

Note

Développement de microorganismes dans le bois de cœur de chêne (*Quercus petraea* Liebl) au cours du séchage naturel à l'air libre

N Vivas^{1*}, K Amrani-Joutei², Y Glories³, B Doneche⁴,
C Brechenmacher⁵

¹ Tonnellerie Demptos SA, détaché à la faculté d'œnologie,
université Victor-Segalen-Bordeaux-II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence, France ;

² Département de biologie, faculté des sciences et techniques, Fès Saïss, BP 2202, Fès, Maroc ;

³ Laboratoire de chimie appliquée, faculté d'œnologie, université Victor-Segalen-Bordeaux-II ;

⁴ Laboratoire de biochimie appliquée, unité associée Inra – faculté d'œnologie,
université Victor-Segalen-Bordeaux II ;

⁵ Centre commun de microscopie, université Victor-Segalen-Bordeaux-II,
146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux, France

(Reçu le 22 décembre 1995 ; accepté le 16 avril 1997)

Summary — Development of microorganisms in the oak heartwood (*Quercus petraea* Liebl) during air drying in open air conditions. Different samples of oak heartwood *Quercus petraea* Liebl species were observed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. We studied four durations of air drying (6, 12, 18 and 24 months) and different depths (0, 3, 5 and 10 mm). The photographs show a large colonisation of the wood surface by different spores during the first 6 months, but only a few of them are able to sprout and produce a mycelium. The mycelium is able to penetrate inside the wood by a fissure. After 12 months we note the presence of mycelium, in very limited numbers, in the spring vessels. From this point, the fungi are able to penetrate into the heartwood cell wall.

Oak wood / *Quercus petraea* Liebl / air drying in open air / scanning electron microscopy / transmission electron microscopy / spores / mycelium / colonisation

Résumé — Des échantillons de bois de chêne représentant différentes durées de séchage à l'air libre et différentes profondeurs dans la masse du bois sont étudiés en microscopie électronique à balayage et à transmission. On observe après 6 mois de séchage que la surface du bois se recouvre de spores

* Correspondance et tirés à part
Tél : (33) 05 56 84 64 87 ; fax : (33) 05 56 84 64 68

dont un très faible pourcentage germent et forment un mycélium. Au bout de 12 mois, quelques mycélia atteignent les premiers millimètres du bois en pénétrant par des microfissures et gagnent les vaisseaux du bois de printemps. Les champignons ayant atteint les couches profondes se développent abondamment dans la paroi des cellules du bois de cœur.

bois de chêne / *Quercus petraea* Liebl / séchage à l'air libre / microscopie électronique / spores / mycélia / colonisation

INTRODUCTION

Le bois de cœur de chêne *Quercus sp* est fréquemment employé dans la menuiserie, la construction et la fabrication de barriques pour l'élevage des vins et des eaux-de-vie (Villiere, 1966 ; Feuillat et al, 1993). Mais avant son utilisation, on lui fait subir une étape de séchage qui permet d'équilibrer l'humidité du bois avec l'hygrométrie ambiante ; le taux d'humidité retenu est situé approximativement à 15 % (Vivas, 1993a). Dans le cas très particulier de la tonnellerie, le séchage naturel à l'air libre pendant plusieurs mois conduit à des bois secs dont la composition et les caractéristiques physiques sont seules compatibles avec la conservation et la bonification des vins et des eaux-de-vie (Taransaud, 1976).

Au cours du séchage à l'air libre, le bois est soumis aux intempéries. Le vent et les pluies peuvent favoriser l'accumulation et le développement de divers microorganismes (Vivas et al, 1991). Des travaux récents ont montré que la flore fongique du bois de chêne en situation de séchage naturel, d'une durée moyenne de 18 à 24 mois, était constituée d'un faible nombre de microorganismes majoritairement représentés par *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum* et *konigii* (Vivas et Glories 1993) ; mais pour des durées plus longues, le bois est colonisé par une flore très diversifiée (Vivas, 1993b ; Larignon et al, 1994 ; Vivas et al, 1997). Si l'écologie des microorganismes du bois de chêne en cours de séchage a très récemment fait l'objet d'études suivies, en revanche, les travaux sur les mécanismes d'implanta-

tion des spores et des mycelia sont moins développés.

Dans la littérature on retrouve de très nombreux travaux sur la colonisation des bois par les champignons (Kirk et Adler, 1970 ; Kirk et Chang, 1975 ; Haluk et al, 1978 ; Field et Lettinga, 1991 ; Scalbert, 1991 ; Davis et al, 1994) ; cependant les références portant sur le chêne sont relativement rare (Hart et Hillis, 1972 ; Bauch et al, 1991 ; Haluk et al, 1991). L'objet de cette note est de présenter les résultats d'observations en microscopie électronique à balayage et à transmission utiles à la compréhension des voies de colonisation du duramen de chêne au cours de son séchage à l'air libre ; étape essentielle à la production de bois de qualité destiné à la tonnellerie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine et préparation des échantillons de bois

Les échantillons de duramen sont issus de quatre piles de bois *Quercus petraea* Liebl originaire de la forêt de Tronçais (France), stockés sur le parc de la tonnellerie Demptos (Saint-Caprais-de-Bordeaux, Bordeaux, France) entre 1991 et 1993. Les prélèvements effectués sont déposés dans des poches stériles. Des prélèvements sont pratiqués après 6, 12, 18 et 24 mois de séchage. Le bois de surface (1 mm) et les couches plus profondes (3, 5, 10 mm) sont collectés délicatement avec un scalpel brûlé à la flamme.

Microscopie électronique à balayage

Les fragments sont directement disposés sur un plot d'observation de microscopie électronique à balayage. Les différents plots sont conservés dans une boîte de Petri. Avant la préparation des échantillons, les plots sont stockés 48 h à l'étuve à 60 °C. Les échantillons sont alors métallisés par bombardement ionique et sont ainsi recouvert d'une fine pellicule d'or. Les observations sont pratiquées sur un microscope électronique à balayage Sem 515 (Philips) équipé d'un détecteur d'électrons secondaires.

Microscopie électronique à transmission

Des fragments de duramen de *Quercus petraea* Liebl sont fixés pendant 2 h à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon de Sørensen 0,1 M à pH 7,2 (phosphates monopotassique et disodique) ; les pièces sont ensuite rincées plusieurs fois dans le même tampon, post-fixées 2 h à 4 °C dans une solution de tétr oxyde d'osmium à 0,1 %, et rincées à nouveau plusieurs fois dans le tampon. Elles sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol présentant des concentrations croissantes de 40 à 95 % vol jusqu'à trois bains d'éthanol absolu. Après passage intermédiaire par l'oxyde de propylène, elles sont enfin incluses dans une résine époxyde (Épon 812). Des coupes ultramincines contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb sont recueillies et observées avec un microscope électronique à transmission CM10 (Philips).

RÉSULTATS

Les différentes observations pratiquées montrent que la colonisation de la surface du duramen est précoce puisque après les 6 premiers mois on observe une forte accumulation de spores (fig 1.1). En revanche les couches profondes restent en comparaison assez peu atteintes ; seulement quelques mycelia atteignent 3 mm de profondeur après 12 mois et moins de 10 mm après 24 mois. Les spores ont un diamètre de 1,5 à 9 µm et leur population après 6 mois varie de 150 à 600 spores par mm² et peut être

multipliée par 5 ou par 10 après 24 mois de séchage.

Certaines spores émettent une hyphes mycélienne (fig 1.1–3) qui poursuit son développement à la surface du duramen. Par rapport au nombre total de spores le taux de germination reste faible. Si on estime sur plusieurs clichés le pourcentage de spores ayant émis un mycélium on obtient des valeurs moyennes de 0,1 à 6 %. Ce résultat suggère que les spores ne sont pas fertiles ou que seulement un petit nombre de souches fongiques sont adaptés au milieu bois.

La colonisation des couches superficielles se fait par la pénétration de mycélia dans des microfissures présentes à la surface du duramen (fig 2.1–2). Ce mode de colonisation a pour origine soit des spores situées à proximité de la fissure (fig 2.2) soit des spores plus éloignées qui ont émis un mycélium traçant à la surface du bois (planche II, n° 2). Dans les vaisseaux de bois de printemps on peut observer des spores qui germent et produisent des hyphes mycéliennes qui se développent dans des ponctuations intervasculaires tapissant toute la surface des vaisseaux (fig 2.3). Ce mode de colonisation permet d'atteindre facilement d'autres vaisseaux du bois de printemps dans des zones plus profondes. Dans de nombreux cas nous avons observé des mycélia situés dans des vaisseaux et recouverts de polysaccharides (fig 2.4).

Un certain nombre de mycelia tentent de pénétrer dans la paroi pour atteindre d'autres cellules plus éloignées et intactes. D'abord, le mycélium provoque une altération de la surface des parois cellulaires (fig 3.1–2), puis en continuant son développement il pénètre progressivement dans les couches plus profondes (fig 3.3–4). Sur le cliché 1 de la figure 3 sont regroupés les différents stades de la colonisation d'une paroi cellulaire. Les zones sombres des tissus à proximité du mycélium correspondent aux enzymes exocellulaires du champignon. Leur rôle est de digérer la paroi

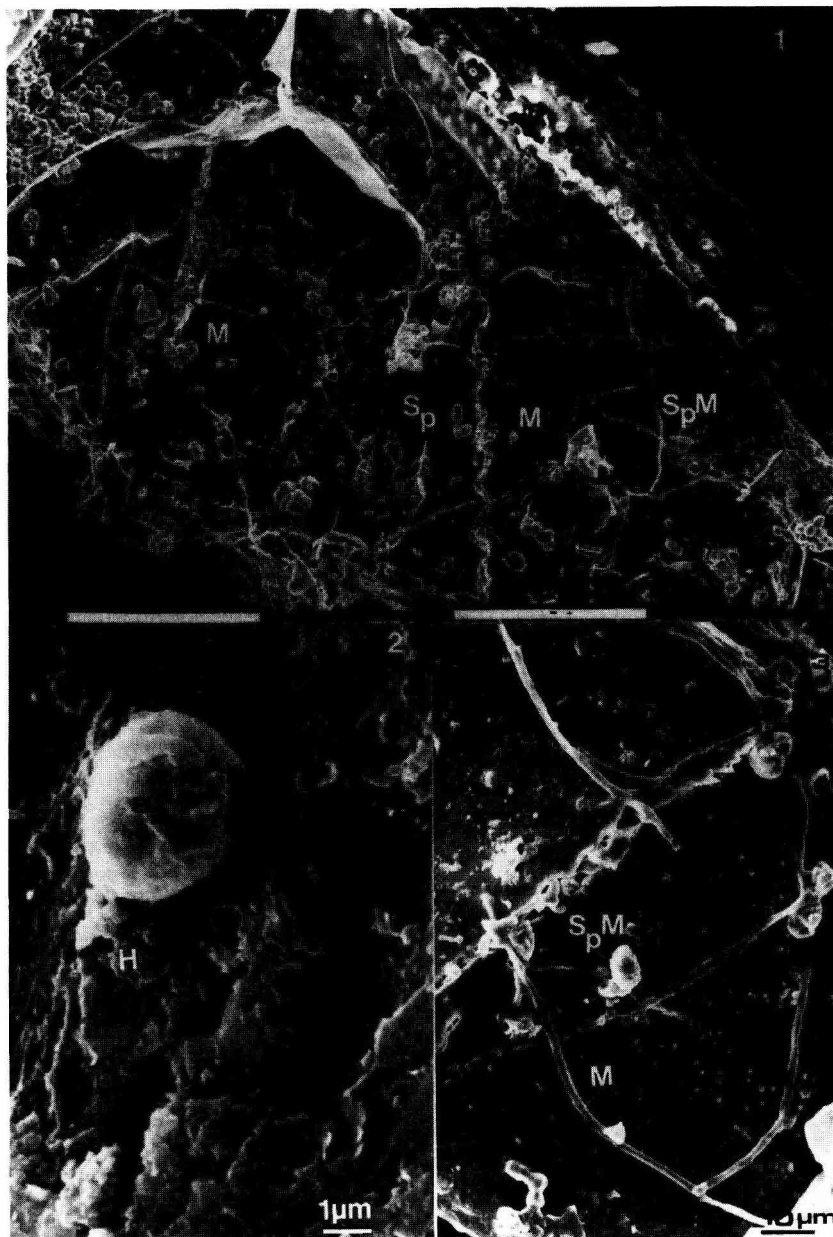


Fig 1. Colonisation de la surface du bois de chêne par divers microorganismes. 1. Observation de la surface d'un échantillon de chêne après 6 mois de séchage à l'air libre. On note la présence d'une grande quantité de spores (Sp) dont certaines émettent une hyphe (SpM) qui se développe et forme un mycélium (M). 2. Détail d'un spore (Sp) émettant une hyphe (h). 3. Détail de la surface d'un échantillon de chêne après 12 mois de séchage à l'air libre. On observe des mycéliums traçant (M) et des spores en cours de germination (SpM) ; certains mycéliums pénètrent (Mp) dans une microfissure (mF).



Fig 2. Colonisation des couches superficielles du bois de chêne. 1. Détail d'une microfissure (mF) par laquelle pénètrent les mycélija (M) issus de la germination de spores (Sp) situées en bordure. 2. Détail d'une microfracture (mF) colonisée par de nombreux mycélija (M) et de spores déposées au-dessus (Sp). 3. Spore présente dans un vaisseau de bois de printemps (3 mm de profondeur, 12 mois de séchage). L'hyphé (h) produite par la spore (Sp) se développe à l'intérieur d'une ponctuation (P) et sécrète des polysaccharides (P_1). 4. Observation d'un amas de mycélija (M) dans un vaisseau de bois de printemps (3 mm de profondeur, 12 mois de séchage) recouvert de polysaccharides (po).



Fig 3. Pénétration des mycélija dans les parois des cellules du bois de chêne. 1. Vue générale d'une cellule colonisée et intacte. On observe la paroi (Pa) présentant des invaginations (flèches) liées à la présence de mycélija (*). Les différents degrés d'attaque de la paroi sont donnés par les chiffres 1, 2 et 3. (La barre d'échelle représente 1 μ m.) 2. Détail d'une invagination (1), on y retrouve des résidus de la paroi du champignon (rp) riche en mélanine (Mel). On observe, dans la paroi de la cellule, que la zone proche du mycélium est riche en différentes enzymes exocellulaires de digestion (Ez). (La barre d'échelle représente 0,5 μ m.) 3. Sur ce cliché le mycélium (M) a pénétré dans la paroi (2), ce qui lui a permis de conserver son intégrité lors de la coupe des échantillons. Sa paroi est intacte, on y observe de la mélanine (Mel) et à proximité, dans le milieu extérieur, les enzymes de digestion (Ez). (La barre d'échelle représente 0,5 μ m.) 4. C'est le dernier stade (3) de pénétration, le champignon est profondément implanté dans la structure tissulaire du chêne. (La barre d'échelle représente 0,5 μ m.) 5. Au contact de la lamelle moyenne (Lm) riche en lignine, le champignon produit, à partir de son réticulum endoplasmique, des vésicules (v) contenant des enzymes de digestion. Elles ont pour but d'assurer une détoxification rapide de ce milieu hostile (m : mitochondrie). (La barre d'échelle représente 0,5 μ m.)

(fig 3.2–4). On observe également, dans la paroi du mycellium, de la mélanine (fig 3.2–4). Lorsque le champignon se trouve dans une zone particulièrement toxique, tel que la lamelle moyenne de la paroi, riche en lignine, il produit de nombreuses vésicules (fig 3.5).

DISCUSSION

Le duramen de chêne entreposé à l'air libre est rapidement recouvert d'une grande quantité de spores. Nous avons montré dans une étude précédente (Vivas et al, 1991) que les vents et les pluies sont les principaux facteurs de l'ensemencement. Cependant un nombre très limité de spores ont la possibilité de se développer et de former un mycellium. Ceci est lié aux conditions défavorables du milieu bois. La faible quantité de source de carbone, généralement sous forme complexe non directement assimilable, d'hétérosides phénoliques et de polysaccharides (Vivas et Glories, 1993), le milieu relativement sec adapté aux moisissures xérophiles (Griffin, 1969), la température de surface élevée en période estivale (Vivas, 1993a), la présence dans le bois de cœur duraminisé de grandes quantités de polyphénols toxiques pour de nombreux champignons (Scalbert, 1992) et les phénomènes de compétition et d'inhibition interspécifique (Wyllie et Morenhousse, 1977 ; Vivas et al, 1997) sont les facteurs responsables des difficultés de croissance sur le bois. Dans ces conditions, la mise en culture sur milieu gélosé complet d'un frottis de la surface du bois conduit à l'isolement et à l'identification d'une flore fongique très variée (Chatonnet et al, 1994), alors qu'en réalité seulement un nombre très limité de souches isolées est capable de se développer d'une part sur un milieu riche en tanins (Vivas et al, 1997) et d'autre part dans les conditions drastiques du bois (Vivas, 1993a). Ainsi la flore caractéristique du bois de chêne est très réduite.

La colonisation de la surface se fait par l'émission de mycélia traçant ; certains d'entre eux rencontrent une microfissure et pénètrent alors dans la masse du duramen. On retrouve dans les vaisseaux de bois de printemps des mycélia réalisant un cycle végétatif complet en émettant des spores qui germent à leur tour et passent parfois dans un autre vaisseau par l'intermédiaire de ponctuations intervasculaires. Cependant les difficultés de pénétration dans les couches profondes et l'humidité du bois rapidement trop faible (< 20 % en 6 mois) pour permettre un développement satisfaisant (Bauer, 1987) ne permettent qu'une colonisation superficielle du bois à proximité des sources protéiques issus des thalles en cours d'autolyse (Vivas et al, 1997) et des eaux de pluie.

Mais la colonisation du duramen n'est pas seulement superficielle, elle se fait aussi, plus discrètement dans la parois des cellules mortes. Les altérations des parois cellulaires du bois son bien connues, mais c'est essentiellement des attaques par les bactéries qui ont été rapportées (Greaves, 1970 ; Blanchette et al, 1991). En accords avec d'autres auteurs (Srebotnik et Messner, 1991 ; Murmanis et al, 1987 et 1988) on observe une invagination de la parois à proximité du mycellium. La zone de contact entre champignon et parois cellulaires est constituée de produits qui sont fortement contrastés sous le flux d'électrons ; ce sont des produits de faible masse moléculaire issus de la dégradation de la paroi et des accumulations d'enzymes exocellulaires de digestion (Kirk et Adler, 1970 ; Srebotnik et Messner, 1991). Dans le cas de mycorrhization Pargney et Brimont (1995) décrivent les étapes de la pénétration : le champignon libère des enzymes de digestion destinées à la dégradation de la paroi, au contact des polyphénols il en incorpore une fraction sur sa propre paroi par liaison tanins-polysaccharides. Vivas et Glories (1993) ont montré qu'*A pullulans* est apte à produire de grandes quantités de polysaccharides exocellulaires,

solubles en milieu aqueux, ce qui pourrait expliquer une partie du phénomène de détoxification sur le front d'avancement du champignon par combinaison des tanins avec ces polymères (Scalbert, 1992). En outre, la modification de composition du bois de chêne observée au cours du séchage naturel (Vivas et al, 1991 ; Vivas, 1993b) peut être influencée par les enzymes extracellulaires libérées par le mycélium directement dans les parois des cellules du bois duraminisé. Enfin, lors de l'étude du niveau de contamination du bois par les champignons, en particulier par observations visuelles en microscopie électronique à balayage (Chatonnet et al, 1994), la fraction abondante du mycélium contenu dans les parois n'est pas prise en compte et le niveau de colonisation est sous-estimé. L'ensemble de ces phénomènes participe à la modification de la structure des parois, des implications sur la porosité du bois sont envisageables (Greaves, 1970). Cet aspect est important puisque la porosité du bois des barriques participe à des phénomènes d'oxydoréduction, conduisant à la modification de composition et de qualité des vins et des eaux-de-vie élevés dans ces conditions. Des études en cours se proposent de répondre à cette question.

RÉFÉRENCES

- Bauch J, Hundt H, Weibman G, Lange W, Kubel H (1991) On the cause of yellow discoloration of oak heartwood (*Quercus sect robur*) during drying. *Holzforschung* 45, 79-85
- Bauer C (1987) Étude des relations entre l'humidité du bois et l'attaque fongique. In : *Actes du colloque Sciences et industries du bois*, tome 1, 205-212
- Blanchette RA, Iiyama K, Abad AR, Cease KR (1991) Ultrastructure of ancient buried wood from Japan. *Holzforschung* 45, 161-168
- Chatonnet P, Boidron JN, Dubourdieu D (1994) Nature et évolution de la microflore du bois de chêne au cours de son séchage et de son vieillissement à l'air libre. *J Int Sci Vigne Vin* 28, 185-201
- Davis MF, Schroeder HR, Maciel GE (1994) Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of wood decay. I. White rot decay of Colorado blue spruce. *Holzforschung* 48, 99-105
- Feuillat F, Huber F, Keller R (1993) La porosité du bois de chêne (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl) utilisé en tonnellerie. Relation avec la variabilité de quelques caractéristiques physiques et anatomiques du bois. *Rev Fr Œnol* 142, 5-19
- Field JA, Lettinga G (1992) Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In : *Plant polyphenols* (RW Hemingway, PE Laks, eds), Plenum Press, New York, 673-692
- Greaves H (1970) The effect of some wood-inhabiting bacteria on the permeability characteristics and microscopic features of *Eucalyptus regnans* and *Pinus radiata* sapwood and heartwood. *Holzforschung* 24, 6-14
- Griffin DM (1969) Soil water in the ecology of fungi. *Ann Rev Phytopathology* 7, 289-310
- Haluk JP, Trape O, Metche M (1978) Ozonolyse et biodégradation de la lignine de peuplier. In : *CR JIEP*, 8, Nancy, 214-240
- Haluk JP, Schloegel F, Metche M (1991) Chimie de la couleur du bois. Étude comparative des constituants polyphénoliques dans le chêne sain et le chêne coloré. *Holzforschung* 45, 437-444
- Hart JH, Hillis WE (1972) Inhibition of wood-rotting fungi by ellagitannins in the heartwood of *Quercus alba*. *Phytopathology* 62, 620-626
- Kirk TK, Adler E (1970) Methoxyl deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. *Acta Chem Scand* 24, 3379-3390
- Kirk TK, Chang HM (1975) Decomposition of lignin by white-rot fungi. *Holzforschung* 29, 56-64
- Larignon P, Roulland C, Vidal JP, Cantagrel R (1994) Étude de la maturation en Charentes des bois de tonnellerie. In : *Compte rendu station viticole du bureau national interprofessionnel du cognac*
- Murmanis LL, Highley TL, Palmer JG (1987) Cytochemical localization of cellulases in decayed and nondecayed wood. *Wood Sci Technol* 21, 101-109
- Murmanis LL, Highley TL, Palmer JG (1988) The action of isolated brown-rot cell-free culture filtrate, $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{++}$, and the combination of both on wood. *Wood Sci Technol* 22, 59-66
- Pargney JC, Brimont A (1995) Production of concentrated polyphenols by the root cap cells of *Corylus* associated with tuber: ultrastructure study and element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Trees* 9, 149-157
- Scalbert A (1991) Tannins in woods and their contribution to microbial decay prevention. In : *Plant polyphenols* (RW Hemingway, PE Laks, eds), Plenum Press, New York, 935-952
- Scalbert A (1992) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883
- Srebotnik E, Messner K (1991) Immunoelectron microscopic study of the porosity of brown-rot degraded pine wood. *Holzforschung* 45, 95-101

- Taransaud D (1976) *Le livre de la tonnellerie*. La roue des livres Diffusion, Paris
- Villière A (1966) *Le séchage des bois*. Dunod, Paris
- Vivas N, Glories Y, Doneche B, Gueho E (1991) Observations sur la microflore du bois de chêne (*Quercus sp.*) au cours de son séchage naturel. *Ann Sci Nat (Botanique)* 11, 149-153
- Vivas N (1993a) *Le séchage naturel du bois de chêne destiné à la fabrication de barriques*. Avenir Œnologie, Château-Chaintré
- Vivas N (1993b) Les phénomènes liés à la maturation du bois de chêne pendant son séchage. *Rev Œnol* 70, 17-21
- Vivas N, Glories Y (1993) Étude de la flore fongique du chêne (*Quercus sp.*) caractéristique du séchage naturel des bois destinés à la tonnellerie. *Cryptogamie Mycol* 14, 127-148
- Vivas N, Glories Y, Donèche B (1997) Incidence de la durée du séchage naturel de *Quercus petraea* Liebl et *Quercus robur* L sur la diversité de la flore fongique en place et sur quelques aspects de son écologie. *J Sci Tech Tonnellerie* 3, 17-25
- Wyllie TD, Morenhouse LG (1977) *Micotoxic Fungi, Mycotoxins and Micotoxicoses*. Vol I-III. Dekker, New York