was operated in the electron ionization mode at 70 eV and the ion separation was operated in a quadripolar mass filter. The various products were identified on the basis of their GC retention times, their mass spectra (comparison with standards) and literature data. Quantification was done using *n*-nonadecane as internal standard.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Lipid-free peat sample and its humic fractions

The total ion current (TIC) chromatograms obtained by GC-MS analysis of the thermochemolysis products generated by the two successive shots and those generated by classical TMAH thermochemolysis are reported in Fig. 1 for the lipid-free peat, in Fig. 2 for the humic acid fraction and in Fig. 3 for the humin fraction. The first shot (HMDS, 300 °C) should release the labile compounds with low molecular weight. On the contrary, the second shot (TMAH, 400 °C) should release tightly entrapped or bounded products formed through the cracking of units with a relatively higher thermal stability (monomers from biopolymers such as lignin, cutin, suberin or waxes).



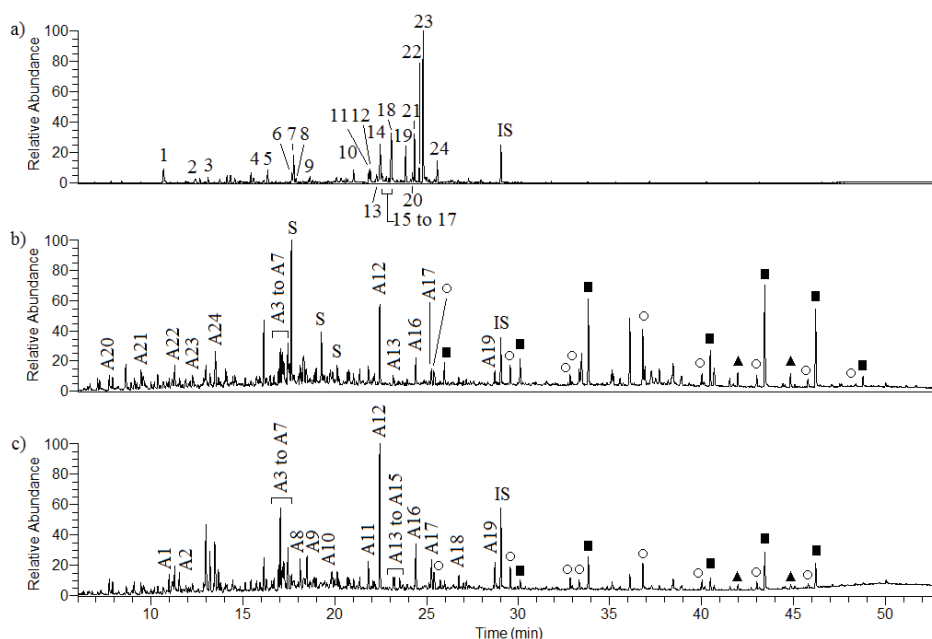


Fig. 1. TIC chromatograms of the thermochemolysis products generated from the lipid-free peat during the double-shot experiment: (a) first shot (HMDS, 300 °C) and (b) second shot (TMAH, 400 °C) and during the classical TMAH thermochemolysis (c) (IS: internal standard, Ax: aromatic compounds, S: sugar derivatives, ○: fatty acids, ■: ω-methoxy esters, ▲: α,ω-diesteres). See Table 1 and Table 2 for the identification of the numbered peaks.

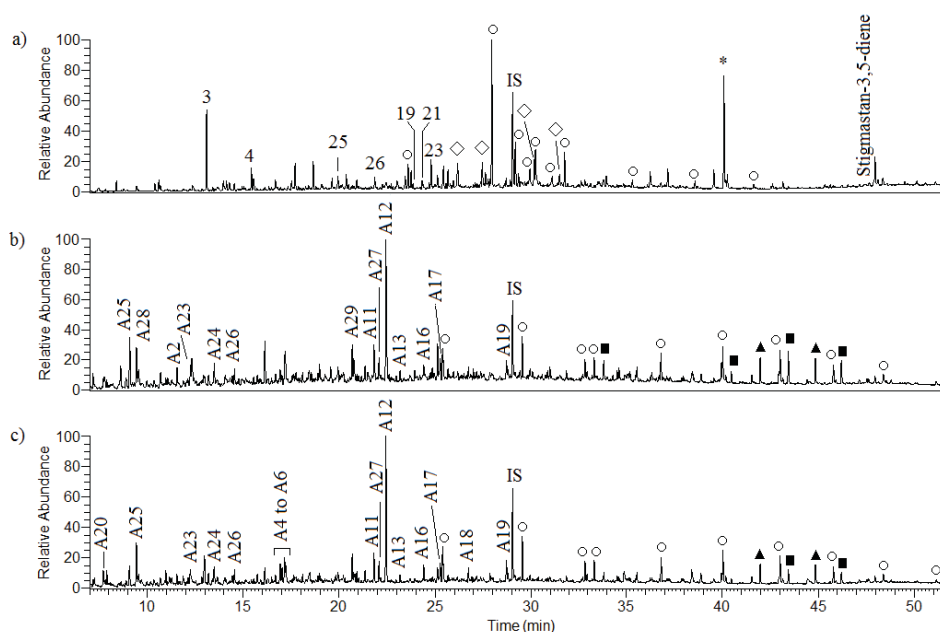


Fig. 2. TIC chromatograms of the thermochemolysis products generated from the humic acid fraction during the double-shot experiment: (a) first shot (HMDS, 300 °C) and (b) second shot (TMAH, 400 °C) and during the classical TMAH thermochemolysis (c) (IS: internal standard, Ax: aromatic compounds, ○: fatty acids, ■: ω-methoxy esters, ▲: α,ω-diesteres, ◇: alcohols, \*: pollution). See Table 1 and Table 2 for the identification of the numbered peaks.

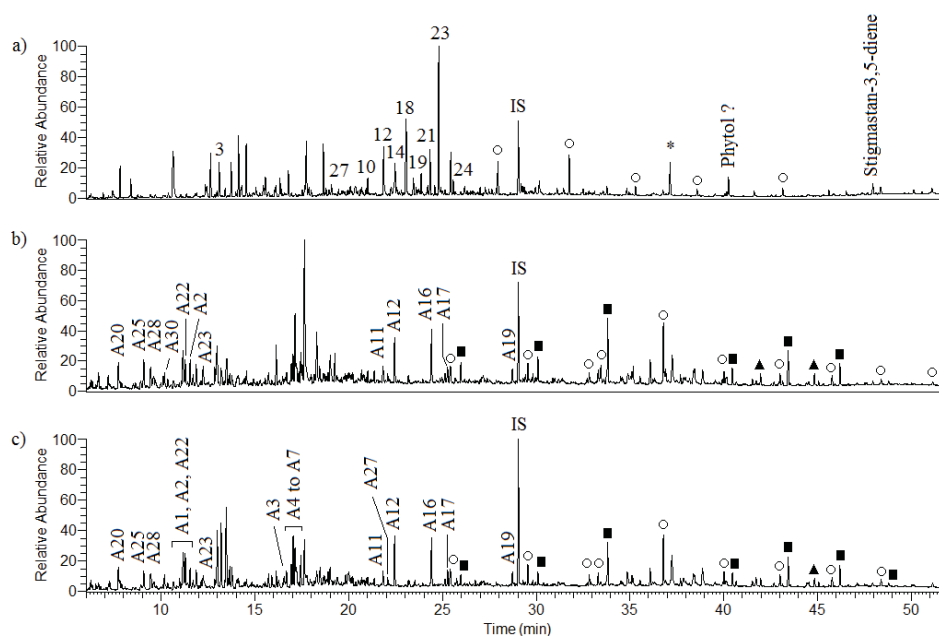


Fig. 3. TIC chromatograms of the thermochemolysis products generated from the humin fraction during the double-shot experiment: (a) first shot (HMDS, 300 °C) and (b) second shot (TMAH, 400 °C) and during the classical TMAH thermochemolysis (c) (IS: internal standard, Ax: aromatic compounds, ○: fatty acids, ■: ω-methoxy esters, ▲: α,ω-diesters, \*: pollution).

See Table 1 and Table 2 for the identification of the numbered peaks.

Peak	Assignment
1	Pyridin-3-ol
2	6-methylpyridin-3-ol
3	2-methoxyphenol
4	Glycerol
5	Pyrocatechol
6	Sugar derivative (D-xylofuranose ?)
7	Sugar derivative (D-ribofuranose ?)
8	1,4:3,6-dianhydro- $\alpha$ -D-glucopyranose
9	3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-1-one
10	1,2,3-trihydroxybenzene
11	Sugar derivative
12	Dehydrated glucose
13	Sugar derivative
14	2-hydroxymethyl-5-hydroxy-2,3-dihydro-(4H)-pyran-4-one + 1,2,4-trihydroxy-benzene (co-elution)
15	Sugar derivative
16	Sugar derivative
17	Sugar derivative
18	Dehydrated anhydrogalactose + dehydrated anhydroglucose (co-elution)
19	1,6-anhydro-D-galactopyranose
20	1,4-anhydro-D-galactopyranose
21	1,6-anhydro-D-mannopyranose
22	1,6-anhydro-D-galactofuranose
23	1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucopyranose (levoglucosan)
24	1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucofuranose
25	Acetovanillone
26	Isoeugenol
27	Aromatic derivative

Table 1. Identification of the pertrimethylsilylated compounds numbered on the TIC chromatograms of the first shot (HMDS, 300°C) for lipid-free peat (Fig. 1), humic acids (Fig. 2) and humin (Fig. 3) samples.

Peak	Assignment	Peak	Assignment
A1	1,2-dimethoxybenzene	A20	1-methoxy-4-methylbenzene
A2	1,4-dimethoxybenzene	A21	2-methoxyphenol
A3	<i>p</i> -methoxyacetophenone	A22	1-methoxy-4-vinylbenzene
A4	3,4-dimethoxystyrene	A23	2-methoxy-4-methylphenol
A5	1,2,4-trimethoxybenzene	A24	1,2-dimethoxy-4-methylbenzene
A6	<i>p</i> -methoxybenzoic acid, methyl ester	A25	<i>p</i> -cresol
A7	Methyl cinnamate	A26	4-ethyl-2-methoxyphenol
A8	1,3,5-trimethoxybenzene ?	A27	2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanol
A9	1,2,3-trimethoxy-5-methylbenzene	A28	4-methoxyphenol
A10	3,4-dimethoxybenzaldehyde	A29	Vanillic acid, methyl ester
A11	3,4-dimethoxyacetophenone	A30	1-ethyl-4-methoxybenzene
A12	Methyl 3,4-dimethoxybenzoate		
A13	Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate		
A14	1,2-dimethoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzene		
A15	1,2-dimethoxy-4-(2-methoxyvinyl)benzene		
A16	4-methoxycinnamic acid, methyl ester		
A17	Methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate		
A18	4-(2-ethoxy-1,2-dimethoxyethyl)-1,2-dimethoxybenzene ?		
A19	(E)-methyl 3-(3,4-dimethoxyphenyl)acrylate		

Table 2. Identification of the pertrimethylsilylated aromatic compounds numbered on the TIC chromatograms of the second shot (TMAH, 400°C) and of the classical TMAH thermochemolysis for lipid-free peat (Fig. 1), humic acids (Fig. 2) and humin (Fig. 3) samples.

### 3.1.1. First shot: HMDS, 300 °C

The chromatogram of the thermochemolysis products generated from the lipid-free peat during the first shot (HMDS, 300 °C; Fig. 1a) shows intense peaks for sugar derivatives (mainly levoglucosan, dehydrated anhydrogalactose, dehydrated anhydroglucose, 1,6-anhydro-D-mannopyranose, 1,6-anhydro-D-galactopyranose and 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucofuranose). Pertrimethylsilylated aromatic compounds (di- and trihydroxybenzenes) were obtained in few amounts. The chromatogram from the humic acid fraction (Fig. 2a) shows intense peaks for sugar derivatives (mainly levoglucosan), pertrimethylsilylated aromatic compounds, trimethylsilylated fatty acids and trimethylsilylated fatty alcohols. Finally, the

chromatogram from the humin fraction (Fig. 3a) shows intense peaks for sugar derivatives (levoglucosan, dehydrated anhydrogalactose, dehydrated anhydroglucose, dehydrated glucose, 1,6-anhydro-D-mannopyranose, 1,6-anhydro-D-galactopyranose and 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucofuranose). Pertrimethylsilylated aromatic compounds and trimethylsilylated fatty acids were detected in lower amounts. Quantification results are summarized in the Table 3.

Sugar derivatives are typical thermochemolysis products of cellulose and similar polysaccharides [7, 16]. In particular, levoglucosan (**23**) is a well-known cellulose pyrolysis marker [17]. The occurrence of typical thermochemolysis products of cellulose in the thermolysates generated by the first shot points the occurrence of cellulose exhibiting a low thermal stability.

Trimethylsilylated ethers of di- and trihydroxybenzenes have been found as pyrolysis/silylation products of carbohydrates [7]. Catechol (1,2-dihydroxybenzene) and 1,2,3-trihydroxybenzene moieties could also originally occur in samples, for instance by natural demethylation of methoxy groups of guaiacols and syringols during diagenesis/coalification or as remnants of other biopolymers (i.e. tannins) [9]. Moreover, pertrimethylsilylated methoxyphenols could also reflect the presence of carbohydrates [7].

Trimethylsilylated fatty acids were only generated from humic substances. They exhibited a short mode, from C<sub>12</sub> to C<sub>22</sub>, with a unimodal distribution (maximum at C<sub>14</sub> for humic acids (Fig. 2a) and at C<sub>16</sub> for humin (Fig. 3a)). The branched *iso*- and *anteiso*-C<sub>15</sub> acids (signature of a Gram positive bacteria contribution [18]) were only identified for the humic acids. In the same way, permethylsilylated fatty alcohols (mainly C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> members) were generated from humic acids. Such short chain *n*-alkan-1-ols could be the result of enzymatic reduction of corresponding fatty acids [19]. Trimethylsilylated phytol, usually occurring in an esterified form as the side chain of chlorophyll-*a*, seems to be generated from the humin fraction during the first shot (Fig. 3a). Thus, isolation of humic fractions seems to affect the macromolecular network and release pools of fatty acids and fatty alcohols sufficiently thermolabile to react during the first shot with HMDS.

Abundance (nmol/g peat)

	Lipid-free peat				Humic acids				Humins	
	First shot	Classical		First shot	Classical		First shot	Second shot	Second shot	Classical THM
		THM	shot		THM	shot				
$\omega$ -methoxy esters	-	4.4	7.0	-	0.3	0.3	-	0.8	1.5	-
$\alpha,\omega$ -diesters	-	1.1	1.2	-	0.1	0.5	-	0.1	0.3	-
Fatty acids	-	4.5	3.7	0.2	0.8	2.3	0.1	0.9	2.0	-
Fatty alcohols	-	-	-	< 0.1	-	-	< 0.1	-	-	-
Aromatic compounds	2.8	27.9	11.4	< 0.1	2.0	5.2	0.2	3.6	7.1	-
Sugars	49.4	2.5	4.0	< 0.1	-	-	0.5	-	-	-

Table 3. Abundances of the pertrimethylsilylated thermochemolysis products generated from the lipid-free peat and its humic substances during the double-shot experiment and during the classical TMAH thermochemolysis (THM).

## 3.1.2. Second shot: TMAH, 400 °C

Like for the first shot, GC-MS analysis of cracking products generated from lipid-free peat and its humic substances during the second shot (TMAH, 400 °C; Fig. 1b, 2b and 3b) revealed the presence of aromatic compounds. Sugar derivatives were only identified from the lipid-free peat sample.  $\omega$ -Methoxy esters,  $\alpha,\omega$ -diesters and fatty acids (identified as methyl esters) were also identified (see Table 3 for quantification of each compound class).

Sugar derivatives from the lipid-free peat sample were mainly released during the first shot with HMDS. It could suggest that they were mainly labile rather than tightly bonded and/or trapped in the macromolecular network.

Aromatic compounds were predominantly released during the second shot with TMAH. Guaiacyl structures are predominant which is in accordance with the recent input of gymnosperms to the peatland. Aromatic compounds could originate from biopolymers such as lignin, cutin, suberin or waxes. Indeed, the TMAH thermochemolysis (THM) procedure has been shown to produce a series of lignin-derived methylated monomers whose quantitative analysis should reflect the lignin contents of the samples [20-22].

The series of  $\omega$ -methoxy esters released from the lipid-free peat and the humic acid fraction, from C<sub>12</sub> to C<sub>26</sub>, exhibited a bimodal distribution with a maximum at C<sub>22</sub> and a submaximum at C<sub>16</sub>. Maximum and submaximum were inverted for the humin fraction. Even compounds predominated in the whole range. They are unambiguous building blocks of the aliphatic bio-polyesters (cutin and suberin) [23-26].  $\alpha,\omega$ -Diesters, C<sub>20</sub> and C<sub>22</sub> members, were identified in the three fractions. As  $\omega$ -methoxyesters, they are typical of the aliphatic bio-polyesters.

The fatty acids exhibited a wide range of compounds, from C<sub>12</sub> to C<sub>32</sub>. Bimodal distributions were observed for the lipid-free peat and the humic acid fraction with a maximum at C<sub>20</sub> and C<sub>16</sub>, respectively and a submaximum at C<sub>16</sub> and C<sub>22</sub>, respectively while the long mode predominated for the humin fraction. It indicates a large contribution of higher plant components since long chain (from C<sub>20</sub>) even-carbon-numbered fatty acids are typical plant markers [19]. The branched *iso*- and *anteiso*-C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> acids (signature of a Gram positive bacteria contribution [18]) were also identified for the lipid-free peat and the humic acid fraction. Moreover, unsaturated C<sub>18:1</sub> fatty acid was also observed in the lipid-free peat (217.0 nmol/g peat), in the humic acids (61.9 nmol/g peat) and in the humin (48.5 nmol/g peat).

*3.2. Comparison between the two shots and with classical thermochemolysis*

Conspicuous differences are noted between the two shots with regard to the nature and/or the distribution of the generated products. The first shot revealed the occurrence of free and/or thermolabile compounds. The second shot released products resulting from the cracking of units with a relatively high thermal stability (monomers from biopolymers such as lignin and cutin, suberin or waxes) and/or initially entrapped compounds. On the contrary, classical TMAH thermochemolysis did not allow to differentiate between thermolabile components and components with a relatively high thermal stability or trapped in the macromolecular network.

Aromatic compounds are mostly identified after the classical TMAH thermochemolysis while sugars are predominantly released during the first HMDS-shot. Aromatisation of sugars could occur during the classical TMAH thermochemolysis. Consequently, the amount of aromatic compounds increase whereas the amount of sugars decrease. Thus, the double-shot thermochemolysis seems more appropriate to identify free sugars. On the other hand, aliphatic compounds are mainly released during the second shot with amounts slightly lower than those liberated during the classical TMAH thermochemolysis.

Finally, the results obtained by double-shot thermochemolysis were compared with those obtained for the same sample using HMDS thermochemolysis. The TIC chromatograms obtained by GC-MS analysis of the thermochemolysis products generated from the lipid-free peat by the HMDS thermochemolysis (300, 350 and 400 °C) are reported in Fig. 4. Despite the increase of the temperature, the HMDS thermochemolysis released the same labile compounds with low molecular weight (mainly carbohydrates). In this way, the temperature of 300 °C was favoured for the double-shot experiment in order to reduce secondary reactions.



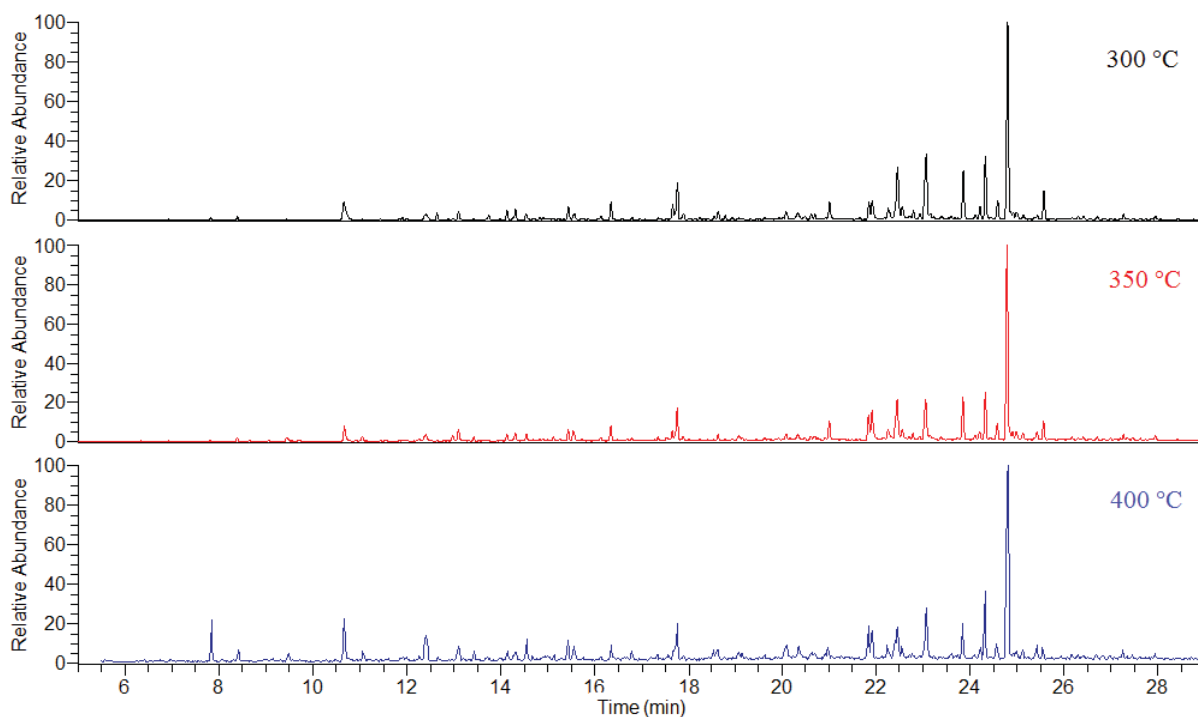


Fig. 4. TIC chromatograms of the thermochemolysis products generated from the lipid-free peat during HMDS thermochemolysis at 300, 350 and 400 °C.

#### 4. Conclusion

Conspicuous differences in thermolysate composition, between the first HMDS shot and the second TMAH shot, were found when studying peat and its humic substances by a double-shot thermochemolysis procedure. Numerous compounds were identified in both thermolysates and compared to those of classical TMAH thermochemolysis. The first shot with HMDS at 300 °C revealed the occurrence of thermolabile and/or free compounds. The second shot with TMAH at 400 °C released products resulting from the cracking of units with a relatively high thermal stability (monomers from biopolymers such as lignin and cutins, suberins or waxes). On the contrary, classical TMAH thermochemolysis could not distinguish trapped products, thermolabile components and components with a relatively high thermal stability. This double-shot thermochemolysis thus appears as an interesting tool to help deciphering the composition, origin and nature of soil and sediment organic matter.

## References

- [1] J.M. Challinor, Review: The development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 61 (2001) 3-34.
- [2] F. Shadkani, R. Helleur, Recent applications in analytical thermochemolysis. *J. Anal. and Appl. Pyrol.* 89 (2010) 2-16.
- [3] D. Válková, L. Grasset, A. Amblès, Molecular compounds generated by ruthenium tetroxide oxidation and preparative off line thermochemolysis of lignite humic acids from South Moravia: Implications for molecular structure. *Fuel* 88 (2009) 2113-2121.
- [4] C. Guignard, L. Lemée, A. Amblès, Lipid constituents of peat humic acids and humin. Distinction from directly extractable bitumen components using TMAH and TEAAc thermochemolysis. *Org. Geochem.* 36 (2005) 287-297.
- [5] G. Chiavari, D. Fabbri, S. Prati, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of products arising from pyrolysis of amino acids in the presence of hexamethyldisilazane. *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 235-241.
- [6] G. Chiavari, D. Fabbri, S. Prati, In-situ pyrolysis and silylation for analysis of lipid materials used in paint layers. *Chromatographia* 53 (2001) 311-314.
- [7] D. Fabbri, G. Chiavari, Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane. *Anal. Chim. Acta* 449 (2001) 271-280.
- [8] D. Scarlone, O. Chiantore, C. Riedo, Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of on-line pyrolysis-silylation products of monosaccharides. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 83 (2008) 157-164.
- [9] D. Fabbri, I. Vassura, C.E. Snape, Simple off-line flash pyrolysis procedure with in situ silylation for the analysis of hydroxybenzenes in humic acids and coals. *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 235-242.
- [10] K.-I. Kuroda, Pyrolysis-trimethylsilylation analysis of lignin: Preferential formation of cinnamyl alcohol derivatives. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 56 (2000) 79-87.
- [11] K. Quenea, S. Derenne, F.J. González-Vila, J.A. González-Pérez, A. Mariotti, C. Largeau, Double-shot pyrolysis of the non-hydrolysable organic fraction isolated from a sandy forest soil (Landes de Gascogne, South-West France): Comparison with classical Curie point pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 76 (2006) 271-279.
- [12] M. Herrera, G. Matuschek, A. Kettrup, Fast identification of polymer additives by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 70 (2003) 35-42.

- [13] J.-G. Lee, C.-G. Lee, J.-J. Kwag, A.J. Buglass, G.-H. Lee, Determination of optimum conditions for the analysis of volatile components in pine needles by double-shot pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 227-234.
- [14] R.S. Swift, Organic matter characterization. In: Sparks, D.L. (Ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, 1996, pp. 1011-1069.
- [15] L. Grasset, A. Amblès, Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47 (1998) 1-12.
- [16] D. Fabbri, G. Chiavari, S. Prati, I. Vassura, M. Vangelista, Gas chromatography/mass spectrometric characterisation of pyrolysis/silylation products of glucose and cellulose. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 16 (2002) 2349-2355.
- [17] A.D. Pouwels, G.B. Eijkel, J.J. Boon, Curie-point pyrolysis-capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry of microcrystalline cellulose. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 14 (1989) 237-280.
- [18] L. Zelles, Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol. Fertil. Soils* 29 (1999) 111-129.
- [19] P.E. Kolattukudy, R. Croteau, J.S. Buckner, *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam, 1976.
- [20] K.-I. Kuroda, A. Nakagawa-izumi, Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Improvement of the distribution profile of products derived from  $\beta$ -aryl ether subunits. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 75 (2006) 104-111.
- [21] K.-I. Kuroda, A. Nakagawa-izumi, D.R. Dimmel, Pyrolysis of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH): Products stemming from  $\beta$ -5 substructures. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3396-3400.
- [22] A. Nakagawa-izumi, K.-I. Kuroda, T. Ozawa, Thermochemolytic behavior of  $\beta$ - $\beta$  lignin structures in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Org. Geochem.* 35 (2004) 763-774.
- [23] K.G.J. Nierop, J.M. Verstraten, Organic matter formation in sandy subsurface horizons of Dutch coastal dunes in relation to soil acidification. *Org. Geochem.* 34 (2003) 499-513.
- [24] P.E. Kolattukudy, Cutin, suberin and waxes. In: P.K, S. (Ed.). *The biochemistry of plant lipids structure and function*. Academic Press, New York, 1980, pp. 571-645.

- [25] P.E. Kolattukudy, Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science* 208 (1980) 990-1000.
- [26] K.G.J. Nierop, D.F.W. Naafs, P.F. van Bergen, Origin, occurrence and fate of extractable lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Org. Geochem.* 36 (2005), 555-566.

### III - APPLICATION DE LA THERMOCHIMIOLYSE *DOUBLE-SHOT* A LA FRACTION ORGANIQUE DELIPIDIFIEE D'UN SOL LIMONEUX

Afin de vérifier la pertinence de la thermochemiolyse *double-shot* précédemment décrite, ce procédé a été appliqué à la fraction organique délipidifiée d'un échantillon de sol limoneux (Site du Deffend, Mignaloux-Beauvoir, France).

#### III. 1 - Description de l'échantillon

L'échantillon de sol limoneux a été collecté dans la couche supérieure (0-15 cm) du site du Deffend (Mignaloux-Beauvoir, France ; Figure IV-1). Anciennement cultivé (rotations maïs-blé), il est actuellement sous prairie depuis une quinzaine d'années. Les débris végétaux ont été enlevés manuellement puis les lipides libres ont été extraits au Soxhlet (3 x 10 h) en présence de chloroforme bidistillé.

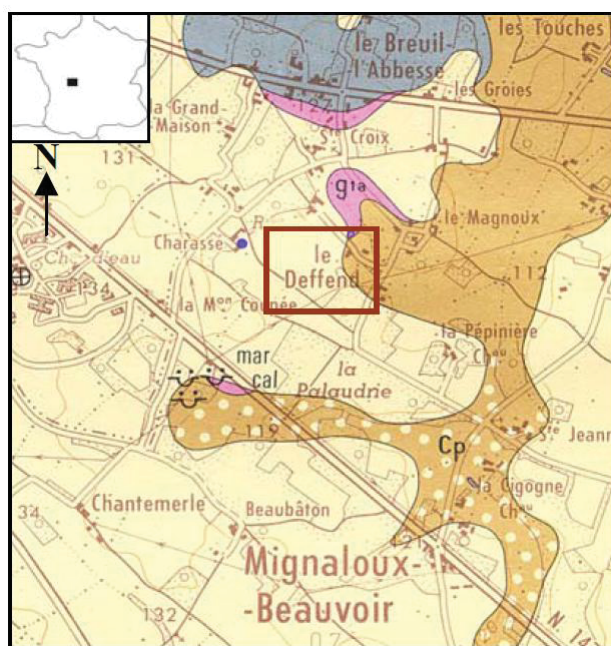


Figure IV-1 : Localisation du site du Deffend

#### III. 2 - Rappel du protocole

L'échantillon (8,5 g) est broyé puis minutieusement mélangé avec un excès d'hexaméthylsilazane (HMDS). Après une heure d'imprégnation, l'échantillon est transféré dans une canne en Pyrex<sup>®</sup> (60 x 3 cm de diamètre interne) et pyrolysé à 300 °C pendant 30

minutes. Les produits de thermochimie sont entraînés par un courant d'azote ( $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et recueillis dans un piège contenant du dichlorométhane. Une fois la pyrolyse complète, le dichlorométhane est séché sur sulfate de magnésium puis évaporé à l'évaporateur rotatif ( $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Quant au résidu, il subit ensuite une seconde thermochimie en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) en solution dans le méthanol (50/50, m/m) à  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 30 minutes. Les produits de thermochimie sont ensuite analysés en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM).

### III. 3 - Résultats

Les chromatogrammes du courant ionique total obtenus lors de l'analyse CG-SM des produits de thermochimie générés par le procédé de thermochimie *double-shot* et ceux générés par la thermochimie classique en présence de TMAH sont représentés sur la Figure IV-2. L'identification des pics est reportée dans le Tableau IV-1 et le Tableau IV-2.

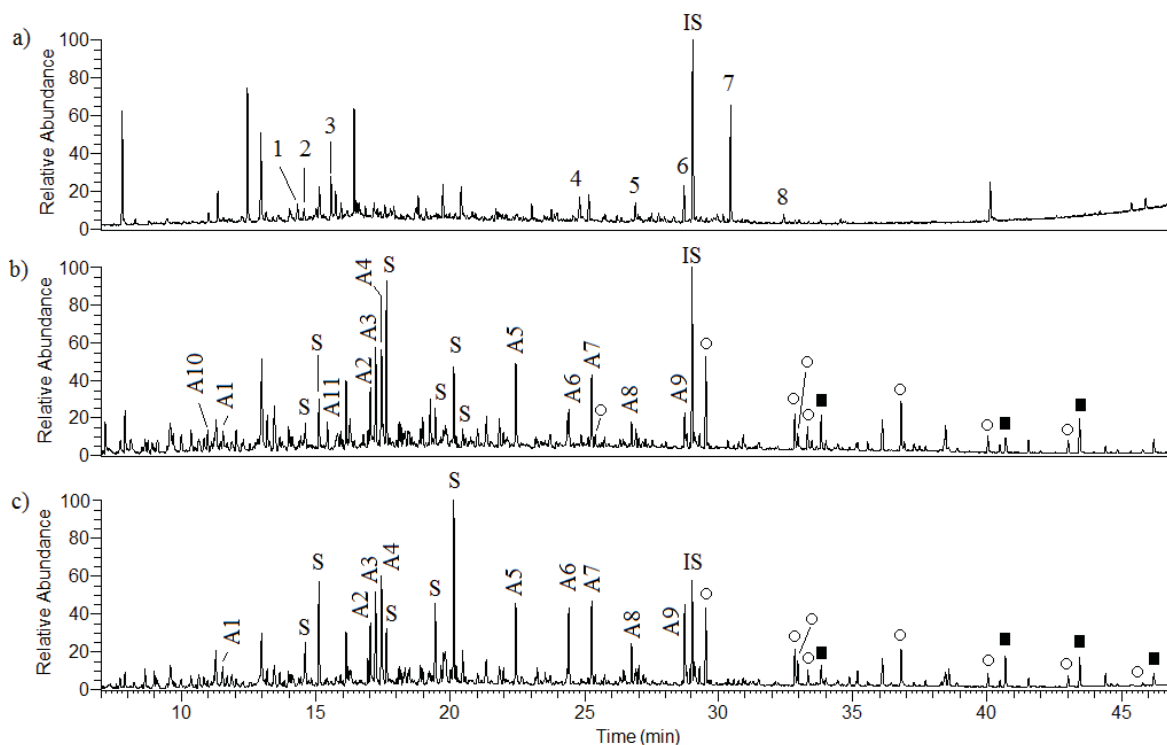


Figure IV-2 : Chromatogrammes du courant ionique total des produits de thermochimie générés à partir du sol limoneux par le procédé *double-shot* : (a) HMDS,  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  et (b) TMAH,  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  et par la thermochimie classique en présence de TMAH (c) (IS : étalon interne, Ax : composés aromatiques, S : sucres, ○ : acides gras, ■ :  $\omega$ -méthoxy esters)

Pic	Attribution
1	Acide hydroxyacetique ?
2	4-ethyl-2-methoxyphenol
3	2-methoxy-4-vinylphenol
4	1,6-anhydro-β-D-glucopyranose (levoglucosane)
5	Derive de sucre
6	Derive de sucre
7	Derive de sucre
8	Derive de sucre

Tableau IV-1 : Identification des composés pertriméthylsilylés numérotés sur le chromatogramme du courant ionique total de la première thermochemiolyse en présence de HMDS du sol limoneux (Figure IV-2)

Pic	Attribution
A1	1,4-diméthoxybenzène
A2	1,2,4-triméthoxybenzène
A3	Ester méthylique de l'acide <i>p</i> -méthoxybenzoïque
A4	Cinnamate de méthyle
A5	3,4-diméthoxybenzoate de méthyle
A6	Ester méthylique de l'acide 4-méthoxycinnamique
A7	3,4,5-triméthoxybenzoate de méthyle
A8	4-(2-éthoxy-1,2-diméthoxyéthyl)-1,2-diméthoxybenzène ?
A9	3-(3,4-diméthoxyphényl)acrylate de méthyle
A10	1,2-diméthoxybenzène
A11	3-méthoxybenzoate de méthyle

Tableau IV-2 : Identification des composés aromatiques pertriméthylsilylés numérotés sur le chromatogramme du courant ionique total de la seconde thermochemiolyse en présence de TMAH du sol limoneux (Figure IV-2)

### III. 3. 1 - Première thermochemiolyse en présence de HMDS, 300 °C

Le chromatogramme des produits de thermochemiolyse générés à partir du sol limoneux lors de la première thermochemiolyse en présence de HMDS à 300 °C (Figure IV-2a) montre d'importants pics correspondants à des dérivés silylés de sucres ainsi qu'à des méthoxyphénols pertriméthylsilylés (Tableau IV-3). Les sucres sont des produits de

thermochemiolyse classiques de la cellulose et des polysaccharides (Fabbri et Chiavari, 2001 ; Fabbri et al., 2002). Plus particulierement, le levoglucosane (4) est employe comme marqueur de la cellulose en pyrolyse. De meme, les methoxyphenols pertrimethylsilyles peuvent egalement provenir de l'oxydation de sucres (Fabbri et Chiavari, 2001).

	Abondance ( $\mu\text{mol/g}$ de sol)		
	HMDS, 300°C	TMAH, 400 °C	Thermochemiolyse classique
$\omega$ -methoxy esters	-	< 0,1	0,2
Acides gras	-	0,3	0,4
Composes aromatiques	< 0,1	1,0	1,3
Sucres	< 0,1	0,3	0,6

Tableau IV-3 : Abondances des produits de thermochemiolyse pertrimethylsilyles generes a partir du sol limoneux pendant le procede *double-shot* et pendant la thermochemiolyse classique en presence de TMAH

### III. 3. 2 - Seconde thermochemiolyse en presence de TMAH, 400 °C

L'analyse CG-SM des produits de thermochemiolyse generes a partir du sol limoneux lors de la seconde thermochemiolyse en presence de TMAH a 400 °C (Figure IV-2b) montre egalement la presence de sucres et de composes aromatiques. Des  $\omega$ -methoxy esters et des acides gras (identifies sous la forme d'esters methyliques) sont aussi observes (Tableau IV-3).

Les composes liberes lors de la seconde thermochemiolyse en presence de TMAH sont moins thermolabiles et pouvaient donc etre initialement lies et/ou pieges dans la matrice macromoleculaire.

Les composes aromatiques liberes ici peuvent provenir de la thermochemiolyse de motifs ligneux (et/ou de tanins) (Kuroda et al., 2002 ; Nakagawa-izumi et al., 2004 ; Kuroda et Nakagawa-izumi, 2006). Les derives de sucres doivent ici provenir de motifs suffisamment proteges par et/ou lies a la matrice pour que leur liberation n'intervienne seulement lors du second *shot* en presence de TMAH.

Les  $\omega$ -methoxy esters, du C<sub>12</sub> au C<sub>26</sub>, presentent une distribution bimodale centree en C<sub>16</sub> et en C<sub>22</sub>. Les membres a nombre pair d'atomes de carbone predominant. Ce sont des composes caracteristiques des biopolymeres aliphatiques tels que la cutine et la suberine (Kolattukudy, 1980a ; Kolattukudy, 1980b ; Nierop et Verstraten, 2003 ; Nierop et al., 2005).



Enfin, les acides gras sont compris dans la gamme C<sub>12</sub>-C<sub>32</sub> et montrent une distribution bimodale centree en C<sub>16</sub> et en C<sub>22</sub>. Cela montre une contribution importante des vegetaux superieurs (Kolattukudy, 1976). Les acides ramifies *iso* et *anteiso* en C<sub>15</sub> et en C<sub>17</sub>, typiques d'une contribution bacterienne (Zelles, 1999) et l'acide insature C<sub>18:1</sub> sont egalement observes.

### III. 4 - Conclusion

Les resultats obtenus pour le sol limoneux sont similaires a ceux obtenus pour la tourbe delipidifiee. La premiere thermochemiolyse en presence de HMDS a 300 °C libere principalement des derives de sucres et des composes aromatiques de faibles poids moleculaire. La seconde thermochemiolyse en presence de TMAH a 400 °C libere, quant a elle, des composes resultant du craquage d'unites de stabilite thermique plus elevee (monomeres issus de la lignine et des biopolymeres aliphatiques).

Ce procede de thermochemiolyse *double-shot* semble etre a meme de permettre l'analyse moleculaire de composes thermolabiles et donc de les distinguer de ceux lies et/ou pieges dans le reseau macromoleculaire.

## IV - CONCLUSION

La thermochemiolyse preparative en presence de TMAH a permis l'analyse et le suivi vertical (par semi-quantification) de la cellulose et des sucres libres present dans les 50 premiers centimetres d'une tourbe provenant de la tourbiere ombrotrophe de Frasne. Bien que l'analyse des sucres hemicellulosiques et la distinction de chaque sucre individuel ne soient pas possibles par cette methode, elle permet cependant l'analyse d'une categorie de cellulose non atteinte par l'hydrolyse acide et l'analyse specifique des sucres libres et terminaux.

Une sequence de thermochemiolyse *double-shot* a egalement ete mise au point. Elle implique deux thermochemiolysees successives : la premiere en presence d'hexamethyldisilazane (HMDS) a 300 °C et la seconde en presence de TMAH a 400 °C. La premiere thermochemiolyse en presence de HMDS a 300 °C libere des composees labiles ou faiblement pieges dans la structure macromoleculaire tandis que la seconde thermochemiolyse en presence de TMAH a 400 °C libere des produits resultant du craquage d'unités de stabilité thermique relativement elevee. Contrairement a la thermochemiolyse classique realisee en presence de TMAH, ce procede de thermochemiolyse *double-shot* permet de distinguer certains des composees pieges de certains produits thermolabiles des composees possedant une stabilité thermique plus elevee.

La thermochemiolyse est deja largement utilisee pour caracteriser une grande variete de constituants des biopolymeres tels que les lipides, lignines, proteines, sucres ainsi que leurs derives "humifies". La comparaison des derives de sucres liberes par cette methode de ceux obtenus par une methode eprouvee pour leur analyse (hydrolyse acide) a montre l'interet et la complementarite de la thermochemiolyse pour l'analyse de ces structures dans les systemes sols. La mise au point d'une sequence *double-shot* permet de differencier certains composees labiles de l'ensemble habituellement analyses jusqu'alors en thermochemiolyse. Ces etudes et leurs resultats montrent aussi que les systemes thermolytiques sont des techniques d'analyse pour les matieres organiques des sols qui doivent continuer a etre developpees.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fabbri, D., Chiavari, G., 2001. Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane. *Analytica Chimica Acta* 449, 271-280.
- Fabbri, D., Chiavari, G., Prati, S., Vassura, I., Vangelista, M., 2002. Gas chromatography/mass spectrometric characterisation of pyrolysis/silylation products of glucose and cellulose. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 2349-2355.
- Kolattukudy, P.E., Croteau, R., Buckner, J.S., 1976. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*. Elsevier, Amsterdam.
- Kolattukudy, P.E., 1980a. Biopolyester membranes of plants: Cutin and suberin. *Science* 208, 990-1000.
- Kolattukudy, P.E., 1980b. Cutin, suberin and waxes. In: P.K, S. (Ed.). *The biochemistry of plant lipids structure and function*. Academic Press, New York, pp. 571-645.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., Dimmel, D.R., 2002. Pyrolysis of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH): Products stemming from  $\beta$ -5 substructures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3396-3400.
- Kuroda, K.-I., Nakagawa-izumi, A., 2006. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis of lignin: Improvement of the distribution profile of products derived from  $\beta$ -aryl ether subunits. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75, 104-111.
- Nakagawa-izumi, A., Kuroda, K.-I., Ozawa, T., 2004. Thermochemolytic behavior of  $\beta$ - $\beta$  lignin structures in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 35, 763-774.
- Nierop, K.G.J., Verstraten, J.M., 2003. Organic matter formation in sandy subsurface horizons of Dutch coastal dunes in relation to soil acidification. *Organic Geochemistry* 34, 499-513.
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F., 2005. Origin, occurrence and fate of extractable lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry* 36, 555-566.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.



## **CONCLUSION GENERALE**



Le but de ce travail de thèse est d'étudier de nouvelles méthodes de dégradation chimiques et thermiques pour l'analyse des bio(géo)macromolécules des sols et des sédiments. Deux techniques ont été plus particulièrement étudiées : la méthode Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC) et la thermochimie.

La méthode DFRC induit la rupture des liaisons  $\beta$ -aryl éthers et affecte les motifs glycérol présents dans les biopolymères végétaux (acylglycérols, cutines, subérines, ...). Elle permet donc l'analyse des monomères ligneux mais également celle de fragments de lipides macromoléculaires. Appliquée à la tourbière ombrotrophe de Frasne et aux substances humiques correspondantes (acides humiques et humine), elle a permis la libération de composés organosolubles (50 %m. de la tourbe délipidifiée, 10 %m. des acides humiques et 30 %m. de l'humine) dont les principaux motifs identifiés sont des acides *n*-alcanoïques, des *n*-alcan-1-ols, des  $\omega$ -hydroxy acides, des acides  $\alpha,\omega$ -dicarboxyliques, des *n*-alcènes, des *n*-alcanes et des composés aromatiques. Ces composés aromatiques, principalement des monolignols de type guaiacyle, montrent l'apport récent des gymnospermes présents sur la partie boisée de la tourbière.

Les différences qualitatives et quantitatives observées lors de l'étude des lipides libérés par la méthode DFRC semblent dues à la procédure d'isolation des substances humiques proposée par la Société Internationale des Substances Humiques (IHSS). En effet, cette méthode paraît capable d'atteindre de nouvelles catégories de composés hydrophobes (acides *n*-alcanoïques, *n*-alcan-1-ols,  $\omega$ -hydroxy acides, acides  $\alpha,\omega$ -dicarboxyliques et *n*-alcènes) au détriment d'un ensemble de composés aromatiques hydrophiles (tannins et autres composés polyhydroxyphénoliques).

Les lipides polaires libérés après la méthode DFRC représentent 85 %m. des composés organosolubles pour la tourbe délipidifiée, 82 %m. pour les acides humiques et 74 %m. pour l'humine et montrent des bandes caractéristiques des liaisons ester en spectroscopie infrarouge. Leur saponification permet la libération de *n*-alcanes, de *n*-alcan-1-ols et de composés aromatiques dont les monolignols. Ces derniers composés sont majoritairement obtenus après l'hydrolyse alcaline. Liés par des liaisons ester à la matière organique insoluble et/ou protégés par les structures macromoléculaires, ils sont initialement non réactifs vis-à-vis de la méthode DFRC.

D'autre part, la comparaison des lipides simples avec les lipides liés libérés par la méthode DFRC a permis de montrer l'importance des composés lipidiques liés à la matrice macromoléculaire ou piégés au cœur de celle-ci.

La méthode DFRC a aussi été comparée avec d'autres méthodes classiques d'analyse de la lignine dans les sols et les sédiments : l'oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre et la thermochimiolyse en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH). Cette étude a porté sur l'analyse de trois échantillons : un sol sous forêt, une tourbe et un lignite. Les monomères ligneux libérés après l'oxydation alcaline en présence de CuO et après la thermochimiolyse en présence de TMAH sont similaires à ceux décrits dans la littérature tandis que la méthode DFRC permet, entre autres, la libération de monolignols provenant de la coupure des liaisons  $\beta$ -éther de la lignine. Les composés possédant des unités guaiacyles prédominent et soulignent l'influence de végétaux gymnospermes. Ces trois méthodes d'analyse ne réagissant pas avec les mêmes catégories de composés aromatiques, cette comparaison a permis de montrer leur complémentarité pour la caractérisation de la lignine dans les sols et les sédiments. De plus, la capacité de la méthode DFRC à analyser de façon particulière les monolignols (encore) présents dans les sols et les sédiments semble être un bon moyen de suivre la dynamique de la lignine dans l'environnement.

La thermochimiolyse, employée en présence d'agents alkylants ou silylants, permet l'étude des bio(géo)macromolécules des sols. Utilisée en présence de TMAH, elle a permis l'analyse et la quantification de la cellulose et des sucres libres d'une colonne de tourbe de la tourbière de Frasne. La thermochimiolyse en présence de TMAH a montré une diminution des sucres libres et de la cellulose avec la profondeur dans l'acrotelme liée aux processus de décomposition puis une augmentation dans le catotelme due aux changements de végétation et/ou aux processus d'humification. Ces résultats, différents de ceux obtenus pour l'hydrolyse acide (méthode classique d'analyse des sucres dans les sols et les sédiments), sont dus aux différents mécanismes impliqués dans chaque procédé. En effet, la thermochimiolyse en présence de TMAH ne distingue pas chaque sucre individuel et permet uniquement l'analyse spécifique des sucres libres ou terminaux alors que l'hydrolyse acide atteint tous les types de sucres. Par ailleurs, de par sa capacité à rompre les liaisons ester et éther, la thermochimiolyse en présence de TMAH permet l'analyse de sucres cellulosiques piégés dans le réseau macromoléculaire. Un *pool* de cellulose, non atteint par l'hydrolyse acide, a ainsi été mis en évidence. Compte tenu des différents mécanismes impliqués dans chaque procédé, la thermochimiolyse en présence de TMAH apparaît comme une méthode complémentaire à l'hydrolyse acide pour l'analyse des sucres dans des systèmes environnementaux complexes.

Un procédé de thermochimiolyse *double-shot* a également été étudié. Il implique deux thermochimiolyse successives : la première en présence d'hexaméthylsilylazane (HMDS) à



300 °C et la seconde en présence de TMAH à 400 °C. Ce procédé a été appliqué à trois échantillons : la fraction délipidifiée d'une tourbe ombrotrophe et les acides humiques et l'humine correspondants. La première thermochimioolyse en présence de HMDS libère des composés thermolabiles (principalement des dérivés sucrés et de petites molécules aromatiques) tandis que la seconde thermochimioolyse en présence de TMAH libère des produits résultant du craquage d'unités de stabilité thermique relativement élevée (monomères issus des biopolymères aliphatiques tels que les lignines, les cutines, les subérines ou les cires : esters méthyliques d'acides gras,  $\omega$ -méthoxy esters,  $\alpha,\omega$ -diesters et composés aromatiques). Contrairement à la thermochimioolyse classique réalisée en présence de TMAH, la thermochimioolyse *double-shot* permet d'analyser certains composés thermolabiles séparément de ceux liés ou fortement piégés.

Différentes perspectives de recherche apparaissent à l'issue de ce travail. L'application de la méthode DFRC pourrait être envisagée pour l'analyse des lipides polaires complexes et permettre ainsi l'analyse des chaînes aliphatiques liées aux motifs glycérol. De la même façon, une étude des composés aromatiques secondaires (mécanismes, origine, ...) pourrait permettre l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires potentiels. L'étude de nouveaux échantillons de sols et de sédiments serait également intéressante pour approfondir la comparaison menée avec les méthodes classiques d'analyse de la lignine (oxydation alcaline en présence d'oxyde de cuivre et thermochimioolyse en présence de TMAH). Enfin, la mise au point de nouveaux systèmes thermolytiques peut encore être développée en envisageant l'emploi de nouveaux agents de dérivation et la mise au point de nouvelles séquences *multi-shot*.



## **PARTIE EXPERIMENTALE**



## I - PRECAUTIONS

L'étude de la matière organique naturelle nécessite l'intervention d'un nombre important de manipulations pouvant entraîner la contamination des échantillons. Diverses précautions s'avèrent donc nécessaires pour préserver la qualité des résultats. Ainsi, l'utilisation de gants jetables permet d'éviter les acides aminés et les *n*-alcanes à poids moléculaire supérieur au C<sub>25</sub> contenus dans les empreintes digitales. La verrerie est lavée à l'aide d'un détergent (le RBS 50) qui, dilué dans de l'eau très chaude, élimine toute trace de matière organique. Après rinçage à l'eau chaude puis à l'eau distillée, la verrerie est séchée dans un endroit propre puis recouverte de papier aluminium afin d'éviter toute contamination par les alcanes contenus dans les poussières de laboratoire.

Dans les montages, les raccords se font sans graissage. L'étanchéité peut être assurée par un ruban de téflon entourant la partie mâle du rodage. Le transfert des solutions se fait à l'aide de pipettes Pasteur. En effet, les plastiques et les silicones contenant des produits de contamination (esters de l'acide phtalique principalement), le contact entre les produits et les objets en plastique est à éviter. Les produits d'usage courant comme le coton, le sable, la silice, le sulfate de magnésium et le carborundum sont lavés au soxhlet par du dichlorométhane (2 x 12 heures) puis stockés dans des flacons en verre. Tous les solvants sont soit bidistillés, soit d'une pureté suffisante pour l'analyse (> 98%). Le chloroforme est stabilisé par addition de méthanol (1 %) après distillation. Les composés standards utilisés pour les expérimentations et les étalonnages sont tous d'une pureté supérieure à 98 %. De plus, afin de minimiser toute évolution de ces produits, ils sont conservés au congélateur.

## II - FRACTIONNEMENT DE LA MATIERE ORGANIQUE

Les échantillons de tourbe sont lyophilisés (lyophilisateur Christ Freeze Dryers, modèle Alpha 1-4) puis broyés. Ils sont conservés au congélateur.

### II. 1 - Extraction et fractionnement des lipides

Les lipides "libres" sont extraits de l'échantillon de tourbe au Soxhlet par du chloroforme bidistillé pendant 10 x 10 heures. L'extrait est récupéré par évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif (T = 40 °C) puis stocké au congélateur.

Les lipides extraits sont ensuite séparés par extraction sur phase solide (Discovery® DSC-Si SPE Tube) (Dickson et al., 2009). La colonne est activée par un volume de

chloroforme puis les lipides y sont déposés en solution dans le chloroforme. Des éluions successives avec un mélange chloroforme/acide acétique (100/1, v/v ; un volume), de l'acétone (4 volumes) et du méthanol (un volume) sont réalisées. La fraction éluee au mélange chloroforme/acide acétique (100/1, v/v) permet d'isoler les lipides simples, celle éluee à l'acétone les lipides complexes de polarité similaire aux glycolipides et celle éluee au méthanol les lipides complexes de polarité similaire aux phospholipides.

Les lipides simples sont ensuite repris dans le dichlorométhane et lavés avec une solution de soude 0,1 M. La phase organique, contenant les composés neutres-basiques, est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Les phases aqueuses sont rassemblées, acidifiées à  $\text{pH} = 1$  avec de l'acide chlorhydrique concentré au goutte à goutte puis extraites avec du dichlorométhane. La phase organique, contenant les composés acides, est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Les lipides simples neutres-basiques sont acétylés puis analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. De même, les lipides simples acides sont méthylés et acétylés avant d'être analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

## II. 2 - Extraction des substances humiques

La tourbe délipidifiée est mélangée à une solution de soude 0,1 M préalablement désoxygénée (barbotage pendant 15 minutes d'azote dans la solution) à raison d'un gramme d'échantillon pour 10 mL de solution. Douze extractions successives sont effectuées, chacune consistant en une agitation de 4 heures suivie d'un repos de 12 heures au réfrigérateur. Après centrifugation, les extraits sont réunis et les acides humiques sont précipités à  $\text{pH} = 1$  par de l'acide chlorhydrique 6 M ajouté goutte à goutte. Après avoir été laissés au repos une nuit au réfrigérateur, ils sont séparés des acides fulviques par centrifugation (Centrifugeuse Sigma Laboratory Centrifuge, Model 3-15). Le précipité d'acides humiques est remis en suspension dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 M (agitation pendant une heure) avant d'être centrifugé à nouveau. Le surnageant est ajouté aux précédents. Les acides humiques ainsi isolés sont séchés à l'étuve à  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Les acides fulviques en solution sont évaporés à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) puis lyophilisés.

Le résidu insoluble est neutralisé par de l'acide chlorhydrique 1 M (agitation pendant 15 minutes) puis laissé au repos quelques heures. Le solide subit alors plusieurs rinçages à l'eau distillée (agitation pendant une heure puis centrifugation) jusqu'à disparition des ions

chlorures dans les surnageants de centrifugation (test  $\text{AgNO}_3$  0,2 M). L'humine ainsi isolée est séchée à l'étuve à 45 °C.

### III - MÉTHODE DFRC

Le protocole utilisé est similaire à celui décrit dans la littérature (Lu et Ralph, 1997). L'échantillon (1 g) est mis en suspension dans 50 mL de solution de bromure d'acyle/acide acétique (8/92, v/v) puis chauffé à 50 °C (bain de graphite) sous agitation magnétique pendant 2 heures. Après évaporation complète du solvant, le résidu est repris dans 50 mL d'une solution de dioxane/acide acétique/eau (5/4/1, v/v/v) avec 5 g de poudre de zinc puis chauffé à 50°C (bain de graphite) pendant 30 minutes. Le mélange réactionnel est filtré sous vide sur filtre Whatman GF/F en microfibre de verre (0,7  $\mu\text{m}$ ). Le filtrat est transféré dans une ampoule à décanter avec du dichlorométhane (100 mL) et une solution saturée de chlorure d'ammonium (100 mL). Le pH de la phase aqueuse est ajusté à  $\text{pH} \leq 3$  à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 6,4 M. L'ampoule à décanter est alors vigoureusement agitée puis la phase organique est récupérée. La phase aqueuse est extraite avec 2 x 40 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées et séchées sur sulfate de magnésium puis évaporées sous pression réduite ( $T = 40$  °C). Le résidu (500 mg) est alors acétylé pendant 40 min à température ambiante dans du dichlorométhane (30 mL) contenant de l'anhydride acétique (4 mL) et de la pyridine (4 mL). Tous les composés volatils sont éliminés par co-évaporation avec de l'éthanol sous pression réduite ( $T = 40$  °C). Le produit acétylé est mis à sécher au dessiccateur puis méthylyé en présence de tri(méthylsilyl)diazométhane dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v) (Hashimoto et al., 1981). Les produits méthylyés et acétylés ainsi obtenus sont séparés sur colonne de silice. L'élution est réalisée à l'aide d'un mélange éther de pétrole/éther diéthylique dont la teneur en éther diéthylique augmente progressivement de 0 à 100 % puis deux lavages successifs avec du dichlorométhane et du méthanol sont effectués. Les produits ainsi isolés sont alors analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

### IV - HYDROLYSES BASIQUES

Les lipides polaires libérés après la méthode DFRC (50 mg) sont saponifiés avec 10 mL d'une solution de soude 1 M dans le méthanol à 60 °C pendant une heure. Après acidification avec de l'acide acétique ( $\text{pH} = 4-5$ ), le mélange réactionnel est extrait avec du dichlorométhane (3 x 20 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau distillée (2 x

20 mL), séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ °C}$ ). Les lipides saponifiés sont ensuite acétylés avant d'être analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

## V - HYDROLYSES ACIDES

Les hydrolyses acides ont été réalisées par Frédéric Delarue à l'Institut des Sciences de la terre d'Orléans dans le cadre de son doctorat.

### V. 1 - Protocole

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans la littérature (Comont et al., 2006). L'analyse est réalisée en deux étapes indépendantes permettant de libérer respectivement les sucres hémicellulosiques et les sucres totaux (c'est-à-dire hémicellulosiques et cellulosiques). Les deux étapes impliquent l'hydrolyse des polysaccharides en présence d'une solution acide diluée, mais seulement après une macération préalable dans de l'acide concentré pour l'analyse des sucres totaux. Ainsi, pour l'analyse des sucres totaux, 1 mL d'acide sulfurique 12 M est ajouté à 20-30 mg d'échantillon sec dans un tube Pyrex<sup>®</sup>. Après 16 heures à température ambiante, l'échantillon est dilué de façon à obtenir une solution d'acide sulfurique 1,2 M. Le tube est fermé sous atmosphère inerte puis chauffé à  $100\text{ °C}$  pendant 4 heures. Après retour à température ambiante, du déoxy-6-glucose ( $0,4\text{ mg.mL}^{-1}$  dans l'eau) est ajouté comme étalon interne. L'échantillon est neutralisé par du carbonate de calcium puis centrifugé pour éliminer le précipité. Le surnageant est évaporé à sec puis repris dans le méthanol. La solution est alors purifiée par centrifugation avant d'être évaporée à sec. Les sucres sont dissouts dans de la pyridine contenant 1 %m. de perchlorate de lithium et maintenus 16 heures à  $60\text{ °C}$  de façon à atteindre l'équilibre anomérique. Ils sont ensuite silylés (Sylon BFT, Supelco) puis analysés en chromatographie gazeuse.

### V. 2 - Conditions d'analyses

Le chromatographe utilisé est un Perkin-Elmer muni d'une colonne CPSil5CB (25 m x 0,25 mm de diamètre interne et  $0,25\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur de film) et d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du four, initialement programmée à  $60\text{ °C}$ , monte à  $120\text{ °C}$  (rampe  $30\text{ °C.min}^{-1}$ ), est maintenue une minute à  $120\text{ °C}$ , monte à  $240\text{ °C}$  (rampe  $3\text{ °C.min}^{-1}$ ) puis à  $310\text{ °C}$  (rampe  $20\text{ °C.min}^{-1}$ ) et est finalement maintenue à  $310\text{ °C}$  pendant 10 minutes. L'injecteur split/splitless est allumé après 2 minutes. L'injecteur est maintenu à



240 °C et le détecteur à 300 °C. Un mélange de dix monosaccharides (ribose, arabinose, xylose, rhamnose, fucose, glucose, mannose, galactose, lyxose et allose) a été utilisé comme étalon externe pour l'identification des composés.

## **VI - OXYDATION ALCALINE PAR L'OXYDE DE CUIVRE**

Le protocole utilisé est similaire à celui décrit dans la littérature (Hedges et Ertel, 1982). L'échantillon (50 mg), du sel de Mohr (100 mg) et de l'oxyde de cuivre (1 g) sont introduits dans une bombe pour digestion acide (Réacteur 4744 (45 mL), Parr Instrument Company, Moline, IL) sous atmosphère inerte avec 7 mL d'une solution de soude 2 M préalablement désoxygénée. La bombe est chauffée à 170°C (bain d'huile) pendant 3 heures. Après avoir laissé le mélange réactionnel refroidir une nuit, le contenu de la bombe est lavé avec 20 mL d'une solution de soude 1 M puis centrifugé à 4000 trs.min<sup>-1</sup> (≈ 3850 g) pendant 10 minutes. Après avoir récupéré le surnageant, le résidu est lavé à deux reprises avec 20 mL d'une solution de soude 1 M et centrifugé comme précédemment. Les extraits basiques sont regroupés et acidifiés à pH = 1 avec de l'acide chlorhydrique 6,4 M. Après avoir laissé au repos une heure, la solution est filtrée sous vide sur filtre Whatman GF/F en microfibre de verre (0,7 µm). Le filtrat est extrait avec du dichlorométhane (3 x 20 mL), séché sur sulfate de magnésium et évaporé à l'évaporateur rotatif (T = 40°C). Le résidu est ensuite méthylié en présence de tri(méthylsilyl)diazométhane dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v) (Hashimoto et al., 1981) et acétylé avec un excès d'anhydride acétique en présence de pyridine avant d'être analysé en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

## **VII - THERMOCHIMIOLYSE PREPARATIVE**

La procédure utilisée est basée sur celle décrite dans la littérature (Grasset et Amblès, 1998). L'échantillon (0,2 à 1 g) est broyé puis minutieusement mélangé avec un excès d'agent alkylant ou silylant. L'hydroxyde de tétraméthylammonium en solution dans le méthanol (50/50, m/m) a été utilisé comme agent alkylant et l'hexaméthylidisilazane (pur, ≥ 98%) comme agent silylant. Après une heure d'imprégnation, l'échantillon est transféré dans une canne en Pyrex<sup>®</sup> (60 x 3 cm de diamètre interne) et pyrolysé à 300 ou 400 °C pendant 30 minutes. Les produits de thermochimie sont entraînés par un courant d'azote (100 mL.min<sup>-1</sup>) et recueillis dans un piège contenant du dichlorométhane. Une fois la pyrolyse complète, le dichlorométhane est séché sur sulfate de magnésium puis évaporé à l'évaporateur

rotatif ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Les produits de thermochimiolyse sont ensuite analysés en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Pour la thermochimiolyse *double-shot*, une première thermochimiolyse en présence d'hexaméthylsilazane est réalisée à  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Puis, le résidu (non calciné) subit une seconde thermochimiolyse en présence d'hydroxyde de tétraméthylammonium réalisée à  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## VIII - SEPARATIONS ET ANALYSES

### VIII. 1 - Séparations chromatographiques

#### *VIII. 1. 1 - Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Les analyses sont effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes de 0,2 mm de silice (Merck Kieselgel 60F<sub>254</sub>). Un mélange d'acétate d'éthyle (8 %) dans l'éther de pétrole est utilisé pour l'élution. Les spots sont révélés par fluorescence UV (254 nm) puis par une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique (50 g.L<sup>-1</sup>) à chaud. Les rapports frontaux R<sub>f</sub> sont comparés avec ceux des produits de référence.

#### *VIII. 1. 2 - Chromatographie sur gel de silice*

Des colonnes de verre munies d'un robinet à deux voies (clé Téflon) sont utilisées. Pour 1 g de produit à séparer, 50 g de silice (Merck Kieselgel 60A, granulométrie 60-200  $\mu\text{m}$ ) sont mélangés à 100 mL d'éther de pétrole. Le mélange est dégazé par agitation puis introduit dans la colonne chromatographique, obstruée par du coton et du sable de Fontainebleau. Le produit à séparer est solubilisé dans l'éther de pétrole puis déposé en tête de colonne sur du sable de Fontainebleau ajouté sur la silice de façon à garantir un front de migration horizontal. L'élution des différentes familles est effectuée par 125 mL de mélange d'éther diéthylique dans l'éther de pétrole de polarité croissante (0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 16 %, 20 %, 50 %, 100 %) puis par 300 mL de dichlorométhane et enfin par 125 mL de méthanol. La séparation est suivie par CCM et les fractions de même polarité sont regroupées. Les solvants sont ensuite évaporés à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### VIII. 2 - Caractérisations globales

#### *VIII. 2. 1 - Datation par le carbone 14*

La datation par le carbone 14 a été effectuée par le Centre de Datation par le Radiocarbone (CRDC) à Villeurbanne (méthode de la scintillation liquide).

*VIII. 2. 2 - Analyse élémentaire*

Les teneurs en carbone, hydrogène, azote et oxygène ont été mesurées à l'aide d'un analyseur élémentaire FLASH EA 1112 (ThermoFisher Scientific) par combustion-éclair avec apport ponctuel d'oxygène à haute température ( $T = 970\text{ °C}$  : CHN/S) ou pyrolyse à haute température ( $T = 1000\text{ °C}$  : O) sous courant d'hélium. L'analyseur est piloté par l'intermédiaire du logiciel EAGER 300.

*VIII. 2. 3 - Spectroscopie infra-rouge*

Les spectres IRTF sont enregistrés sur un spectrophotomètre à transformée de Fourier FT-IR Perkin Elmer Spectrum 1000 sur la gamme spectrale  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ . Les échantillons (2 mg), préalablement séchés une nuit à l'étuve ( $105\text{ °C}$ ), sont incorporés dans du bromure de potassium (100 mg). Les spectres sont obtenus par réflexion diffuse.

VIII. 3 - Caractérisations fines

*VIII. 3. 1 - Dérivations préalables*

*VIII. 3. 1. a - Méthylation des acides carboxyliques*

Les acides carboxyliques sont dérivés en esters méthyliques en présence de tri(méthylsilyl)diazométhane dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2/1, v/v) (Hashimoto et al., 1981). Environ 1 g de produit est solubilisé dans 4 mL de dichlorométhane et 2 mL de méthanol. 2 mL de tri(méthylsilyl)diazométhane (2 M dans l'hexane) sont alors additionnés. Le mélange réactionnel est agité 2 heures à température ambiante puis évaporé à sec sous courant d'azote.

*VIII. 3. 1. b - Acétylation des alcools*

Le produit est solubilisé dans un excès d'anhydride acétique et 2 gouttes de pyridine sont ajoutées. La réaction est amorcée par chauffage à  $50\text{ °C}$  (bain de graphite) pendant 20 minutes puis maintenue sous agitation à température ambiante une nuit. La solution est hydrolysée avec de l'eau glacée sous agitation pendant une heure puis extraite avec du dichlorométhane. La phase organique est neutralisée par lavages successifs avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium, avec une solution saturée de chlorure de sodium et avec de l'eau distillée. Elle est alors séchée sur du sulfate de magnésium et évaporée à l'évaporateur rotatif ( $T = 40\text{ °C}$ ).

*VIII. 3. 2 - Chromatographie gazeuse*

Les analyses ont été réalisées sur un chromatographe Hewlett-Packard 6890 muni d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne capillaire utilisée (Supelco Equity 5 %) mesure 30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur et l'épaisseur de la phase stationnaire est de 0,25  $\mu\text{m}$ . Le gaz vecteur est l'hélium et les débits sont les suivants :

- Gaz vecteur : 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,
- Makeup (He) : 25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,
- Air : 400  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,
- Hydrogène : 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Les conditions utilisées sont les suivantes :

- Split : 1/50,
- Température de l'injecteur : 250  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Température du détecteur : 300  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Programmation de la colonne : la température du four, initialement programmée à 60  $^{\circ}\text{C}$ , monte à 300  $^{\circ}\text{C}$  (rampe 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) puis est maintenue à 300  $^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes.

Le *n*-nonadécène et le nonadécanoate ont été utilisés comme étalons internes pour la quantification des échantillons.

*VIII. 3. 3 - Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse*

L'appareil utilisé est un spectromètre Thermo Finnigan Automass couplé à un chromatographe en phase gazeuse Trace Thermo Finnigan.

Les conditions de chromatographie gazeuse sont les mêmes que celles décrites précédemment. L'ionisation se fait par impact électronique et la séparation des ions dans un filtre quadripolaire. Les conditions de spectrométrie sont les suivantes :

- Température de l'injecteur : 300  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Température de la source : 200  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Energie de ionisation : 70 eV,
- Température de la ligne de transfert : 290  $^{\circ}\text{C}$ .

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Comont, L., Laggoun-Défarage, F., Disnar, J.-R., 2006. Evolution of organic matter indicators in response to major environmental changes: The case of a formerly cut-over peat bog (Le Russey, Jura Mountains, France). *Organic Geochemistry* 37, 1736-1751.
- Dickson, L., Bull, I.D., Gates, P.J., Evershed, R.P., 2009. A simple modification of a silicic acid lipid fractionation protocol to eliminate free fatty acids from glycolipid and phospholipid fractions. *Journal of Microbiological Methods* 78, 249-254.
- Grasset, L., Amblès, A., 1998. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 47, 1-12.
- Hashimoto, N., Aoyama, T., Shioiri, T., 1981. New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29, 1475-1478.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54, 174-178.
- Lu, F., Ralph, J., 1997. Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a new method for lignin analysis: Protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2590-2592.

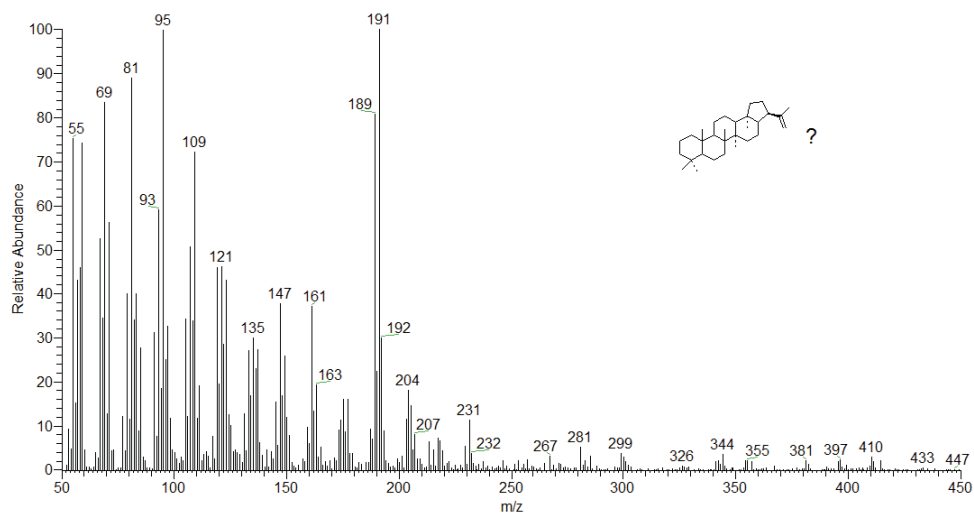
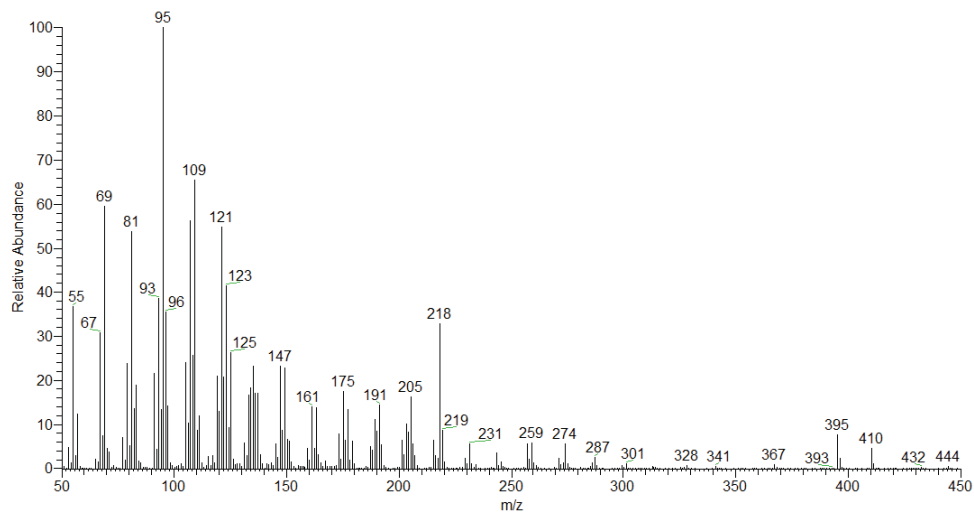
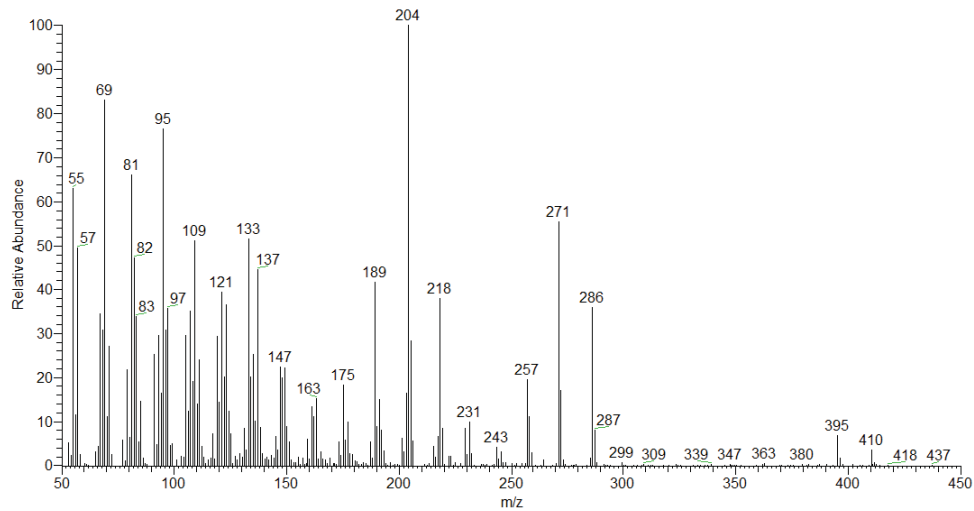


## **ANNEXES**

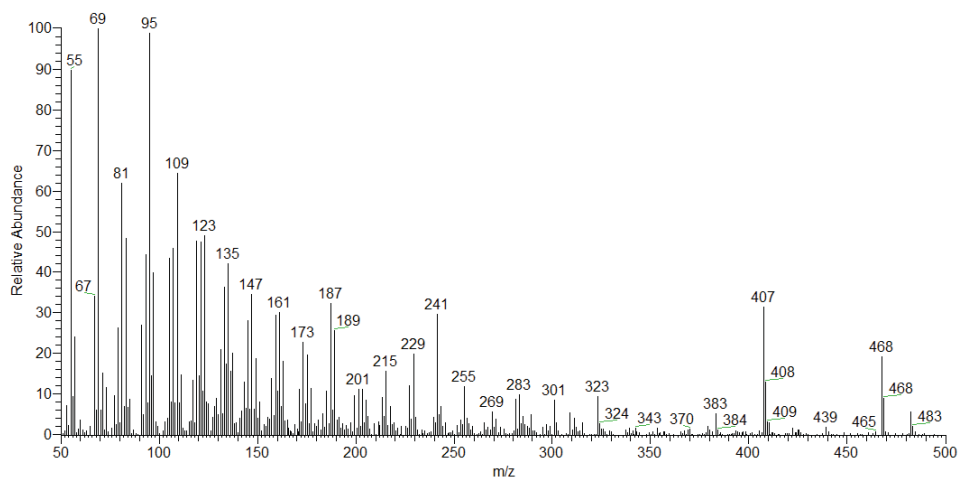
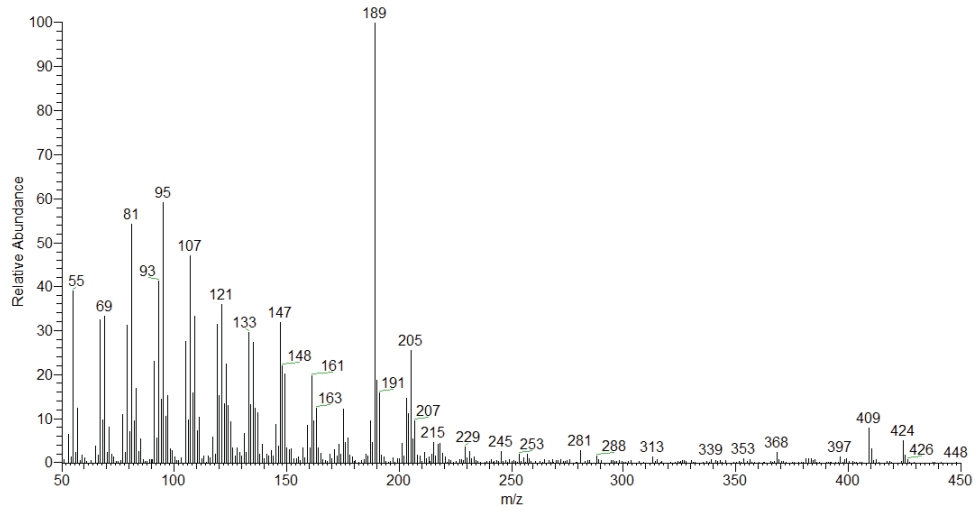
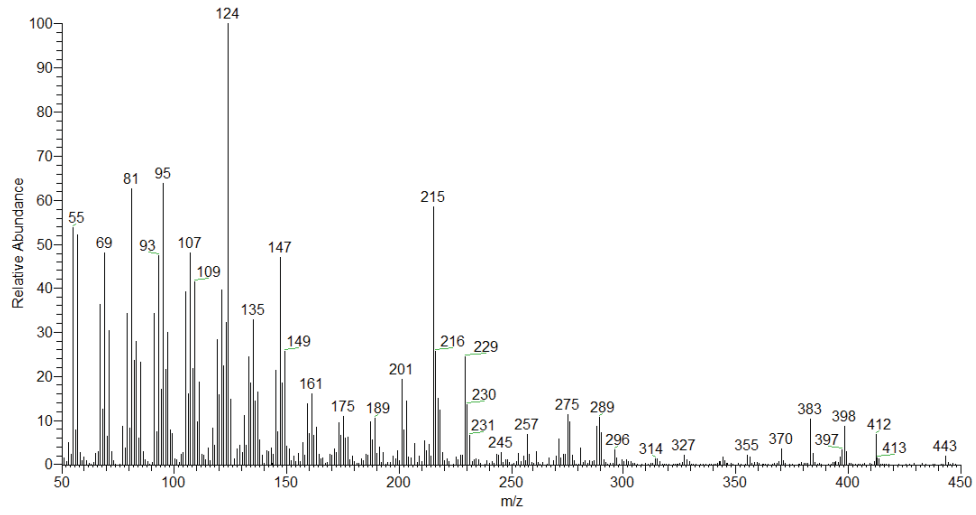




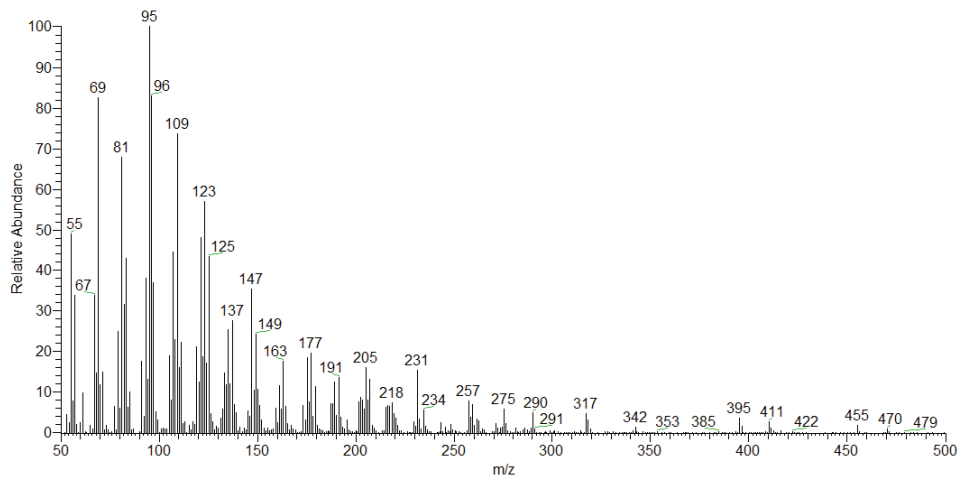
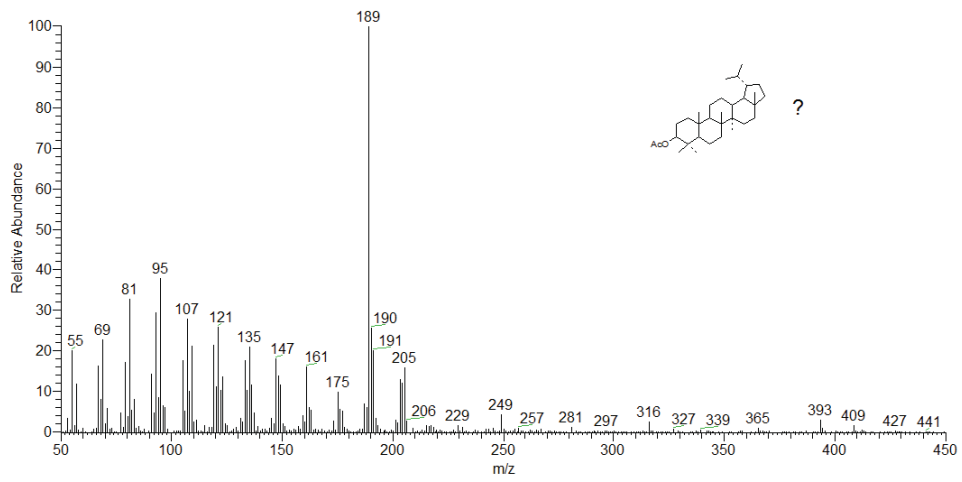
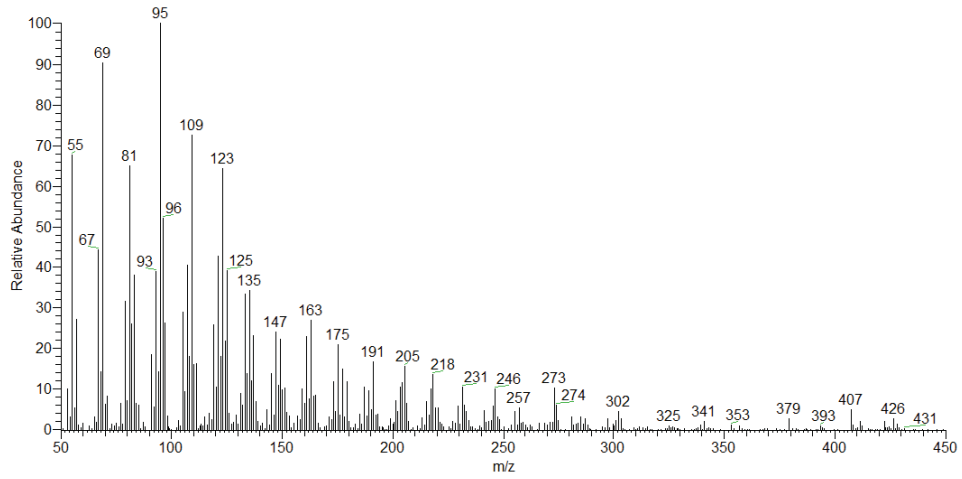
## SPECTRES DE MASSE DES COMPOSES POLYCYCLIQUES DE STRUCTURES INCONNUES PRESENTS DANS LES LIPIDES SIMPLES NEUTRES-BASIQUES DE LA TOURBE DE FRASNE



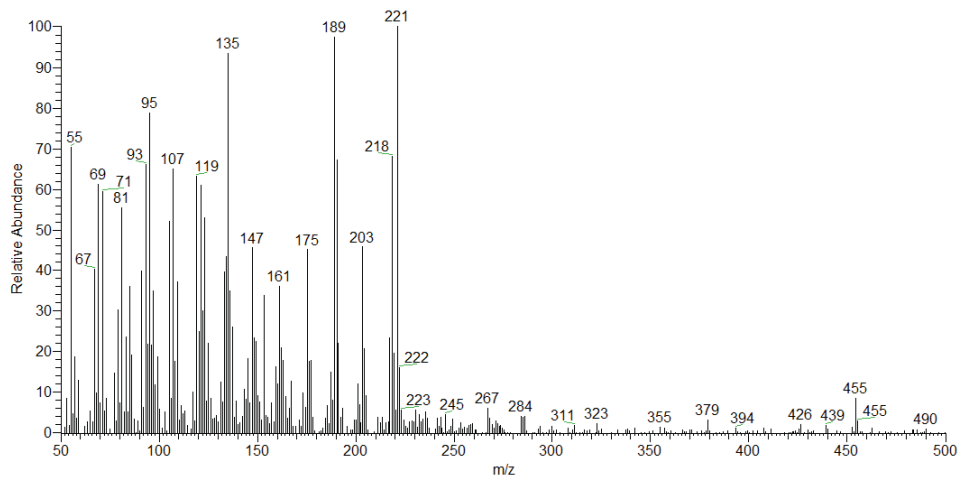
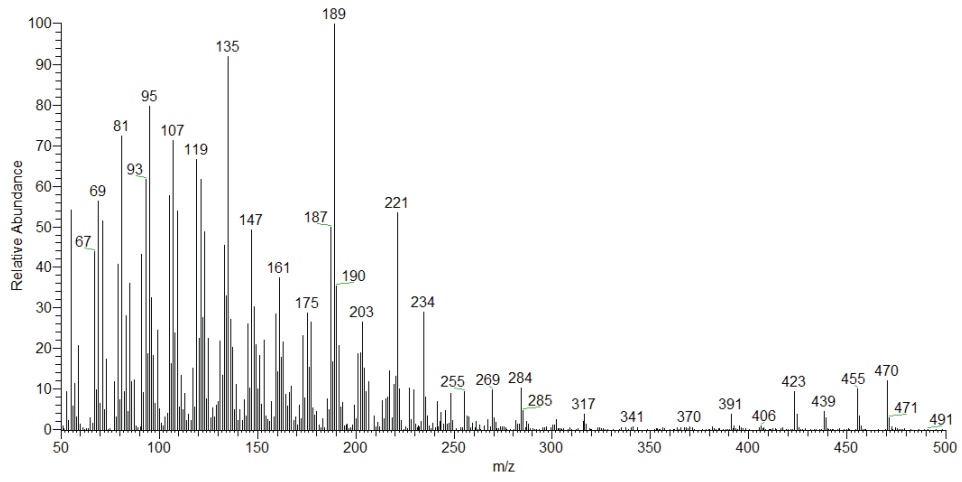
# Annexes



# Annexes



# Annexes



## SPECTRES DE MASSE DES COMPOSES POLYCYCLIQUES DE STRUCTURES INCONNUES PRESENTS DANS LES LIPIDES SIMPLES ACIDES DE LA TOURBE DE FRASNE

