

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

*Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

*Spécialité : Biotechnologie végétale*

Présentée et soutenue publiquement par

**Mickaël HERBAUT**

Le 13 octobre 2017

---

**Déconstruction de la biomasse lignocellulosique :  
corrélations entre l'activité et la mobilité enzymatiques**

---

Thèse dirigée par **GABRIEL PAËS**

## JURY

Mme Fabienne GUILLON,	Directeur de Recherche,	INRA, Nantes,	<b>Président</b>
M. Gabriel PAËS,	Chargé de Recherche HDR,	INRA, Reims,	<b>Directeur de thèse</b>
Mme Catherine SARAZIN,	Professeur,	Université de Picardie Jules Verne, Amiens,	<b>Rapporteur</b>
M. Richard SIBOUT,	Chargé de Recherche HDR,	INRA, Versailles,	<b>Examineur</b>
Mme Juliane FLOURY,	Maître de Conférences HDR,	Agrocampus Ouest, Rennes,	<b>Invitée</b>





*À ma grand-mère.*



# REMERCIEMENTS

---

---

Ce manuscrit est l'aboutissement de trois ans de travail et d'investissement... Ou pour être plus précis, de trois ans passés à faire des apparitions fréquentes et de plus en plus longues en salle café. Cela a soulevé certaines interrogations, notamment au moment de la rédaction, sur ma capacité à rendre le manuscrit dans les délais impartis (ce que j'ai fait). La version du manuscrit soumise à examen ne comprenait pas de remerciements, que j'ai décidé de rédiger après la soutenance, afin de n'oublier personne. Cette partie a sûrement été la plus difficile à écrire, car j'ai l'impression qu'elle n'est pas à la hauteur de la reconnaissance que j'éprouve pour toutes celles et ceux qui m'ont apportée leur aide au cours de la thèse, et sans qui ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour. Qu'ils trouvent dans ces quelques pages l'expression de ma profonde gratitude.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Gabriel Paës pour la confiance qu'il m'a accordée. J'ai particulièrement apprécié ton encadrement, ta disponibilité, ton écoute et les échanges réguliers que nous avons eus et qui ont permis de me guider et de m'épauler pour mener à bien mon projet, tout en me laissant une grande autonomie. Un grand merci également de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer un séjour en laboratoire en Nouvelle-Zélande dans le cadre de mes recherches. Sans cela, ce paragraphe aurait probablement été plus court et conventionnel.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr Fabienne Guillon, le Pr Catherine Sarazin, le Dr Juliane Floury et le Dr Richard Sibout, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, et pour la discussion intéressante et constructive qui en a découlé lors de la soutenance.

Je tiens également à remercier la Région Grand Est (et l'ancienne Région Champagne-Ardenne) et l'Université de Reims Champagne Ardenne pour le financement de ma thèse.

Un merci tout particulier à Anouck Habrant (maman Anouck) dont j'ai partagé le bureau durant toute ma thèse. Je te remercie tout d'abord pour toute l'aide que tu m'as apportée au quotidien et pour m'avoir formé à la préparation d'échantillons pour leur observation en microscopie confocale qui a constitué le cœur de ma thèse. Je te remercie également pour ta gentillesse et ta grande disponibilité (à tel point que je n'osais parfois plus



rien demander de peur que tu ne laisses tout en plan pour m'aider). Merci également d'avoir accepté avec le sourire l'invasion progressive du bureau par les canards et les licornes. Je repasserai volontiers au laboratoire pour discuter du Dionex et te ravitailler en gâteaux.

Un grand merci également à Brigitte Chabbert pour l'aide scientifique qu'elle m'a apporté au travers des discussions que nous avons eu au cours de ces trois années. Merci de ne pas avoir pris la poudre d'escampette la veille de ma soutenance et d'avoir coupé court à mes tergiversations pour me permettre de faire des choix et de terminer ma présentation dans les temps.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Aya Zoghalmi, qui a effectué son stage de Master 2 avec moi avant de continuer en thèse au laboratoire et de partager mon bureau. Merci pour l'énorme coup de pouce que tu m'as donné pour la caractérisation de la composition chimique de mes échantillons, et merci d'avoir participé à la bonne humeur qui régnait dans le bureau pendant ma dernière année.

Un grand merci également au Dr Lloyd Donaldson qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a donné de précieux conseils concernant la microscopie confocale.

Je remercie les personnes qui m'ont aidé à réaliser mes expériences et à interpréter les résultats. Merci à Olivier Delfosse pour son aide sur la quantification de la teneur en azote de mes échantillons. Merci également de t'être assuré qu'il y ait toujours du café au laboratoire, même si j'ai tout fait, surtout pendant la rédaction, pour épuiser les stocks. Merci à François Gaudard (Françoisiiiiiiiiis \o/) pour l'aide concernant les observations en microscopie électronique et certaines analyses Dionex. Merci aussi pour les fois où t'es occupé de la vaisselle que j'avais malencontreusement « oublié » à côté de l'évier. Je garde en mémoire les bons moments et les conversations sans queue ni tête sur des sujets improbables. Merci également à Amélie Renault pour les analyses en FRET. À toi maintenant de passer des heures enfermée dans le noir pour observer mes échantillons.

J'adresse un merci tout particulier à David Crônier, grand gourou de la caractérisation chimique des parois. Merci d'avoir partagé ton expertise avec moi (en même temps, c'est facile d'être un expert par rapport à moi, quand tu as commencé à l'INRA, j'étais en CP et j'apprenais seulement à lire). Au-delà des bons moments passés ensemble, je retiens la quantité importante de produits chimiques nocifs que tu m'as fait utiliser. Avec toi, même un jus de pomme peut se révéler dangereux.





Merci également à l'ensemble du personnel de l'UMR FARE pour votre bonne humeur au quotidien qui m'a permis de passer de très bons moments pendant ces trois années. Merci aux membres de l'activité matériaux et plus particulièrement à Miguel Pernes et Alain Lemaître (on peut enfin avouer qu'on s'aime bien, non ?) pour les moments de détente et de franche rigolade en salle café. Merci également à Laurence Foulon et Véronique Aguié-Béghin, avec lesquelles j'ai souvent échangé et travaillé, pour votre grande gentillesse. Merci à Delphine LePierres, Agnès Guzzi et Frédéric Doresmus qui m'ont très souvent apporté leur aide ou se sont occupés pour moi des formalités administratives, toujours avec le sourire. Merci également aux gens du deuxième étage, notamment Gonzague Alavoine à qui j'empruntais souvent les tamis en oubliant de les rendre et qui ne m'en a jamais tenu rigueur, Gwenaëlle Lashermes pour les discussions et les conseils sur la période de rédaction et l'après-thèse, mais aussi Sylvie Million pour ta sympathie et ta bienveillance, et Francis Million pour l'aide que tu m'a apportée pour préparer de mes échantillons à partir des tiges et des morceaux de branches en début de thèse.

Je remercie les autres non-permanents du laboratoire qui m'ont soutenu et remonté le moral, le plus souvent sans même le savoir et sans lesquels je n'aurai probablement pas eu le courage de terminer cette thèse. Un très grand merci à Justine, Laurent, Raphaël, Anne, Aya (encore une fois), Florian, Flora, Quentin, Loubna, Terence, Romain, mais aussi aux petits anges partis trop tôt Thomas, Jordane, Simon, Charlène, Raquel, Monica et Margarita. Ce paragraphe ne saurait rendre justice aux excellents moments passés en votre compagnie. Même une anti-thèse ne suffirait pas....

Un grand « ouais les mecs » à mes amis de longue date, Audérick, Jean-Luc, Maël, Mathilde et Mathieu, présents depuis des années et qui m'ont aidé à maintenir le cap. Merci à vous pour tous les bons moments passés ensemble, et merci d'avance pour ceux à venir.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix. Sans vous, je ne serais pas arrivé là où j'en suis aujourd'hui. Merci à mon frère de m'avoir montré la voie scientifique au début de mes études. Merci à ma mère, pour tous les bons petits plats que je récupérais à chaque fois que je rentrais. Merci à mon père et à ma sœur pour la relecture attentive et la correction du manuscrit. Et enfin, j'ai une pensée émue pour ma grand-mère, qui ne m'aura pas vu achever ce parcours, mais qui, je le sais, aurait été extrêmement fière.



# RÉSUMÉ

---

---

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer des facteurs pouvant être considérés comme des marqueurs génériques de la récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. Des analyses chimiques, spectroscopiques et microscopiques ont permis d'étudier la relation entre la dynamique enzymatique et certains facteurs descriptifs de la composition chimique et de la structure d'échantillons de biomasse (blé, miscanthus, peuplier) soumis à quatre prétraitements contrastés.

La structure et la composition de la lignine sont les principaux acteurs de la récalcitrance pour chaque biomasse, comme le montre la corrélation négative entre la fluorescence et le rendement d'hydrolyse. Une augmentation de la porosité améliore la saccharification de manières différentes pour chaque biomasse en raison des différences d'organisation de leurs parois. Des mesures de mobilité de sondes fluorescentes de tailles similaires à celles des enzymes ont révélé que les prétraitements impactent la structure pariétale de manière plus importante que la saccharification. Les tailles des pores des parois de peuplier doivent être au moins 5 fois supérieures au diamètre des enzymes pour que celles-ci puissent diffuser efficacement dans les parois, probablement en raison d'une obturation des pores causée par les interactions des enzymes avec la lignine. Des mesures d'interaction des sondes avec la lignine ont montré que ces dernières dépendent à la fois de la structure du polymère et de son accessibilité déterminée par la taille des pores.

Nos résultats ont permis de fournir des informations sur la récalcitrance qui pourront servir de pistes pour permettre une meilleure valorisation de la biomasse.

Mots-clés : biomasse lignocellulosique – récalcitrance – enzymes – diffusion – lignine – porosité – fluorescence – FRAP – FRET



# **ABSTRACT**

---

---

Biomass recalcitrance to enzymatic hydrolysis is a multifactorial phenomenon still challenging to understand. The main objective of this work was to determine factors that could be considered as generic markers of this recalcitrance. The relationship between enzymes dynamics and cell wall chemical and structural properties was studied using a panel of contrasted biomass samples (wheat straw, miscanthus, poplar) submitted to four different pretreatments, using a combination of chemical, spectroscopic and microscopy analyses.

Lignin structure and composition were found to be the main factors explaining recalcitrance for all three biomasses, as highlighted by the negative correlations between fluorescence intensity and glucose yield. Increasing porosity improves saccharification differently for each species reflecting the different organisation of their cell walls. Mobility measurements of probes representative of enzyme size revealed that pretreatments have a more important impact on cell wall structure than the subsequent saccharification. Both the activity and mobility of enzymes are governed by pores sizes whose diameter need to be at least 5 times the diameter of the enzymes for the catalyst to diffuse efficiently in poplar cell walls, likely due to a fill-in effect caused by interactions with lignin. The intertwining between lignin and pores sizes was emphasized by measurements of the probes interactions with lignin revealing that binding depended on lignin structure, but also on its accessibility and on cell wall porosity.

Our strategy and results provide insights for the improvement of pretreatment methods allowing a better valorisation of lignocellulosic biomass.

Keywords: lignocellulose – recalcitrance – enzymes – diffusion – lignin – porosity  
fluorescence – FRAP – FRET



# LABORATOIRES D'ACCUEIL

---

---

La majorité des résultats présentés dans ce manuscrit a été obtenue au sein de l'Unité de Recherche Mixte Fractionnement des AgroRessources et Environnement de Reims, sous cotutelle de l'Institut National de la Recherche Agronomique et de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

UMR INRA/URCA Fractionnement des AgroRessources et Environnement

Centre de Recherche en Environnement et Agronomie

2, esplanade Roland Garros, BP224, 51686 Reims cedex



Au cours de ma thèse, j'ai également réalisé un séjour de 2 semaines au sein du laboratoire du Dr Lloyd Donaldson dans le but d'appliquer certaines techniques de microscopies confocale et électronique.

Scion

Te Papa Tipu Innovation Park

49 Sala Street, Rotorua 3010, Private Bag 3020, Rotorua 3046, Nouvelle-Zélande



Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été financés par la Région Grand Est.







# VALORISATION DES TRAVAUX

---

---

## PUBLICATIONS

### **Multimodal analysis of pretreated biomass highlights generic markers of biomass recalcitrance**

M. Herbaut, A. Zoghalmi, A. Habrant, X. Falourd, L. Foucat, B. Chabbert, G. Paës  
Article soumis dans *Biotechnology for Biofuels*.

### **Light scattering analysis of the hydrodynamic radii of commercial dextran- and PEG-based fluorescent probes**

M. Herbaut, G. Paës  
Article soumis dans *PLOS ONE*.

### **Analysis of poplar porosity and accessibility reveals nanopores govern saccharification**

M. Herbaut, A. Zoghalmi, G. Paës  
Article finalisé en attente de parution des deux précédentes publications.

### **Combined fluorescence approaches to assess cell wall accessibility in softwood and hardwood pretreated biomass**

B. Chabbert, M. Herbaut, A. Vaidya, A. Habrant, C. Terryn, G. Paës, L. Donaldson  
Article soumis dans *Biotechnology for Biofuels*.

### **Action of lytic polysaccharide monooxygenase on plant tissue is governed by cellular type**

B. Chabbert, A. Habrant, M. Herbaut, L. Foulon, V. Aguié-Béghin, S. Garajova, S. Grisel, C. Bennati-Granier, I. Gimbert-Herpoël, F. Jamme, M. Réfrégiers, C. Sandt, J.-G. Berrin and G. Paës  
Article accepté dans *Scientific Reports*.

## COMMUNICATIONS ORALES

### **Multimodal fluorescence analysis of plant cell walls**

M. Herbaut, A. Habrant, B. Chabbert, G. Paës  
14<sup>th</sup> International Congress for Stereology & Image Analysis  
06 - 10 juillet 2015 – Liège – Belgique

### **Correlations between lignocellulolytic enzymes activity and mobility**

M. Herbaut, G. Paës  
1<sup>st</sup> Explore Lignocellulolytic Biomass Congress  
22 et 23 juin 2016 – Reims – France



**Fluorescent probes to determine biomass characteristics impacts on lignocellulolytic enzymes activity and mobility**

M. Herbaut, G. Paës

253<sup>rd</sup> American Chemical Society Meeting

2 - 6 avril 2017 – San Francisco – États-Unis

**Fluorescent probes as indicators of biomass enzymatic digestibility**

M. Herbaut, G. Paës

4<sup>th</sup> International Symposium on Green Chemistry

16 - 19 mai 2017 – La Rochelle – France

**COMMUNICATIONS PAR AFFICHE**

**Impact of pretreatment on fluorescent probes mobility inside pretreated wheat straw cell walls**

M. Herbaut, G. Paës

4<sup>th</sup> International Workshop on Image Analysis Methods for the Plant Sciences

21 et 22 septembre 2015 – Louvain-La-Neuve – Belgique

**Impact of pretreatment on probes mobility inside plant cell walls**

M. Herbaut, G. Paës

5<sup>ème</sup> édition des journées Condorcet

5 et 6 juillet 2016 – Gembloux – Belgique

**Fluorescence microscopy to assess poplar pretreatments effect on enzymes mobility**

M. Herbaut, A. Zoghلامي, A. Habrant, G. Paës

Focus on Microscopy 2017

09 - 12 avril 2017 – Bordeaux – France



# SOMMAIRE

---

---

<b>Introduction générale .....</b>	<b>37</b>
<b>Contexte bibliographique.....</b>	<b>43</b>
1 La valorisation de la biomasse lignocellulosique .....	44
1.1 Les cultures dédiées .....	45
1.1.1 Le miscanthus.....	45
1.1.2 Le peuplier .....	47
1.2 Les résidus agricoles .....	50
1.2.1 Les cultures céréalières .....	51
1.2.2 La paille de blé .....	51
2 La paroi végétale.....	52
2.1 La cellulose.....	53
2.2 Les hémicelluloses.....	55
2.3 La lignine.....	57
2.4 Autres composés d'intérêt.....	60
2.4.1 La pectine.....	60
2.4.2 Les protéines pariétales.....	61
2.5 Organisation de la paroi végétale .....	61
2.5.1 La lamelle moyenne.....	62
2.5.2 La paroi primaire .....	62
2.5.3 La paroi secondaire.....	63
3 Valorisation de la biomasse lignocellulosique .....	65
3.1 Le concept de bioraffinerie .....	65
3.2 La bioraffinerie de deuxième génération .....	66
3.3 La valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique .....	68
4 Les enzymes lignocellulolytiques.....	69
4.1 Classification des enzymes lignocellulolytiques .....	69
4.2 Les cellulases.....	70
4.2.1 Importance et diversité des cellulases.....	70
4.2.2 Mode d'action des cellulases .....	71
4.2.3 Synergie au sein du système cellulolytique .....	73

4.3	Les hémicellulases .....	74
4.4	Structure modulaire des glycoside hydrolases .....	77
4.5	Les activités auxiliaires .....	78
4.5.1	Les enzymes lignolytiques radicalaires .....	79
4.5.2	Les <i>Lytic Polysaccharides Mono-Oxygenases</i> (LPMO).....	79
4.6	Les protéines accessoires .....	81
5	La récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique .....	82
5.1	Les facteurs structuraux .....	83
5.2	Facteurs relatifs à la lignine.....	84
5.3	Facteurs relatifs aux polysaccharides.....	86
6	Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....	87
6.1	Prétraitements biologiques .....	89
6.2	Prétraitements physiques.....	90
6.3	Prétraitements chimiques .....	90
6.3.1	Prétraitement à l'acide dilué.....	90
6.3.2	Prétraitement au liquide ionique.....	92
6.3.3	Prétraitement au chlorite de sodium .....	94
6.3.4	Autres prétraitements chimiques .....	95
6.4	Prétraitements physico-chimiques .....	97
6.4.1	Prétraitement hydrothermique.....	97
6.4.2	Autres prétraitements physico-chimiques.....	98
7	Évaluation de la récalcitrance des parois .....	100
7.1	Analyse des caractéristiques de la biomasse .....	100
7.2	Apport des techniques de microscopie .....	101
7.3	Analyse de la dynamique enzymatique.....	101
	<b>Objectifs de la thèse et stratégie de recherche .....</b>	<b>103</b>
1	Objectifs scientifiques.....	104
2	Stratégie de recherche .....	104
2.1	Constitution d'un panel d'échantillons de biomasses contrastés .....	104
2.2	Stratégie d'étude de la dynamique enzymatique .....	106
3	Présentation des résultats .....	106
3.1	Chapitre 1 .....	106
3.2	Chapitre 2 .....	107
3.3	Chapitre 3 .....	107

3.4	Chapitre 4 .....	108
3.5	Chapitre 5 .....	108
<b>Matériels et Méthodes .....</b>		<b>109</b>
1	Biomasses sélectionnées .....	110
1.1	Paille de blé .....	110
1.2	Miscanthus .....	110
1.3	Peuplier .....	111
1.4	Préparation des échantillons de biomasse .....	111
1.4.1	Inclusion des fragments dans le polyéthylène glycol (PEG) .....	111
1.4.2	Broyage des fragments de biomasse lignocellulosique .....	112
1.4.3	Ultra broyage des échantillons de biomasse lignocellulosique .....	112
2	Prétraitements .....	112
2.1	Prétraitement à l'acide dilué .....	112
2.2	Prétraitement hydrothermique .....	113
2.3	Prétraitement à l'Émim-acétate .....	113
2.4	Prétraitement au chlorite de sodium .....	114
3	Hydrolyse enzymatique .....	114
3.1	Détermination de l'activité FPU du cocktail Cellic® Ctec2 .....	114
3.2	Détermination de la teneur en protéines du cocktail enzymatique .....	115
3.3	Détermination des activités glucosidase et xylosidase .....	116
3.4	Saccharification des échantillons de biomasse lignocellulosique .....	116
3.5	Chromatographie ionique échangeuse d'anions .....	117
4	Détermination de la composition chimique des échantillons de biomasse .....	117
4.1	Composition en sucres pariétaux par hydrolyse acide .....	117
4.2	Détermination de la teneur en lignine .....	118
4.3	Quantification des protéines pariétales par combustion catalytique .....	118
4.4	Caractérisation de la composition monomérique de la lignine .....	119
4.5	Analyse des liaisons des sous-unités de la lignine par RMN .....	120
5	Analyse de la structure des échantillons de biomasse .....	120
5.1	Mesure de porosité par Résonance Magnétique Nucléaire .....	120
5.2	Microscopie électronique à balayage à émission de champ .....	121
5.3	Microscopie électronique à balayage .....	121
6	Caractérisation des sondes fluorescentes .....	121
6.1	Analyse par diffusion statique de la lumière .....	121

6.2	Analyse par diffusion dynamique de la lumière .....	122
6.3	Spectroscopie de fluorescence.....	122
7	Microscopie confocale de fluorescence .....	123
7.1	Réalisation de coupes pour les observations microscopiques .....	123
7.2	Observations de l'autofluorescence des parois végétales .....	123
7.2.1	Fluorescence Recovery After Photobleaching .....	124
7.2.2	Förster Resonance Energy Transfer .....	125
<b>Résultats et discussion .....</b>		<b>129</b>
<b>Chapitre 1 .....</b>		<b>131</b>
	Résumé étendu.....	132
	Abstract .....	134
	Background.....	135
	Material and methods.....	136
	Results and discussion .....	141
	Conclusion.....	160
	Acknowledgments .....	161
	References .....	161
	Supplementary data.....	167
<b>Chapitre 2 .....</b>		<b>169</b>
	Résumé étendu.....	16970
	Abstract .....	172
	Introduction .....	173
	Materials and methods .....	175
	Results and discussion .....	177
	Correlation between MW and $R_H$ .....	183
	Conclusions .....	185
	Acknowledgments .....	186
	References .....	186
	Supporting information .....	190
<b>Chapitre 3 .....</b>		<b>191</b>
	Résumé étendu.....	192
	Abstract .....	194
	Introduction .....	195
	Material and methods.....	196



Results and discussion .....	200
Conclusion.....	214
Acknowledgments .....	215
References .....	215
<b>Chapitre 4 .....</b>	<b>221</b>
Résumé étendu.....	222
Abstract .....	224
Introduction .....	225
Materials and Methods.....	227
Results .....	229
Discussion .....	236
Conclusions .....	240
Acknowledgements.....	241
References .....	241
Supplementary figures .....	246
<b>Chapitre 5 .....</b>	<b>247</b>
Résumé étendu.....	248
Abstract .....	250
Introduction .....	251
Results and discussion .....	252
Conclusions .....	259
Methods.....	262
References .....	264
Acknowledgements.....	268
Author contributions .....	268
Supplementary data.....	269
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>273</b>
1 Les facteurs de la récalcitrance enzymatique .....	274
2 Dynamique des enzymes dans les parois végétales.....	275
3 Prédiction de la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique .....	277
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>278</b>



# LISTE DES FIGURES

---

---

## Introduction générale

---

Figure 1 - Consommation énergétique mondiale par carburant et émission de CO <sub>2</sub> mondiale par combustion de carburant. ....	39
--	----

---

## Contexte bibliographique

---

Figure 2 - Culture de <i>Miscanthus × giganteus</i> sur une parcelle expérimentale du site INRA d'Estrées-Mons.....	46
Figure 3 - Culture de peuplier expérimentale sur le site INRA de Nancy et taillis de peuplier à très courte rotation .....	49
Figure 4 - Épi de blé et stock de balles de paille de blé sur le domaine expérimental d'Estrées-Mons .....	52
Figure 5 - Chaîne de cellulose et organisation des chaînes en microfibrille .....	54
Figure 6 - Disaccharides constitutifs du squelette des hémicelluloses .....	55
Figure 7 - Structure des monolignols et des unités constitutives de la lignine.....	58
Figure 8 - Formation des principales liaisons de la lignine à partir des radicaux monolignols .....	58
Figure 9 - Organisation générale de la paroi végétale.....	62
Figure 10 - Structure de la paroi primaire et de la lamelle moyenne .....	63
Figure 11 - Structure de la paroi secondaire .....	64
Figure 12 - Voies de transformation de la biomasse lignocellulosique et produits finaux. ....	67
Figure 13 - Voies de conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique .....	68
Figure 14 - Modèle classique de l'action des cellulases sur une microfibrille de cellulose.....	72
Figure 15 - Dégradation des microfibrilles de cellulose cristallines par une Cel7A.....	73
Figure 16 - Les motifs structuraux basiques retrouvés au sein des hémicelluloses et les enzymes responsables de leur hydrolyse .....	75

<b>Figure 17 - Action synergique des LPMO et des GH pour l'hydrolyse de la cellulose ....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 18 - Facteurs influençant la digestibilité enzymatique de la biomasse.....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 19 - Représentation des différentes échelles de porosité des tissus végétaux .....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 20 - Représentation schématique de l'impact des prétraitements .....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 21 - Méthodes de prétraitements utilisées</b>	
<b>pour la déconstruction de la biomasse .....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 22 - Principaux liquides ioniques utilisés pour le prétraitement de la biomasse..</b>	<b>93</b>

---

## Matériels et méthodes

---

<b>Figure 23 - Préparation des fragments de blé.....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 24 - Préparation des fragments de miscanthus.....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 25 - Préparation des fragments de peuplier .....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 26 - Méthode d'éluion en chromatographie ionique échangeuse d'anions.....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 27 - Représentation schématique d'une carte de contour de fluorescence .....</b>	<b>123</b>
<b>Figure 28 - Les différentes étapes d'une mesure de recouvrement de fluorescence.....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 29 - Transfert d'énergie par résonance de Förster et impact sur l'intensité de</b>	
<b>fluorescence des molécules en interaction .....</b>	<b>126</b>

---

## Chapitre 1

---

<b>Figure 1. Glucose concentration in the reaction medium after the 96 h enzymatic</b>	
<b>hydrolysis of the different biomass samples.....</b>	<b>143</b>
<b>Figure 2. Confocal fluorescence images of wheat straw, miscanthus and poplar sections</b>	
<b>before and after pretreatments.....</b>	<b>145</b>
<b>Figure 3. Fluorescence intensity of the untreated and pretreated biomass samples</b>	
<b>measured by fluorescence confocal microscopy.....</b>	<b>146</b>
<b>Figure 4. Plant cell walls' structure of the different fragments observed by FE-SEM..</b>	<b>147</b>
<b>Figure 5. Macrofibrils diameter in untreated and pretreated biomass samples measured</b>	
<b>based on FE-SEM observations.....</b>	<b>148</b>
<b>Figure 6. Cumulative pore size distribution of untreated and pretreated samples.....</b>	<b>149</b>
<b>Figure 7. Chemical composition of the untreated and pretreated biomass samples .....</b>	<b>151</b>

<b>Figure 8. Monolignols quantification after lignin thioacidolysis of wheat straw, miscanthus and poplar.....</b>	<b>153</b>
<b>Figure 9. Pearson’s correlation coefficients between the saccharification yield after 96 h of enzymatic hydrolysis and different plant cell walls’ markers.....</b>	<b>157</b>
<b>Figure S1. Morphology of the wheat straw, miscanthus and poplar fragments before and after pretreatments.....</b>	<b>167</b>
<b>Figure S2. SEM images of the transverse surface of the different fragments. Samples were imaged with an inclination angle of 45° .....</b>	<b>167</b>

## Chapitre 2

<b>Figure 1. Chemical structures of fluorescein, rhodamine, dextran and PEG .....</b>	<b>173</b>
<b>Figure 2. 3D fluorescence contour map of DF10, DR10, PF10 and PR10 probes .....</b>	<b>178</b>
<b>Figure 3. Hydrodynamic radius of the fluorescent probes as a function of their molecular weight .....</b>	<b>182</b>
<b>Figure 4. Modelling of the probes’ hydrodynamic radius as a function of their molecular weight .....</b>	<b>184</b>
<b>Figure S1. Light scattering profiles of the DF10 and DF250 probes .....</b>	<b>190</b>

## Chapitre 3

<b>Figure 1. Kinetic release of glucose during enzymatic hydrolysis of the different poplar samples .....</b>	<b>200</b>
<b>Figure 2. Dynamical assessment of the chemical composition of the different samples during saccharification .....</b>	<b>201</b>
<b>Figure 3. Visualisation of the course of a FRAP experiments.....</b>	<b>203</b>
<b>Figure 4. Fluorescence recovery curves of the different PEG-rhodamine probes measured on the untreated and pretreated samples after 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis.....</b>	<b>205</b>
<b>Figure 5. Mobile fractions of the different PEG-rhodamine probes measured in untreated and pretreated samples after 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis.....</b>	<b>207</b>
<b>Figure 6. Distribution of pores size ranges in the untreated and pretreated samples....</b>	<b>210</b>

<b>Figure 7. Pearson’s correlations coefficients between saccharification yields, probes MF and samples’ porosity .....</b>	<b>213</b>
---	------------

---

## Chapitre 4

---

<b>Figure 1. Enzymatic conversion yield for pine and poplar .....</b>	<b>230</b>
<b>Figure 2. Fluorescence spectra for control and pretreated pine and poplar samples at 355 nm excitation wavelength showing the relative intensity.....</b>	<b>231</b>
<b>Figure 3. Fluorescence lifetime measurements and corresponding lifetime images for control and pretreated pine and poplar .....</b>	<b>232</b>
<b>Figure 4. PEG probes distribution in pine control, hot water and chlorite-pretreated pine samples .....</b>	<b>233</b>
<b>Figure 5. PEG probes distribution in poplar control, hot water, and chlorite-pretreated poplar samples .....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 6. FRET efficiency measurements for the control and pretreated pine and poplar .....</b>	<b>235</b>
<b>Figure 7. Effect of probe size on FRET efficiency measurements for the control and pretreated pine and poplar .....</b>	<b>236</b>
<b>Figure 8. Correlation between factors characterising pine and poplar samples .....</b>	<b>239</b>
<b>Figure S1. Dilution series of 1kDa PEG probe and the variation in equimolar probe solutions.....</b>	<b>246</b>
<b>Figure S2. Variation of FRET efficiency with probe concentration in the 1 kDa-PEG probe on control pine sections .....</b>	<b>246</b>

---

## Chapitre 5

---

<b>Figure 1. Visible light imaging of stem tissue architecture of untreated and chlorite-treated miscanthus sections .....</b>	<b>253</b>
<b>Figure 2. Effect of <i>Pa</i>LPMO9E on the degradation of untreated and chlorite-treated miscanthus.....</b>	<b>255</b>
<b>Figure 3. Fluorescence time-lapse imaging of enzymatic conversion of chlorite-treated miscanthus.....</b>	<b>257</b>

<b>Figure 4. Real time monitoring of FTIR spectra of chlorite-treated miscanthus during enzymatic conversion .....</b>	<b>261</b>
<b>Figure S1. Effect of <i>Pa</i>LPMO9E on enzymatic hydrolysis of steam exploded miscanthus. ....</b>	<b>269</b>
<b>Figure S2. Chemical composition of untreated and chlorite-treated miscanthus .....</b>	<b>269</b>
<b>Figure S3. Time-lapse imaging of chlorite-treated miscanthus sample .....</b>	<b>270</b>
<b>Figure S4. Time-lapse imaging of untreated miscanthus sample .....</b>	<b>271</b>
<b>Figure S5. Time-lapse imaging of chlorite-treated miscanthus sample .....</b>	<b>271</b>
<b>Figure S6. FTIR spectra of vascular bundle cells of untreated and chlorite-treated miscanthus after 20 min and 120 min incubation in buffer.....</b>	<b>272</b>





# LISTE DES TABLEAUX

---

---

## **Contexte bibliographique**

---

<b>Tableau 1. Répartition des cellulases dans les différentes familles de glycosides hydrolases.....</b>	<b>71</b>
<b>Tableau 2. Répartition des hémicellulases dans les différentes familles de glycoside hydrolases .....</b>	<b>76</b>
<b>Tableau 3. Liste des principaux prétraitements chimiques .....</b>	<b>96</b>
<b>Tableau 4. Liste des principaux prétraitements physico-chimiques.....</b>	<b>99</b>

---

## **Chapitre 1**

---

<b>Table 1. Weight losses induced by the different pretreatments on each biomass species .....</b>	<b>142</b>
<b>Table 2. Saccharification yield of the different biomass samples .....</b>	<b>152</b>
<b>Table 3. Lignin inter-linkages proportion and syringyl to guaiacyl (S/G) ratio determined by 2D HSQC NMR spectroscopy .....</b>	<b>155</b>

---

## **Chapitre 2**

---

<b>Table 1. Analysed spectral properties of 10 kDa dextran and PEG fluorescent probes .....</b>	<b>179</b>
<b>Table 2. Analysed physical properties of PEG and dextran FPs .....</b>	<b>180</b>

---

## **Chapitre 3**

---

<b>Table 1. ANOVA analysis of the effect of pretreatment, probes size, saccharification time and their interaction on probes MF .....</b>	<b>209</b>
---	------------

---

---

## Chapitre 4

---

<b>Table 1. Chemical composition of untreated and pretreated pine and poplar samples .....</b>	<b>230</b>
--	------------

---

## Chapitre 5

---

<b>Table 1. Changes in FTIR absorbance at 1060 and 1105 cm<sup>-1</sup> of chlorite-treated miscanthus vascular bundle area (sclerenchyma, parenchyma, tracheids) after 40 min and 80 min of incubation with Celluclast<sup>®</sup> alone or with <i>Pa</i>LPMO9E .....</b>	<b>259</b>
---	------------

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

---

- AFEX : explosion à l'ammoniac (*Ammonia Fiber Expansion*)
- AOTF : Acousto-Optical Tunable Filter (Filtre Acousto-Optique Accordable)
- BG :  $\beta$ -glucosidase
- CAZy : Carbohydrate Active enZYme database (base de données sur les enzymes agissant sur les carbohydrates)
- CDH : Cellobiose Deshydrogénase
- CE : Carbohydrate Esterase
- CBH : Cellobiohydrolase
- CBD : Cellulose Binding Domain (domaine de liaison à la cellulose)
- CBM : Carbohydrate Binding Module
- CHLO : sodium chlorite pretreatment (prétraitement à l'hypochlorite de sodium)
- DA : Dilute Acid pretreatment (prétraitement à l'acide dilué)
- DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion Dynamique de la Lumière)
- EG : Endoglucanase
- FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching (Recouvrement de Fluorescence après Photoblanchiment)
- FRET : Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transfert d'Énergie par Résonance de Förster)
- GH : Glycoside Hydrolase
- HW : Hot Water pretreatment (prétraitement hydrothermique)
- IL : Ionic Liquid pretreatment (prétraitement au liquide ionique)
- IRTF : spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier
- LCC : Lignin-Carbohydrate Complex (complexe lignine-polysaccharide)
- LPMO : Lytic Polysaccharide MonoOxygenase (mono-oxygénase lytique des polysaccharides)
- MALS : Multi Angle Light Scattering (diffusion de lumière à détection multi-angulaire)
- m/v : masse / volume
- PEG : Polyéthylène Glycol
- PTFE : Polytétrafluoroéthylène
- PMT : Photomultiplicateur

$R_H$  : Rayon Hydrodynamique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : rotation par minute

SEC : Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'Exclusion Stérique)

SPORL : prétraitement au sulfite (*Sulfite Pretreatment to Overcome the Recalcitrance of Lignocellulose*)

UI : Unité Internationale

v/v : volume / volume



# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Le développement de nos sociétés a de tout temps été étroitement lié à notre capacité à assurer une production d'énergie pérenne. La maîtrise du feu par les hommes préhistoriques 400 000 ans avant notre ère a ainsi constitué une étape importante dans l'évolution de l'espèce humaine. D'un point de vue physiologique, la cuisson des aliments a amélioré le rendement énergétique de la nourriture, entraînant une augmentation de la taille des individus, mais aussi de la taille de leur cerveau [1]. Cette nouvelle source de chaleur et de lumière a prolongé le jour et le temps de veille, favorisant de nouvelles interactions sociales. Des activités nocturnes, éloignées des considérations diurnes relatives à la subsistance, ont alors vu le jour, centrées sur la musique ou encore les cérémonies religieuses [2]. La maîtrise du feu a également permis la conquête de territoires plus hostiles, mais aussi le développement de techniques de production d'outils plus perfectionnés [3]. Ce premier contrôle d'une source d'énergie est donc à l'origine d'un développement aussi bien technique que culturel.

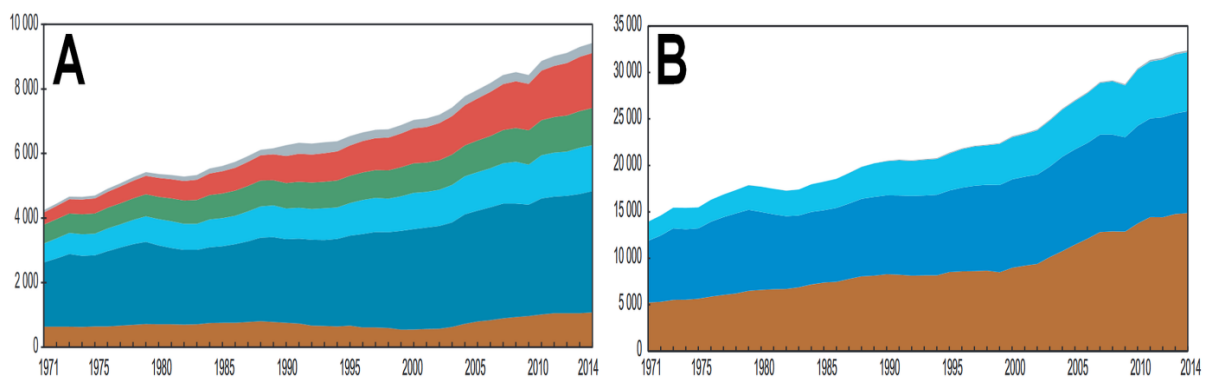
La maîtrise du feu constitue le point de départ de la production d'énergie à partir de biomasses végétales, qui étaient jusqu'alors utilisées comme source de nourriture ou comme matériau de base pour la conception d'outils, de vêtements ou la construction de refuges.

Les progrès réalisés suite à la maîtrise du feu, et notamment le développement de l'agriculture assurant une source de nourriture abondante et relativement constante, ont entraîné une amélioration des conditions de vie et une hausse progressive de la population européenne, et par conséquent une augmentation de la consommation d'énergie. Cette dernière a reposé jusqu'au Moyen-Âge principalement sur l'utilisation de la biomasse, causant une réduction importante de la surface des forêts [4]. De nouvelles sources d'énergie ont alors vu le jour pour répondre aux besoins croissants de la population, avec la maîtrise des énergies éolienne et hydraulique. L'invention des moulins à vent et à eau a permis de transformer plus efficacement des ressources alimentaires ou des ressources premières comme des minerais [3]. La puissance fournie par ces infrastructures était toutefois insuffisante pour permettre une valorisation des métaux en grande quantité, raison pour laquelle le bois et la biomasse en général sont restés les matériaux dominants pendant des siècles [5].

La Révolution industrielle initiée au 18<sup>e</sup> siècle a marqué un tournant dans le niveau de développement des sociétés humaines, et par conséquent sur leur niveau de consommation d'énergie. De nouvelles techniques ont vu le jour, supportées principalement par l'invention de la machine à vapeur qui a permis la transformation d'énergie chimique en énergie mécanique [3]. Une transition s'est alors opérée avec l'avènement au 19<sup>e</sup> siècle de ressources fossiles telles que le charbon, le pétrole ou le gaz naturel, disponibles en grande quantité,

facilement valorisables et peu onéreuses, qui se sont substituées à la biomasse jusqu'alors majoritairement utilisée, mais offrant un rendement énergétique insuffisant pour soutenir les nouvelles industries [5].

Ces ressources fossiles sont encore massivement utilisées aujourd'hui. En 2014, elles permettaient de couvrir 80% de nos besoins énergétiques, qui ont plus que doublés au cours des 40 dernières années (Figure 1-A) [6]. Elles occupent désormais une place prépondérante dans notre vie quotidienne. Le pétrole est ainsi à l'origine de nombreux matériaux devenus indispensables tels que les plastiques, les fibres synthétiques, mais aussi des composés chimiques et parapharmaceutiques, et surtout des carburants [7].



**Figure 1** - (A) Consommation énergétique mondiale par carburant et (B) émission de CO<sub>2</sub> mondiale par combustion de carburant. D'après l'Agence internationale de l'énergie (2016) [6].

Cette dépendance est remise en cause depuis une quarantaine d'années et les chocs pétroliers de 1973 et 1979. Cela est en partie dû au fait que ces ressources fossiles se forment au cours de processus géologiques très longs (de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de millions d'années), et ne sont donc pas renouvelables à une échelle de temps humaine. Cet argument est toutefois sujet à controverse car il est impossible d'estimer avec précision à quel moment les réserves de carbones fossiles seront épuisées. Certaines études tendent même à montrer que le développement de nouvelles techniques d'extraction de ressources fossiles et de valorisation de leur potentiel énergétique, ainsi que la possibilité d'interchanger facilement les combustibles dans la plupart des procédés industriels, pourraient permettre de continuer à les utiliser pendant plusieurs siècles [8].

Le principal inconvénient concernant l'usage de ces ressources fossiles provient du fait que leur combustion libère dans l'atmosphère des quantités importantes de carbone qui était piégé dans le sol depuis des millions d'années. Les émissions de dioxyde de carbone sont ainsi passées de 15,5 à 32,4 millions de tonnes par an entre 1973 et 2014 (Figure 1-B) [6].

Cette augmentation a des conséquences écologiques importantes, puisqu'elle est responsable, entre autre, d'une acidification des océans par captation du CO<sub>2</sub> atmosphérique, mais surtout de l'augmentation de la quantité de gaz à effet de serre dans l'atmosphère, provoquant un phénomène de dérèglement climatique marqué par une hausse de la température moyenne à l'échelle de la planète de 0,85°C au cours de la période 1880-2012, plus rapide que celle observée précédemment à l'échelle de temps géologique [9].

C'est pourquoi il semble aujourd'hui indispensable de valoriser de nouvelles ressources, idéalement renouvelables, pouvant se substituer aux ressources fossiles de manière plus écologique. Parmi les pistes explorées, le retour à une meilleure utilisation de la biomasse végétale semble être une des alternatives les plus prometteuses. La production d'énergie à partir de biomasse n'a pas disparu avec la Révolution industrielle. Elle est restée la voie de production traditionnelle dans de nombreux pays du Sud [10]. La valorisation de la biomasse pour soutenir l'industrie avait d'ailleurs un temps été envisagée au début de la Révolution industrielle. Rudolf Diesel évoquait d'ailleurs la possibilité de faire fonctionner ses moteurs à l'aide d'huiles végétales, précisant que leur utilisation pourrait « au fil du temps, devenir aussi importante que celle des carburants minéraux actuels » [11].

Les carburants cités par Diesel correspondent à la définition actuelle des biocarburants de première génération dont la production annuelle est estimée à 50 milliards de litres [7]. Ces biocarburants sont issus de la valorisation des substances contenues dans les organes de réserve des plantes oléagineuses pour le biodiesel et des plantes à sucre pour le bioéthanol. Les techniques pour les produire sont maîtrisées et matures, et certains pays ont d'ailleurs déjà mis en place des programmes pour produire ces carburants d'origine végétale à une échelle industrielle. Le programme brésilien de production d'éthanol à partir de canne à sucre a ainsi été lancé après les chocs pétroliers afin d'atteindre l'autonomie sur le plan énergétique [12].

La relative facilité avec laquelle la production de biocarburant de première génération a pu être mise en œuvre provient du fait que les matières premières nécessaires pour cette production sont également utilisées par l'industrie alimentaire, pour laquelle les techniques de valorisation avaient déjà été développées. Toutefois, la compétition entre les deux secteurs pour l'utilisation d'une même ressource est responsable de la mauvaise image des biocarburants dans l'opinion publique, ainsi que de problèmes sociaux, économiques et éthiques [7, 12, 13]. De plus, il a été montré que la balance carbone (différence entre la quantité de carbone émise par l'utilisation des biocarburants et la quantité de carbone fixée



par le matériel végétal initial) des biocarburants de première génération est positive, et que ces derniers ne répondent donc pas aux critères de respect de l'environnement recherchés [12].

C'est pourquoi la tendance actuelle concernant la valorisation énergétique de la biomasse s'oriente vers une utilisation de la biomasse lignocellulosique, qui représente l'ensemble de la biomasse végétale terrestre qui n'est pas utilisée directement par l'industrie alimentaire [7]. La biomasse lignocellulosique pourrait permettre de produire avec une balance carbone presque nulle jusqu'à 600 GJ/ha/an [14]. Cela ne sera toutefois probablement pas suffisant pour remplacer les ressources fossiles pour la production d'énergie, d'autant que les polymères formant les parois végétales présentent également un potentiel intéressant pour la production de tous les composés issus de la pétrochimie. Le développement d'autres techniques de production d'énergie renouvelable, comme la production d'électricité par la conversion de l'énergie solaire par des panneaux photovoltaïques, de l'énergie du vent par des éoliennes, ou encore de l'énergie hydraulique par des centrales hydroélectriques ou marémotrices est également indispensable. Toutefois, la valorisation de la biomasse lignocellulosique semble aujourd'hui cruciale pour répondre à la nécessité de transition énergétique à laquelle nous faisons face actuellement.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit mon projet de thèse, dont l'objectif est d'étudier les corrélations entre l'activité et la dynamique des enzymes lignocellulolytiques utilisées industriellement pour déconstruire et valoriser les parois végétales. L'étude de ces relations, au regard de l'évolution des facteurs chimiques et structuraux des échantillons utilisés, pourra permettre de révéler des marqueurs génériques de la récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. Ce manuscrit est structuré de la manière suivante :

- la première partie s'intéresse, à travers une synthèse bibliographique, au contexte scientifique détaillé dans lequel s'inscrit ce travail de thèse ;
- la deuxième partie énonce les objectifs scientifiques de cette thèse ainsi que la stratégie adoptée pour répondre aux questions scientifiques que nous nous proposons d'étudier ;
- la troisième partie décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette thèse ;
- la quatrième partie présente les résultats obtenus, et se veut structurée en chapitres rédigés sous forme d'articles scientifiques qui ont été soumis ou sont finalisés ;
- la dernière partie propose une discussion de l'ensemble des résultats présentés, ainsi que des perspectives ouvertes par les conclusions de ce travail de thèse.





**CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1 La valorisation de la biomasse lignocellulosique**

La biomasse lignocellulosique est l'une des ressources biologiques les plus importantes sur Terre, et pourtant l'une des plus sous-utilisées [7]. La lignocellulose est le matériel qui constitue les parois des cellules végétales des plantes ligneuses. Elle est composée à 90% par trois polymères d'intérêt : la cellulose et les hémicelluloses qui sont des polysaccharides non utilisés par l'industrie alimentaire, et la lignine qui est le polymère aromatique le plus abondant dans la biosphère [15]. La biomasse lignocellulosique représente donc une ressource importante pour la production d'énergie et de biocomposés en raison du potentiel de valorisation de ses constituants. Elle regroupe une grande diversité d'espèces végétales qui sont disponibles en grande quantité et peuvent être cultivées presque partout dans le monde. Parmi les ressources valorisables, on trouve des plantes à graines nues ou gymnospermes comme le pin ou l'épicéa qui sont des arbres à bois tendre, mais aussi des plantes à fleurs (dans lesquelles les graines sont protégées au sein d'un ovaire) ou angiospermes, qui peuvent elles-mêmes être divisées en deux catégories : les monocotylédones, regroupant notamment certaines graminées comme le blé, le miscanthus ou le panic érigé, et les dicotylédones dont font partie certaines espèces à bois dur comme le peuplier ou le saule [16]. Les monocotylédones, dont la graine ne comporte qu'un cotylédon ou feuille primordiale, vont croître en hauteur, mais leur tige va garder un diamètre relativement constant au cours de la vie de la plante, alors que la tige des dicotylédones, dont la graine possède deux cotylédons, va également croître en diamètre avec la mise en place d'un bois secondaire au cours du temps, résultant en une production de biomasse plus importante [17]. L'ensemble des espèces valorisables diffèrent donc au niveau de leur structure aussi bien à l'échelle de l'organisme qu'à l'échelle tissulaire, mais aussi au niveau de la composition de leur paroi et de la teneur des différents constituants pariétaux [16]. Ces différences induisent des variations dans la résistance des parois à l'hydrolyse enzymatique, également appelée récalcitrance, responsable de la nécessité d'appliquer des prétraitements plus ou moins spécifiques en fonction de la biomasse considérée [18]. Il est ainsi considéré que les angiospermes à bois durs et les graminées nécessitent des conditions de prétraitement moins drastiques que les angiospermes à bois tendres pour outrepasser cette récalcitrance, en raison de la plus forte densité de vaisseaux conducteurs chez ces espèces qui permettraient une meilleure diffusion de la chaleur et des réactifs pendant le processus [16]. Diverses matières premières peuvent être utilisées pour valoriser la biomasse lignocellulosique à un niveau industriel, telles que des

cultures dédiées, des résidus agricoles ou forestiers, mais aussi des déchets municipaux ou ménagers [19].

## 1.1 Les cultures dédiées

Les cultures dédiées de seconde génération regroupent des espèces végétales non utilisées par l'industrie alimentaire et cultivées dans le but spécifique de produire de la biomasse pour une valorisation énergétique ou pour la production de composés d'intérêt [20]. Idéalement, ces espèces doivent répondre à un certain nombre de critères : elles doivent permettre d'atteindre un rendement en biomasse important avec un apport d'intrants le plus faible possible, être résistantes aux maladies ou aux parasites, et permettre la production d'une quantité d'énergie supérieure à celle consommée pour leur culture [21, 22]. Au-delà des considérations écologiques, des paramètres socio-économiques entrent également en jeu car ces nouvelles cultures, pour être adoptées par les agriculteurs, doivent leur apporter un bénéfice financier, en s'intégrant rapidement dans le schéma de culture existant sans période de transition en terme de rendement [23]. La mise en place de cultures dédiées peut également avoir des avantages environnementaux au niveau des surfaces cultivées. En plus des cultures classiques en champ, l'utilisation d'autres surfaces, telles que des sols hautement érodables, des surfaces inondables, des sols salins ou acides ou encore des terrains compactés peut être envisagée. Les cultures dédiées peuvent également servir à réhabiliter certains sols contaminés ou trop pauvres en matière organique [24].

La culture dédiée idéale n'existe pas, mais de nombreuses espèces (plus de 30 en Europe et 35 aux États-Unis) sont considérées pour la production de biomasse [21]. Parmi elles, on trouve principalement des graminées à rhizome comme le miscanthus, la canne de Provence (*giant reed*) ou le panic érigé (*switchgrass*), et des arbres à croissances rapides tels que le saule ou le peuplier [20]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à deux cultures dédiées cultivées dans la région Grand Est : le miscanthus et le peuplier.

### 1.1.1 Le miscanthus

L'espèce *Miscanthus × giganteus* a été introduite en Europe en 1935 par le botaniste Danois Aksel Olsen en provenance du Japon à des fins ornementales. L'intérêt énergétique pour le miscanthus est apparu à la fin des années 1980 en raison de son haut rendement de production de biomasse [25]. Cela est dû au métabolisme photosynthétique en C<sub>4</sub> du

miscanthus, qui fait intervenir des intermédiaires comportant 4 atomes de carbone, permettant de fixer plus efficacement le CO<sub>2</sub> atmosphérique, et donc de produire plus de biomasse. Il est ainsi considéré que le rendement annuel en biomasse des plantes en C<sub>4</sub> dans des conditions tropicales ou modérées pourrait être supérieur au double de celui des plantes en C<sub>3</sub> [26].

L'espèce principalement cultivée pour la valorisation énergétique est *Miscanthus × giganteus*, un hybride issu du croisement des espèces *Miscanthus sinensis* et *Miscanthus sacchariflorus* [27]. Comme les autres espèces du genre, c'est une graminée à rhizomes. Il s'agit donc d'une espèce pérenne, dont la durée de vie est estimée entre 20 et 25 ans [26]. La quantité de biomasse produite au cours de la première année de culture est insuffisante pour une valorisation énergétique, et il faut généralement attendre entre 3 et 5 ans pour que la plantation atteigne son plein rendement [28].

À maturité, la tige représente l'essentiel de la biomasse aérienne du miscanthus et peut atteindre une hauteur de 4 m (Figure 2) [26]. La tige de miscanthus porte des feuilles dont les gaines s'insèrent au niveau des nœuds, délimitant des segments de tiges appelés entrenœuds. Le nombre d'entrenœuds varie beaucoup entre les génotypes, mais il a été observé que la taille de ces structures s'accroît jusqu'à l'entrenœud 4 et décroît significativement à partir du sixième entrenœud [29].



**Figure 2** - Culture de *Miscanthus × giganteus* sur une parcelle expérimentale du site INRA d'Estrées-Mons. © Stéphane Cadoux - INRA.

Le miscanthus présente des avantages écologiques sur d'autres cultures car il nécessite peu d'eau pour se développer et peut pousser dans une grande variété de sols [26]. De plus, l'apport en nutriments n'est nécessaire qu'à partir de la troisième année si le sol n'est pas

pauvre en azote, et reste relativement bas par rapport à d'autres cultures [30]. Le rendement maximal en biomasse aérienne est atteint chaque année au début de l'automne, mais les plants sont généralement collectés à la fin de l'hiver ce qui permet aux parties aériennes de retourner les nutriments au rhizome pour l'année suivante [25]. La récolte tardive permet également de diminuer le contenu en minéraux des parties aériennes pour une meilleure valorisation [30], mais le rendement en biomasse récoltée est alors beaucoup plus faible en raison principalement de la chute des feuilles [31, 32].

Des rendements en biomasse importants peuvent être atteints dans des régions tempérées. Ainsi, le miscanthus produit plus de biomasse que le panic érigé, une autre culture dédiée prometteuse, pour une même surface cultivée [22, 32]. Aux États-Unis, une étude a montré que la production de biomasse pouvait atteindre 30 t.ha<sup>-1</sup> avec des cultures de miscanthus, soit un rendement 59% plus important que celui du maïs qui est la plante à grain en C<sub>4</sub> qui produit le plus de biomasse [33]. En Europe, la productivité du miscanthus peut varier en fonction de la latitude de culture, avec des rendements pouvant aller de 30 t.ha<sup>-1</sup> au Portugal à 10-25 t/ha en Europe du Nord et Centrale en récolte précoce [26]. En France, des productions moyennes de 15 t/ha ont été obtenues en récolte tardive [30]. Ces hauts rendements permettent une valorisation énergétique du miscanthus 10 fois plus importante que celle des plantes annuelles cultivées dans ce but, avec des émissions de carbone 20 à 30 fois moins conséquentes que celles des carburants fossiles [34].

Bien que prometteuse, la culture du miscanthus présente cependant certains inconvénients. L'espèce *Miscanthus × giganteus* est un hybride triploïde stérile, et il est donc indispensable de planter les rhizomes en début de culture [22]. L'espèce ne peut donc pas devenir invasive ou transférer ses gènes, mais nécessite une propagation en champ qui peut se révéler onéreuse. La plantation directe du rhizome, qui est pour le moment la technique la plus couramment utilisée, coûte entre 2 000 et 3 400 €/ha avec un faible taux de division du rhizome [35]. De plus, les cultures sont sensibles au froid, et les rhizomes peuvent ne pas survivre au premier hiver après la plantation, notamment dans les pays d'Europe du Nord, si la température du sol descend en dessous de -3,5°C [26].

### 1.1.2 Le peuplier

La culture du peuplier remonte à plusieurs millénaires en Chine et date au moins de l'Antiquité en Europe, où les Grecs et les Romains l'utilisaient comme combustible, comme fourrage pour l'alimentation animale et même comme treillis vivant pour soutenir les grappes

dans les vignobles. La dénomination latine du genre *Populus* serait ainsi dérivée de l'appellation romaine *arbor populi* qui signifie « l'arbre du peuple », en raison du nombre important de peupliers que l'on pouvait trouver à l'époque [36].

Le bois de peuplier est toujours utilisé de nos jours dans les domaines de la papeterie et de la conception de mobilier, mais aussi pour des services écologiques comme la phytoremédiation des sols, la reforestation ou la lutte contre la désertification de certaines régions [37]. L'idée d'utiliser les cultures dédiées de peuplier pour une valorisation énergétique date du choc pétrolier de 1973, mais elle n'a réellement pris d'importance qu'avec l'apparition des inquiétudes environnementales liées à l'utilisation des ressources fossiles [37].

Cet intérêt ancestral pour le peuplier, et pour certaines autres espèces de la famille des *Saliceae* comme le saule, est dû à leurs caractéristiques de culture. La plupart des espèces de peuplier peuvent se développer facilement dans des conditions très variées, certaines espèces tolérant même des conditions désertiques ou arides [37], même si la plupart des espèces croissent à des latitudes moyennes ou hautes [38]. Cette adaptabilité est la conséquence des hautes capacités photosynthétiques des *Salicaceae*, qui sont capables d'assimiler le CO<sub>2</sub> et de capter le rayonnement solaire beaucoup plus efficacement que les autres plantes avec un métabolisme en C<sub>3</sub> [39]. Certaines espèces de peuplier hybride sont ainsi parmi les arbres ayant la croissance la plus rapide au monde [40].

Les espèces du genre *Populus* présentent des prédispositions importantes pour l'hybridation. En 1755, le Français Duhamel du Monceau a ainsi été le premier à décrire une hybridation entre des spécimens de l'espèce *P. deltoides* originaires d'Amérique du Nord, et *P. nigra* originaire d'Europe, aboutissant à la création d'un hybride dont les caractéristiques étaient si intéressantes qu'il est devenu la première espèce hybride à être cultivée en sylviculture [36].

En 2016, en plus des forêts naturelles, la culture dédiée du peuplier s'étendait sur 31,4 Mha dans le monde, principalement au Canada et en Chine, la France étant le troisième pays dans ce domaine avec un espace de culture de 200 000 hectares. La proportion dédiée à la production d'énergie reste toutefois faible, et en France, seuls 3 000 hectares de plantations ont été établis dans ce but au cours des dix dernières années [41]. Cette proportion demeure faible car les cultures dédiées à une valorisation énergétique sont pour le moment largement expérimentales (Figure 3-A) [37].





**Figure 3** - (A) Culture de peuplier expérimentale sur le site INRA de Nancy © Gérard Nepveu - INRA et (B) taillis de peuplier à très courte rotation © JM Boissenec - INRA.

Le système de culture choisi pour produire de la bioénergie à partir du peuplier est un système de taillis à courte rotation. Dans ce système, des plants de peuplier sont cultivés à une forte densité, et la biomasse aérienne est collectée à la fin de chaque cycle. De nouveaux taillis peuvent ensuite se développer à partir de la souche laissée en place pour un nouveau cycle de culture (Figure 3-B) [37]. Le système racinaire étant mis en place lors du début de la culture, la quantité de biomasse produite est généralement plus importante après la première rotation. Une étude a ainsi montré une augmentation du rendement annuel en biomasse de 4 à 12 t/ha pour des cultures de peuplier hybride entre la première et la deuxième rotation, avec une croissance des plants en hausse de 2,08 m/an à 2,99 m/an respectivement [42].

La durée des cycles se situe généralement entre 3 et 4 ans, mais peut être plus longue (jusqu'à 10-12 ans) en fonction des espèces utilisées [39]. Ces choix de cycles courts sont possibles en raison de la forte croissance juvénile des peupliers. En Europe centrale, des plantations de peuplier hybride permettent d'obtenir en 4 ans des rendements en biomasse équivalents à ceux obtenus en 25 ou 30 ans avec des cultures sylvicoles traditionnelles [43].

Ces cultures peuvent être mises en place aussi bien sur des sols agricoles que sur des terrains marginaux [40], permettant d'accroître la production de biomasse. Le rendement annuel en biomasse des plantations de peuplier est estimé à 15 t/ha, ce qui est équivalent à la production du panic érigé, et supérieur à celle de paille de blé [37, 40].

Toutefois, plusieurs facteurs ralentissent le développement de ces cultures à plus grande échelle, notamment la forte demande en eau pour se développer et le grand nombre de pathogènes pouvant contaminer les plants et réduire les rendements de manière drastique [37-39]. De plus, au cours de la phase d'établissement de la culture, la compétition avec certaines herbes pour l'accès à l'eau et aux ressources du sol peut entraîner une mortalité importante chez les jeunes pousses de peuplier, nécessitant une bonne préparation du terrain et un désherbage intensif au cours des premières années [38, 43].

Cependant, en raison de la haute variabilité génétique des espèces du genre *Populus*, il est possible de produire des hybrides présentant des caractéristiques intéressantes pour une forte production de biomasse. De plus, la première transformation génétique par *Agrobacterium* d'une espèce de peuplier hybride en 1987 [44], et le séquençage complet du génome de l'espèce *P. trichocarpa* en 2006 [45] ont ouvert la voie à des améliorations génétiques des hybrides naturels. Des centaines de gènes sont ainsi actuellement testés pour leur effets sur le rendement final en biomasse du peuplier [36].

## 1.2 Les résidus agricoles

Les cultures dédiées permettent d'atteindre de hauts rendements en biomasse lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adaptées. Leur mise en place à grande échelle pourrait toutefois poser certains problèmes si aucun effort n'est fait pour adapter notre consommation d'énergie aux nouvelles ressources à disposition. La principale contrainte sera le besoin d'accéder à des surfaces cultivables, ce qui instaurera une compétition entre la production de ressources alimentaires et la production d'énergie. D'autres solutions délétères d'un point de vue environnemental peuvent aussi être envisagées, comme la création de nouvelles terres agricoles par déforestation ou par transformation de réserves naturelles, mais qui entraîneraient une diminution de la biodiversité [46].

En raison de la forte croissance de la population mondiale (le chiffre de 9 milliards d'individus pourrait être atteint à l'horizon 2050) et de la forte pression alimentaire qui en résultera, la valorisation des résidus de cultures agricoles semble indispensable pour éviter une trop forte compétition entre les besoins alimentaires et ceux de développement [10]. En effet, les cultures alimentaires produisent de grandes quantités de biomasse non comestibles pouvant être affectées à d'autres usages. Il a été estimé que cette production annuelle de résidus s'élevait à  $3,7 \times 10^9$  t, pour une production d'énergie de  $65 \times 10^{18}$  J, ce qui permettrait de couvrir 15% de la consommation énergétique globale actuelle [47].

### 1.2.1 Les cultures céréalières

La culture des plantes céréalières telles que le riz, le blé ou l'orge produisent de grandes quantités de paille valorisables en tant que résidus. Ces pailles présentent l'avantage d'être plus faciles à déconstruire que les parois trouvées dans les graminées pérennes comme le miscanthus [19]. Les pailles de riz et de blé sont les résidus agricoles les plus importants en termes de quantité produite chaque année [48].

Ces résidus devront toutefois être utilisés avec parcimonie. Ils ne sont pas des déchets de l'agriculture alimentaire et sont déjà valorisés dans d'autres domaines comme l'alimentation animale, le maintien de la quantité de matière organique dans les sols, et la lutte contre leur érosion. Ils sont donc essentiels pour assurer un rendement satisfaisant pour les futures récoltes [49, 50].

### 1.2.2 La paille de blé

Les premiers signes de domestication du blé sont apparus dans la région du Croissant Fertile au Moyen-Orient, en Amérique Centrale et dans le sud de la Chine, de manière plus ou moins concomitante, il y a 10 000 à 12 000 ans [51]. Une étude génétique et géologique a permis de montrer que la première culture de blé s'est faite dans une petite région du Croissant fertile, en amont du Tigre et de l'Euphrate, dans une région renommée « le berceau de l'Agriculture » [52]. Les trois principales espèces de blé font partie du genre *Triticum* et ont été obtenues suite à des hybridations accidentelles successives entre l'espèce de blé sauvage, toujours cultivée de nos jours, et des herbes sauvages. De nombreuses variétés de blé, cultivables sous des climats divers, sont issues de croisement entre ces trois espèces [53].

Le blé est aujourd'hui cultivé sur tous les continents, et constitue avec le riz et le maïs une des trois grandes cultures céréalières qui dominent l'agriculture mondiale [54]. En 2014, 220 Mha étaient consacrés à la culture de cette céréale, donc 5,3 Mha en France [55]. Cette production est destinée à augmenter dans les années à venir afin de répondre à nos besoins alimentaires toujours croissants [56].

Lorsqu'il est cultivé à haute densité comme dans les champs, le blé se présente sous la forme d'une plante développant une tige principale depuis son système racinaire et qui peut atteindre 1,2 m de hauteur. Cette tige est constituée d'unités de répétition ou phytomères, comportant chacun un nœud duquel part une feuille, un entrenœud et un bourgeon dans l'aisselle de chaque feuille. Une tige comprend entre 6 et 16 phytomères, mais seuls quatre à

sept unités les plus distantes des racines vont connaître une élongation permettant à la tige de grandir, et par conséquent aux feuilles de capter plus efficacement le rayonnement solaire [57].

Ces phytomères distaux, et plus précisément leur entrenœud, constituent la paille de blé qui peut être valorisée après la récolte de l'épi. Cette paille est utilisée pour l'alimentation animale car elle contient de nombreuses substances potentiellement digestibles et transformables en énergie. Toutefois, seul 50 à 60% de ces substances peuvent être digérés par le bétail et la lente digestibilité de ces composés fait que la quantité de paille qui peut être fournie pour l'alimentation animale est limitée [58]. L'utilisation de la paille pour le maintien de la qualité des sols et la lutte contre leur érosion constitue donc la principale valorisation de la paille de blé, et des pailles céréalières en général. En prenant comme seuil minimal une couverture des sols par les résidus de paille de 60% au lieu du seuil minimal de 30% recommandé [59], Kim et Dale ont montré que 354 000 t de paille de blé pourraient être valorisées au niveau mondial, permettant la production de 104 GL de bioéthanol par exemple [60].



**Figure 4** - (A) Épi de blé © Véronique Chable - INRA et (B) stock de balles de paille de blé sur le domaine expérimental d'Estrées-Mons © Gérard Paillard - INRA.

## **2 La paroi végétale**

Les ressources dédiées et les résidus de culture décrits précédemment possèdent un potentiel certain pour la production de bioénergie et pour la synthèse de molécules d'intérêt. Une gestion raisonnable et raisonnée de ces ressources pourrait permettre de diminuer notre dépendance aux ressources fossiles. Cette opportunité de transition écologique repose sur la valorisation des composés présents au sein de la paroi végétale qui est la source de biomasse la plus importante sur Terre.

La paroi végétale a été représentée pour la première fois par Robert Hooke en 1665, qui a observé cette structure sur de fines sections de liège. C'est d'ailleurs à cette occasion qu'il a introduit le concept de cellule, car les structures formées par les parois lui rappelaient les cellules des rayons de miel [61].

La paroi végétale est une structure rigide qui entoure la membrane plasmique de toutes les cellules végétales. Elle fonctionne comme un « exosquelette » qui va définir la forme que vont adopter les cellules, et par conséquent, impacter la morphologie des organes, voire de la plante entière [62]. La synthèse de la paroi résulte de l'expression de plus de 2 000 gènes, et de nombreux compartiments cellulaires participent à son élaboration, ce qui souligne sa complexité et son importance [63]. En plus de déterminer la forme et de contrôler l'élongation des cellules, la paroi sert également à apporter une résistance mécanique aux différents organes et à la plante entière, intervient dans les échanges entre la cellule et son environnement, participe de manière active à la résistance aux pathogènes aussi bien de manière physique que par l'activation de mécanismes biologiques [62, 64-66].

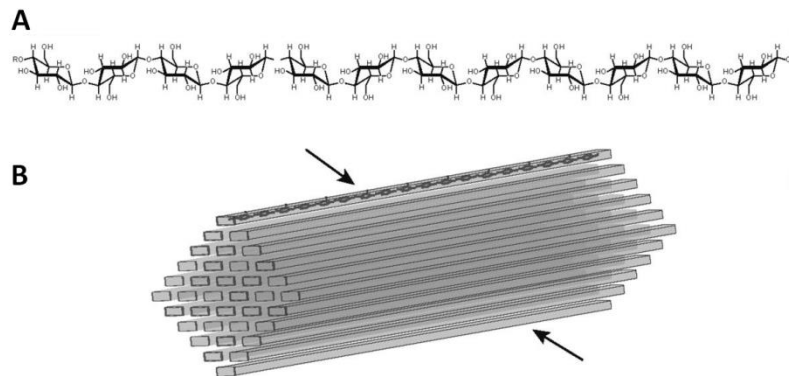
La structure et la composition de la paroi végétale diffèrent d'une plante à une autre, mais aussi au sein d'une même plante en fonction des rôles que doivent remplir les différents types cellulaires [62]. Néanmoins, les constituants de ces différentes parois restent sensiblement identiques. Les parois végétales sont ainsi majoritairement composées de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, et d'autres constituants tels que les pectines et des protéines.

## **2.1 La cellulose**

La cellulose a été découverte en 1838 par le chimiste français Anselme Payen qui a procédé à la dissolution partielle de plusieurs espèces végétales par de l'acide nitrique. Le nom « cellulose » fut attribué au résidu ainsi obtenu l'année suivante par l'Académie des sciences en 1839, qui décrivit le polymère comme un isomère de l'amidon [67].

La cellulose est le composé principal des parois végétales dont elle représente entre 20% et 50%, et constitue également la biomolécule la plus abondante sur Terre [18]. Il s'agit d'un homopolysaccharide linéaire non branché constitué exclusivement de monomères de  $\beta$ -glucopyranose liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -(1,4). La configuration  $\beta$  du carbone anomérique impose à chaque résidu une rotation de  $180^\circ$  par rapport au résidu vicinal. Il est donc plus juste de dire que l'unité de base des chaînes de cellulose est le cellobiose, un dimère

d'unités  $\beta$ -glucopyranose liées entre elles par une liaison  $\beta$ -(1,4). Cette rotation des résidus induit l'adoption d'une structure linéaire à l'échelle moléculaire (Figure 5-A).



**Figure 5** - (A) Chaîne de cellulose et (B) organisation des chaînes en microfibrille.  
Les flèches indiquent les faces hydrophobes de la cellulose.  
Adaptée d'après Horn *et al.* (2012) [68].

Ces molécules linéaires forment des chaînes dont le degré de polymérisation peut varier de plusieurs centaines à plus de 10 000 sous-unités [69, 70]. Ces chaînes sont stabilisées par l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires entre résidus de glucose vicinaux, mais aussi intermoléculaires avec les chaînes de cellulose voisines. Les chaînes de cellulose s'associent en effet pour former des microfibrilles (Figure 5-B) qui sont synthétisées par un large complexe protéique multimérique situé dans la membrane plasmique des cellules végétales et qui, selon le modèle le plus communément admis, regrouperait 36 cellulose synthases responsables chacune de la synthèse d'une chaîne de cellulose [71]. Au cours de leur synthèse, les chaînes établissent des liaisons hydrogène permettant de stabiliser les microfibrilles, qui s'agrègent également pour former des fibrilles plus larges (Figure 5-B) [72].

L'établissement de liaisons hydrogène entre les chaînes et entre les microfibrilles permet en effet de former des structures semblables à un câble rigide et extrêmement résistant [69]. Ces liaisons de faible énergie sont responsables de l'établissement de régions hautement organisées appelées régions cristallines, en opposition aux régions plus relâchées appelées zones amorphes où les liaisons hydrogène sont moins nombreuses [19, 69, 70].

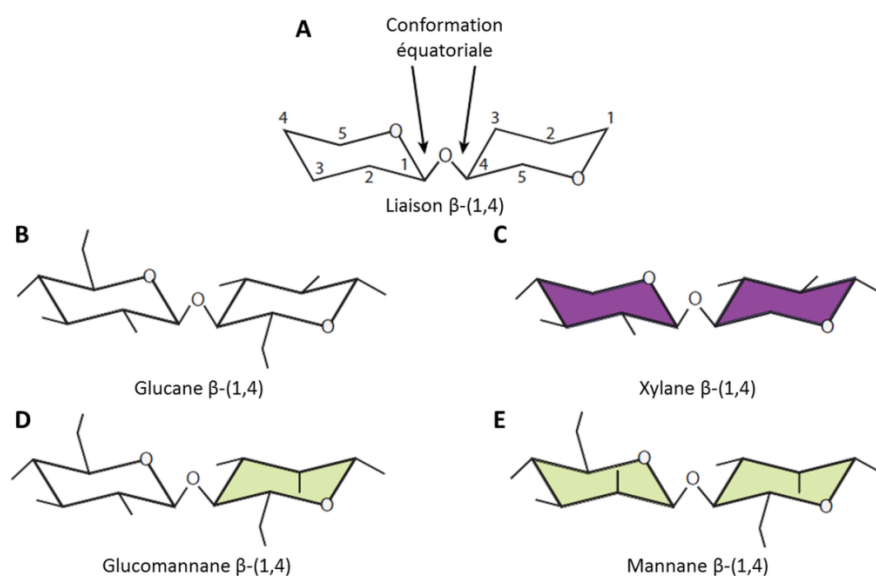
La structure décrite précédemment constitue l'isomorphe natif de la cellulose, ou isomorphe I. Il existe 6 isomorphes de la cellulose pouvant être obtenus par traitements chimiques de la cellulose native, qui en diffèrent néanmoins au niveau de l'établissement des liaisons hydrogène induisant un changement de la structure cristalline de la molécule [70]. La

cellulose II peut ainsi être obtenue par dissolution de la cellulose dans un solvant comme un liquide ionique, puis par sa régénération dans un anti-solvant comme l'eau [19, 70].

## 2.2 Les hémicelluloses

Le terme « hémicellulose » a été proposé pour la première fois par E. Schulze en 1891 pour désigner une substance entrant dans la composition des parois végétales, semblable à la cellulose mais pouvant être hydrolysée dans des solutions alcalines ou acides pour former des pentoses et des hexoses. Cette dénomination est basée sur l'hypothèse que les hémicelluloses sont des précurseurs de la cellulose [73].

Les hémicelluloses constituent entre 15% et 35% de la paroi végétale dont elles constituent la deuxième fraction saccharidique [18]. Contrairement à la cellulose qui est un homopolymère, les hémicelluloses forment un ensemble encore incomplètement défini de polysaccharides et désignaient à la base tous les polysides de la paroi qui ne faisaient partie ni de la cellulose, ni des pectines. Une définition proposée par Scheller et Ulvskov décrit les hémicelluloses comme étant un groupe hétérogène de polysaccharides constitués d'un squelette comportant des sous-unités de glucose, mannose ou xylose adoptant une conformation équatoriale et reliées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1,4) (Figure 6-A) [74]. Le squelette des hémicelluloses est hautement ramifié par des chaînes saccharidiques constituées d'hexoses (D-glucose, D-mannose, D-galactose), de méthyl-pentoses (L-fucose, L-galactose), de pentoses (D-xylose, D-arabinose) ou encore d'acides uroniques [75, 76].



**Figure 6** - Disaccharides constitutifs du squelette des hémicelluloses.  
Adaptée d'après Scheller et Ulvskov (2010) [74].

La structure du squelette, ainsi que les substituants qui y sont attachés, permettent de distinguer différents types d'hémicelluloses [74] :

- les xyloglucanes sont constitués d'un squelette d'unités de glucose (Figure 6-B) substitué en  $\alpha$ -(1,6) par de courtes chaînes latérales de xylose dont les résidus peuvent eux-mêmes porter en  $\alpha$ -(1,2) des monomères d'arabinose ou de galactose. Ces monomères de galactose peuvent être eux même substitués en  $\alpha$ -(1,2) par des monomères de fucose. Les xyloglucanes ont été trouvés dans les parois de toutes les plantes terrestres, principalement au niveau de la paroi primaire ;
- les xylanes possèdent un squelette de résidus de xylose (Figure 6-C) substitués principalement par des résidus d'arabinose dans les parois primaires des monocotylédones, et par des résidus d'acide glucuronique ou d'acide-4-O-méthyl glucuronique dans les parois secondaires des dicotylédones. Des groupements acétyles ou des résidus d'acide férulique sont également trouvés respectivement chez les xylanes des monocotylédones (parmi lesquelles figurent les graminées) et des dicotylédones (dont le peuplier fait partie) ;
- les glucomannanes et les mannanes présentent un squelette composé de monomères de mannose et de glucose (Figure 6-D) ou exclusivement par la répétition d'unités de mannose (Figure 6-E). Ces polymères, présents dans les parois de tous les types de plantes sont souvent acétylés. D'un point de vue évolutif, il semble qu'ils aient été progressivement remplacés par d'autres types d'hémicelluloses ;
- les  $\beta$ -glucanes sont constitués de résidus de glucose liés par des liaisons  $\beta$ -(1,4), mais aussi par des liaisons  $\beta$ -(1,3) moins fréquentes. Ces hémicelluloses sont absentes chez les dicotylédones et seraient abondantes au sein des parois primaires des Poacées, où elles jouent un rôle lors de la phase d'expansion des cellules végétales.

Le type d'hémicelluloses présentes dans les parois, leur proportion ainsi que la nature et leur degré de substitution dépendent à la fois de l'espèce considérée et du type cellulaire [18]. Ainsi, les xylanes substitués par des résidus d'acide glucuronique sont les hémicelluloses majoritaires des feuillus alors que les parois végétales des graminées comportent principalement des arabinoxylanes [69].

Toutes ces hémicelluloses possèdent toutefois des propriétés communes. Les hémicelluloses sont synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases avant d'être excrétées dans le milieu extracellulaire [74]. Leur degré de polymérisation, de



l'ordre de 70 à 200 unités monosaccharidiques, est beaucoup plus faible que celui de la cellulose [19, 69]. De plus, les diverses substitutions du squelette des hémicelluloses rendent ces polymères amorphes et plus susceptibles à la dépolymérisation que la cellulose dont les liaisons hydrogène stabilisent la structure [19, 76]

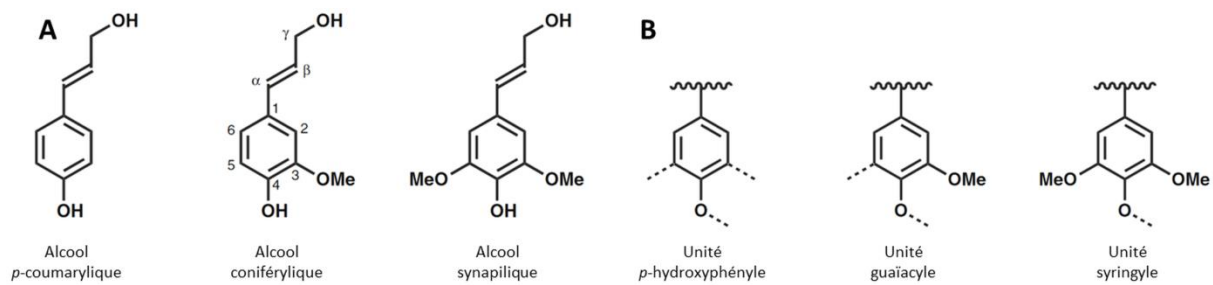
Le rôle principal des hémicelluloses est de s'associer avec les autres constituants des parois végétales afin d'en renforcer la structure. Les hémicelluloses vont ainsi se déposer à la surface des fibrilles de cellulose par établissement de liaisons hydrogène et participer à la stabilisation de l'association des microfibrilles [65], mais elles peuvent aussi former des liaisons covalentes entre les résidus d'acide férulique présents sur leurs chaînes latérales et les résidus phénoliques de la lignine [74, 77].

### **2.3 La lignine**

Le terme « lignine » a été introduit pour la première fois en 1813 par le botaniste suisse Augustin Pyramus de Candolle pour désigner une fraction végétale « fibreuse, insipide, insoluble dans l'eau, soluble dans les lessives alcalines faibles, et précipitée par les acides » [78].

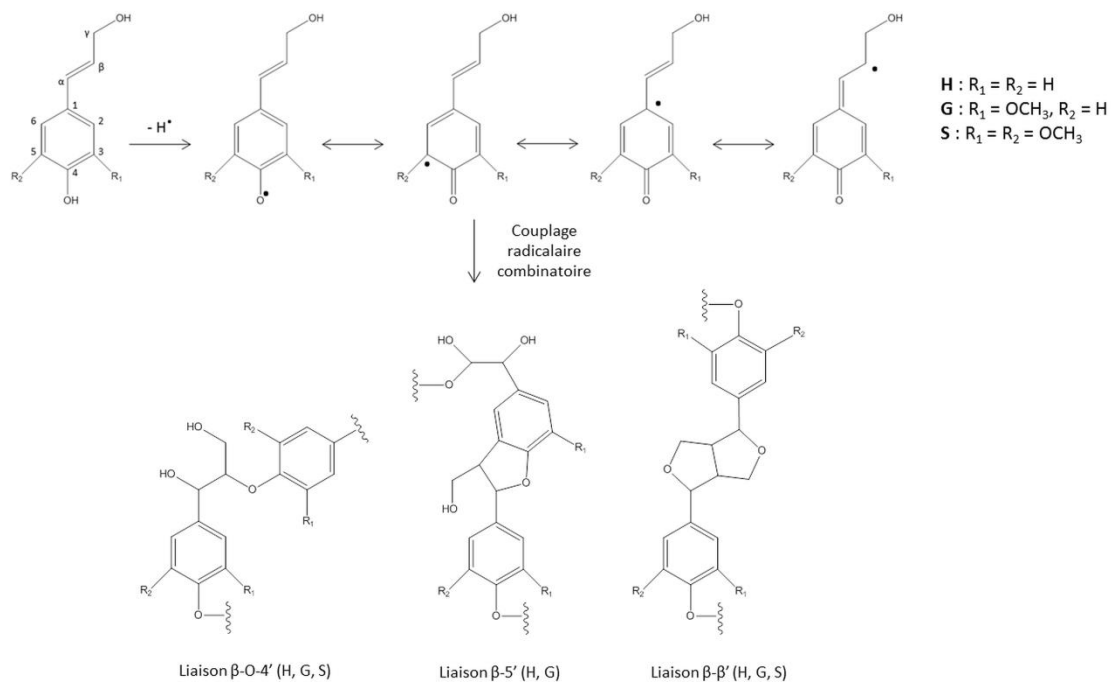
La lignine est le deuxième polymère le plus abondant sur Terre après la cellulose et représente entre 10% et 30% des parois végétales [69, 79]. Elle est principalement formée par la polymérisation de trois types d'unités 4-hydroxyphenylpropanoïdes, également appelées monolignols : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool synapylique [80]. Ces monolignols sont synthétisés au sein du cytoplasme à partir d'un acide aminé, la phénylalanine, et ils diffèrent par le degré de méthylation de leur noyau aromatique (Figure 7-A) [81]. La synthèse des monolignols résulte d'une cascade de réactions faisant intervenir une dizaine de familles d'enzymes différentes, et présentant de nombreux intermédiaires de synthèse [82]. Parmi eux, les acides *p*-coumarylique, férulique et synapilique, plus généralement appelés acides hydroxycinnamiques, présentent une fonction acide carboxylique à l'extrémité de la chaîne aryle et peuvent également entrer dans la composition de la lignine [79]. Les monolignols peuvent ensuite être transportés vers la vacuole pour y être stockés, vers l'appareil de Golgi pour l'acide férulique qui sera incorporé dans des polysaccharides comme la pectine ou les arabinoxylanes, et principalement vers le milieu extracellulaire où ils participeront à la formation de la lignine par polymérisation [83]. Au sein de la lignine, les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et synapylique sont dénommés unités *p*-hydroxyphényle (unité H), guaiacyle (unité G), et syringyle (unité S)

respectivement (Figure 7-B) [80]. En raison de la nature aromatique des unités constituant la lignine, ce polymère est hautement hydrophobe.



**Figure 7 -** (A) Structure des monolignols et (B) des unités constitutives de la lignine. Adaptée d'après Ralph (2010) [82].

La formation du polymère de lignine s'effectue par radicalisation oxydative des monolignols suivie d'un couplage combinatoire. Les monolignols sont d'abord déshydrogénés et les radicaux ainsi formés restent stables en raison de la délocalisation de l'électron non apparié au sein du système conjugué. Deux radicaux peuvent ensuite se coupler pour former un dimère via l'établissement d'une liaison covalente (Figure 8) [84].



**Figure 8 -** Formation des principales liaisons de la lignine à partir des radicaux monolignols.

L'oxydation des monolignols est catalysée par des peroxydases et des laccases qui utilisent respectivement le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène comme co-facteur [80]. Le

mécanisme par lequel les enzymes incorporées dans la membrane plasmique oxydent les monolignols n'est pas encore clairement défini. Les enzymes oxyderaient ainsi directement les monolignols qui diffuseraient ensuite vers le site de lignification pour se lier au polymère de lignine en formation. Une autre hypothèse fait intervenir un ion manganèse comme intermédiaire qui diffuserait vers le site de lignification pour transférer son état d'oxydation aux monolignols ou au polymère en formation [85].

Les radicaux formés peuvent ensuite se coupler spontanément de manière combinatoire. [80, 82]. En raison de la possibilité des électrons délocalisés de se coupler à différentes positions, les liaisons entre les monolignols sont variées (Figure 8) [79]. Toutefois, l'établissement de liaisons en position  $\beta$  est privilégié pour les alcools coniférylique et synapylique [84]. La liaison la plus fréquemment observée, et qui est aussi la plus facile à cliver chimiquement, est la liaison  $\beta$ -O-4' ou  $\beta$ -aryl éther (Figure 8). D'autres types de liaisons, considérées comme condensées, sont possibles, telles que les liaisons  $\beta$ - $\beta$ -résinol ou  $\beta$ -5-phénylcoumarane (Figure 8). Les acides hydroxycinnamiques présents au sein de la lignine peuvent également établir des liaisons esters relativement simples à cliver [82]. La présence de différents types de liaisons et l'absence de motifs répétés au sein du polymère suggère que la synthèse de la lignine dépend grandement du microenvironnement au sein de la paroi (pH, polysaccharides...) [86].

Bien que le processus de polymérisation des monolignols soit plus ou moins aléatoire car résultant d'un processus combinatoire purement chimique, la cellule végétale contrôle toutefois partiellement la structure de la lignine par la proportion de monolignols qu'elle délivre dans le milieu extracellulaire [84]. Les angiospermes dicotylédones, comme le peuplier, contiennent ainsi quasiment exclusivement des unités S et G, à quelques exceptions près [80], alors que la lignine des graminées monocotylédones comme le blé ou le miscanthus comporte également de faibles proportions d'unités H [79, 87]. De plus, l'initiation de la synthèse de la lignine est fortement contrôlée. Le dépôt de la lignine s'effectue d'abord au niveau de la lamelle moyenne et des coins de cellule de la paroi primaire après la formation de la première couche de la paroi secondaire [79]. Ces régions de la paroi étant les plus éloignées de la cellule en développement, il est hautement probable que la polymérisation de la lignine ne puisse être initiée qu'au niveau de sites bien spécifiques appelés sites de nucléation [88]. La nature de ces sites de nucléation n'est pas encore clairement définie, mais plusieurs hypothèses font état de l'implication de certaines protéines dans l'initiation de la polymérisation [83]. Il a également été suggéré que les acides féruliques étaient impliqués

dans l'initiation de la synthèse de la lignine, peut-être même directement au niveau des ponts diféruques reliant la lignine aux hémicelluloses, soulignant l'importance des liaisons entre les différents polymères pariétaux [82, 87].

## 2.4 Autres composés d'intérêt

En plus des polymères majoritaires que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, la paroi cellulaire comporte d'autres composés minoritaires tels que la pectine et certaines protéines.

### 2.4.1 La pectine

La pectine a été découverte par le chimiste français Louis-Nicolas Vauquelin en 1790, mais elle ne fut véritablement caractérisée en tant que polysaccharide qu'en 1825 par un autre chimiste français, Henri Braconnot. Ce dernier lui donna le nom de « pectine », dérivé du grec signifiant « pour congeler ou solidifier » [89]. Ce nom vient des propriétés gélifiantes du polymère, qui est aujourd'hui utilisé à des fins industrielles, principalement dans le domaine alimentaire où il entre dans la composition de gelées ou de confitures [89].

La pectine est la troisième fraction polysaccharidique des parois après la cellulose et les hémicelluloses. Elle est constituée de différents types de polysaccharides qui sont reliés entre eux par des liaisons covalentes. Les trois principales fractions pectiques sont les homogalacturonanes, qui sont des homopolymères constitués de résidus d'acide galacturonique liés en  $\alpha$ -(1,4) et qui constituent 65% de la pectine, et les rhamnogalacturonanes I et II dont la composition est complexe [90, 91] :

- les rhamnogalacturonanes I ont un squelette composé par la répétition du disaccharide  $[4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1,2)-}\alpha\text{-L-Rha-(1,)]$ , au sein duquel le résidu d'acide galacturonique est hautement acétylé, et substitué par des chaînes comportant des résidus d'arabinose, de rhamnose, et dans une moindre proportion de fucose et d'acide galacturonique. Bien que les constituants de cette fraction pectique soient connus, il n'a pas encore été possible de décrire une structure précise car les ramifications du squelette évoluent en fonction du type cellulaire et du stade de développement considéré ;
- les rhamnogalacturonanes II possèdent un squelette homogalacturonane qui peut être substitué par 4 types de ramifications différentes et de compositions chimiques complexes.

Les résidus monomériques constituant la pectine peuvent être acétylés ou méthylés de manière enzymatique, notamment via l'intervention de pectine-méthylestérases. La cellule végétale, en modifiant la structure et les propriétés du polymère dont le rôle majeur est d'assurer un support structurel à la paroi, peut ainsi réguler sa propre forme et par conséquent son développement [92]. La pectine participe aussi au développement des cellules par l'établissement de dimères de rhamnogalacturonanes II, ce qui permet de renforcer l'adhésion cellule-cellule au sein des tissus. Enfin, la pectine constitue un réservoir d'oligosaccharides qui servent de molécules de signalisation pour les phases de développement, mais qui vont également initier des réactions immunitaires en cas de dégradation du polymère par un pathogène [90].

#### 2.4.2 Les protéines pariétales

La paroi végétale comprend un nombre important de protéines aux fonctions variées. L'étude du protéome pariétale par des approches appliquées classiquement aux autres compartiments cellulaires présente des limitations principalement liées à la complexité de la paroi, qui est une matrice ouverte et sujette aux contaminations par les autres compartiments pendant les procédures d'extraction. De plus, certaines protéines interagissent fortement avec la matrice pariétale et sont donc difficilement extractibles [93, 94].

La base de données WallProtDB qui regroupe les données expérimentales de protéomiques relatives à la paroi végétale contient 2 170 protéines identifiées dans les parois de 11 espèces différentes [95]. Des différences dans les protéomes sont observées entre différentes espèces, mais aussi entre les différents organes d'une même plante [93], ce qui souligne une fois de plus la spécialisation de la paroi en fonction des besoins du type cellulaire considéré.

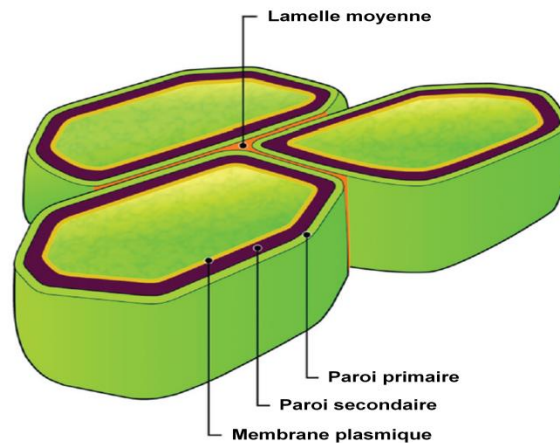
Ces protéines peuvent être classées en 8 grandes catégories, basées sur la prédiction par bioinformatique de leur fonction ou de leurs interactions au sein de la paroi [96]. Une de ces catégories regroupe un large nombre de protéines de fonctions inconnues, qui forme une base de recherche intéressante pour renforcer notre compréhension des mécanismes de biosynthèse de la paroi [97].

### 2.5 Organisation de la paroi végétale

La paroi végétale a fait l'objet de nombreuses recherches pour comprendre sa formation et sa structure depuis que Keegstra *et al.* ont proposé le premier modèle d'organisation de la

---

paroi primaire appliqué au sycomore en 1973 [98]. Cette structure qui délimite les cellules végétales présente une organisation pluristratifiée formée par une lamelle moyenne, une paroi primaire et une paroi secondaire dont la mise en place s'effectue de manière successive au cours du développement de la cellule (Figure 9) [99].



**Figure 9** - Organisation générale de la paroi végétale.  
Adaptée d'après Brandt *et al.* (2013) [19].

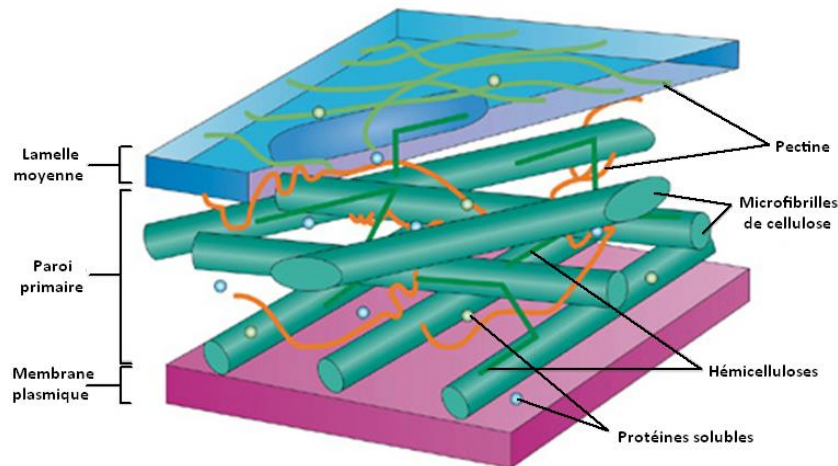
### 2.5.1 La lamelle moyenne

La lamelle moyenne est une structure amorphe majoritairement constituée de pectine et de lignine. La pectine agit comme un ciment naturel au sein de la lamelle moyenne en assurant l'adhésion des cellules adjacentes. L'épaisseur de cette structure peut aller de quelques centaines de nm à environ 5  $\mu\text{m}$  au niveau des coins de cellules [100].

La lamelle moyenne est formée au moment de la division cellulaire par une exocytose massive de vésicules contenant des homogalacturonanes, afin de former une plaque cellulaire entre les deux cellules filles. Après l'initiation de la synthèse de la paroi secondaire, la lignification de la paroi débute au niveau de la lamelle moyenne et des coins de cellules [83].

### 2.5.2 La paroi primaire

Le dépôt de la paroi primaire autour de la cellule commence quand la lamelle moyenne est formée, et se poursuit tout au long de la croissance de la plante [99]. La paroi primaire est constituée majoritairement de microfibrilles de cellulose intégrées dans une matrice essentiellement polysaccharidique d'hémicelluloses et de pectine, et comprenant environ 10% de protéines structurales et d'enzymes [69, 90, 92]. L'épaisseur de la paroi primaire est comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  (Figure 10) [99].



**Figure 10** - Structure de la paroi primaire et de la lamelle moyenne.  
Adaptée d'après Sticklen (2010) [101].

Deux types de parois primaires peuvent être définis en fonction de leur composition. Les parois primaires de type I, retrouvées chez les plantes dicotylédones et chez les monocotylédones hors graminées, sont constituées de cellulose et de xyloglucanes qui sont enrobés dans une abondante matrice de pectine. Les graminées forment des parois primaires de type II, dont les hémicelluloses principales sont des glucuronoarabinoxylanes, et au sein desquelles les proportions de pectine et de protéines structurales sont beaucoup plus faibles [90, 101].

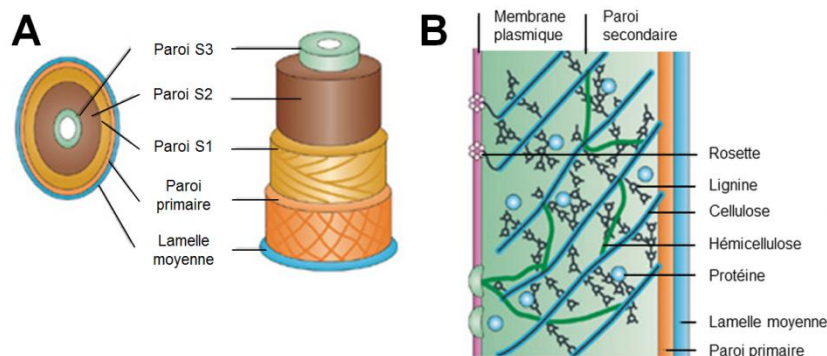
Les microfibrilles de cellulose sont principalement orientées de manière transversale par rapport à l'axe de la cellule [100]. La pectine limite les contacts directs entre les microfibrilles, facilitant ainsi leurs mouvements les unes par rapport aux autres au fur et à mesure que la paroi croît [102]. De nouvelles hypothèses émergent quant à l'organisation de la paroi primaire et notamment le rôle des xyloglucanes, principalement basées sur le développement des techniques d'imagerie [103] ou de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) [104, 105]. La théorie des points chauds fait état de sites d'interactions limitées entre les xyloglucanes et la cellulose au niveau desquelles plusieurs microfibrilles seraient en contact étroit. C'est au niveau de ces points chauds que les expansines agiraient pour favoriser un relâchement de la structure de la paroi primaire et ainsi permettre son expansion [102, 106].

### 2.5.3 La paroi secondaire

En plus de la lamelle moyenne et de la paroi primaire, de nombreuses cellules spécialisées synthétisent une paroi secondaire rigide dont la composition et la structure varient

en fonction des types cellulaires [99]. La mise en place de la paroi secondaire est considérée comme étant une évolution majeure ayant permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre, puisqu'elle apporte le soutien mécanique indispensable pour adopter un port dressé tout en conférant aux vaisseaux la rigidité nécessaire pour transporter l'eau et les nutriments essentiels à la croissance de la plante. Ces tissus représentant la grande majorité des structures aériennes des plantes, la paroi secondaire constitue la source la plus importante de biomasse végétale, et il est estimé qu'elle représente environ 70% de la biomasse des plantes terrestres [107, 108].

La paroi secondaire est composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Elle comprend trois sous-couches S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne) formées successivement et qui diffèrent notamment par l'orientation des microfibrilles de cellulose. Les couches S1 et S3 sont généralement fines alors que la couche S2 est beaucoup plus épaisse (Figure 11-A) [109].



**Figure 11 - Structure de la paroi secondaire.**  
 (A) Agencement des différents polymères et (B) orientation des fibrilles de cellulose dans les sous-couches de la paroi secondaire.  
 Adaptée d'après Sticklen (2010) [101].

Les microfibrilles de cellulose contenues dans la paroi secondaire ont un degré de cristallinité plus important et peuvent s'agréger en structures de plus grande taille que la cellulose de la paroi primaire [106]. Elles constituent les unités structurantes de la matrice pariétale qu'elles forment par association non-covalente avec les hémicelluloses. Après la mise en place des microfibrilles de cellulose dans la sous-couche S3, la lignification de la paroi est initiée d'abord au niveau de la lamelle moyenne où la teneur en lignine est généralement plus élevée, avant de s'étendre à travers la paroi primaire puis secondaire (Figure 11-B) [83].



L'imprégnation de la lignine au sein du réseau formé par la cellulose et les hémicelluloses confère une résistance mécanique plus importante à la paroi secondaire, et augmente sa rigidité et son hydrophobie [109]. De plus, la lignine peut se lier de manière covalente aux hémicelluloses ramifiées via l'établissement de ponts diféruliques pour former des complexes lignine-polysaccharide (*lignin-carbohydrate complex*, LCC) infranchissables pour les enzymes [18]. Les cellules lignifiées sont destinées à mourir suite à l'établissement de cette paroi secondaire imperméable, mais extrêmement résistante qui peut rester en place des décennies, voire des siècles après la mort de la cellule qui a initié sa synthèse [19].

Cette résistance exceptionnelle de la paroi secondaire sans intervention d'un processus de défense biologique est due à la présence de la lignine, difficilement dégradable en raison de sa structure polyaromatique conjuguée, qui forme une barrière physique autour des autres constituants. De plus, l'hydrophobie de la lignine exclurait les molécules d'eau de la paroi, ce qui permettrait de prévenir la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses par des réactions d'hydrolyse chimique ou enzymatique [18].

### **3 Valorisation de la biomasse lignocellulosique**

#### **3.1 Le concept de bioraffinerie**

L'intérêt grandissant pour la déconstruction raisonnée des polymères végétaux dans une optique de production de composés à haute valeur ajoutée et de biocarburants est à l'origine du développement du concept de bioraffinerie. La bioraffinerie a pour but le raffinage de matières végétales brutes pour la production de produits biosourcés, de manière analogue aux processus de valorisation des ressources fossiles. Plusieurs générations de bioraffineries ont été définies, en fonction de la matière première utilisée.

Les deux premières générations de bioraffineries ont déjà été mentionnées précédemment. Les bioraffineries de première génération reposent sur l'utilisation des ressources comestibles des plantes, tels que l'amidon des plantes céréalières, le saccharose de certaines espèces comme la canne à sucre ou la betterave, ou encore les huiles végétales contenues dans des plantes comme le tournesol ou le palmier à huile [110]. Les bioraffineries de seconde génération sont basées sur l'utilisation des fractions non alimentaires des plantes, et plus particulièrement la lignocellulose. Les matières premières utilisées, et qui ont été discutées plus en détail précédemment, sont des cultures dédiées, des résidus agricoles ou forestiers, ou encore des déchets végétaux.

Une troisième génération de bioraffinerie a également vu le jour, qui repose sur la culture de microalgues. Ces microorganismes peuvent produire un volume d'huile végétale par hectare 15 à 300 fois plus important que celui des plantes terrestres, et leur cycle de culture court (entre un et dix jours en fonction du procédé appliqué) pourrait permettre une récolte en continu [111]. Bien que les huiles produites par ces microalgues soient majoritairement destinées à une production de biodiesel, les microalgues connaissent un intérêt grandissant pour la production de nombreux composés pharmaceutiques et cosmétologiques [112]. Les recherches actuelles sur les microalgues se concentrent sur l'amélioration des photobioréacteurs et des bassins dans lesquels les algues sont cultivées, sur l'optimisation des conditions de culture, des souches utilisées, mais aussi l'extraction des composés d'intérêt contenus dans les cellules microalgales [112, 113].

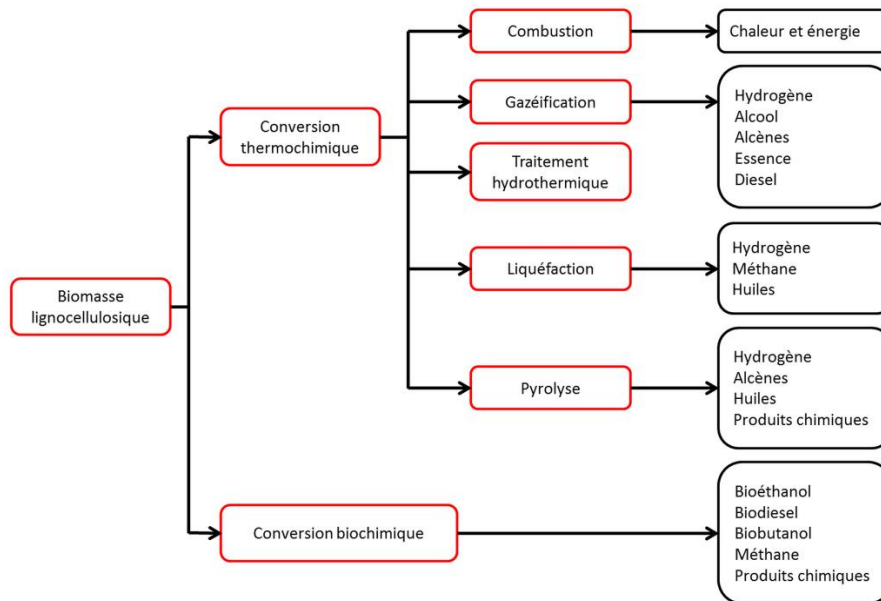
Bien que la troisième génération de bioraffinerie soit encore en plein développement, une quatrième génération est d'ores et déjà en train de se développer, basée sur les progrès récents de la biologie synthétique. Cette technologie pourrait permettre à terme d'utiliser des microalgues ou des cyanobactéries génétiquement modifiées, ou certains de leurs organites couplés à un système photovoltaïque, dans le but d'excréter directement la molécule d'intérêt en grande quantité [114].

Toutes ces générations de bioraffineries présentent leurs avantages et leurs inconvénients. La première génération, par exemple, est la seule qui a été développée de manière rentable à une échelle industrielle, mais elle utilise directement des ressources alimentaires. L'utilisation de la biomasse lignocellulosique ou des microalgues pourrait permettre de s'affranchir de cette compétition avec l'industrie alimentaire, mais de nombreux obstacles technologiques doivent encore être surmontés pour que ces biomasses puissent couvrir nos besoins. Toutefois, toutes les générations de bioraffineries auront un rôle important à jouer pour répondre au défi environnemental de l'utilisation des ressources fossiles.

### **3.2 La bioraffinerie de deuxième génération**

La transformation des polymères contenus dans les parois végétales décrits précédemment entre dans le cadre du bioraffinage de deuxième génération. De nombreuses techniques ont été mises au point pour tenter de valoriser au mieux le potentiel des polymères pariétaux pouvant être majoritairement classées en deux grandes catégories : les conversions

thermochimiques et biochimiques [7, 115]. Ces voies ainsi que les produits auxquelles elles peuvent aboutir sont synthétisées en Figure 12.



**Figure 12** - Voies de transformation de la biomasse lignocellulosique et produits finaux. Adaptée d'après Menon et Rao (2012) [116].

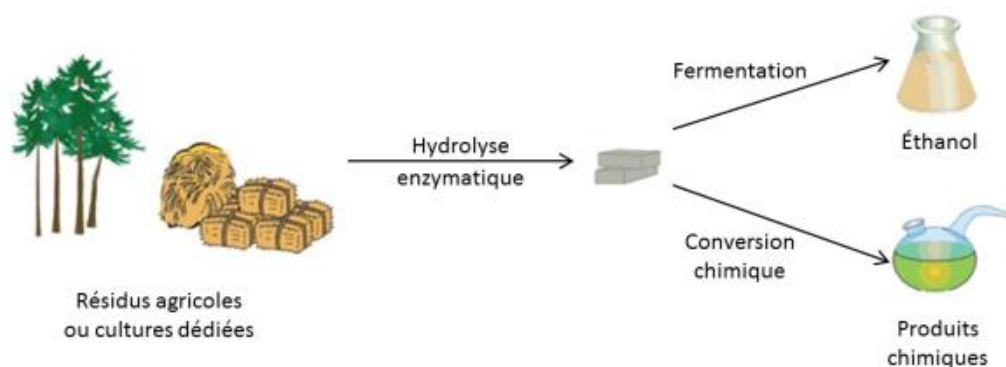
La valorisation thermochimique de la biomasse a pour but principal une valorisation énergétique par combustion en présence de faibles quantités d'oxygène, permettant la production de gaz de synthèse (*synthesis gas* ou *syngas*). Ce syngas peut ensuite être brûlé directement ou retraité ultérieurement pour la production de biocarburants liquides ou gazeux, de manière analogue à la conversion thermochimique du charbon [7]. Plusieurs voies de production de syngas existent. Parmi elles, la gazéification permet de convertir la biomasse par combustion à des températures comprises entre 900°C et 1 300°C en fonction de la présence ou de l'absence d'un catalyseur pendant la réaction [7]. La pyrolyse est une décomposition thermique de la biomasse en absence d'oxygène qui s'effectue généralement entre 400 et 700°C. La pyrolyse permet de produire, en plus du syngas, une bio-huile pouvant servir à la production de solvants, de chaînes carbonées ou d'électricité [117].

La liquéfaction est un autre procédé de conversion thermochimique au cours de laquelle la biomasse est mise en contact avec du syngas et un catalyseur adapté pour produire un liquide semblable au fioul lourd. L'ajout d'un catalyseur alcalin peut permettre la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses en fragments plus petits, alors que la lignine est dépolymérisée mais tend à reformer un résidu solide [7].

Les voies de conversion thermochimiques peuvent être appliquées à des biomasses variées lors d'un même processus continu, et permettent une transformation rapide des résidus végétaux, de l'ordre de 0,1 s pour la gazéification à 100 s pour la pyrolyse [18]. Toutefois, elles nécessitent des conditions de température et de pression relativement drastiques et les produits obtenus présentent une variété et une pureté insuffisantes pour permettre une valorisation efficace autre que sous forme de production d'énergie [118]. C'est pourquoi la valorisation enzymatique des polymères pariétaux est aujourd'hui privilégiée.

### 3.3 La valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique

La conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique est réalisée à l'aide d'enzymes capables de dégrader les polymères pariétaux en monomères ou en oligomères. L'utilisation d'enzymes lignocellulolytiques présente l'intérêt majeur de permettre une transformation de la biomasse dans des conditions douces de température et de pH, et à pression atmosphérique, ce qui engendre un coût énergétique largement inférieur par rapport aux autres voies de valorisation. De plus, les enzymes offrent une haute sélectivité permettant la production de produits d'intérêt relativement purs [18]. Les polymères dégradés sont ensuite valorisés par conversion chimique pour produire des produits à haute valeur ajoutée, ou transformés par des microorganismes fermentaires pour produire des composés d'intérêt comme les biocarburants (Figure 13) [115].



**Figure 13** - Voies de conversion biochimique de la biomasse lignocellulosique.

La capacité naturelle à dégrader les polymères pariétaux est retrouvée chez un nombre varié de microorganismes comme certaines archées, des champignons filamenteux ou des bactéries, et même chez certains invertébrés comme des insectes ou des crustacés [119]. Certaines bactéries anaérobies peuvent regrouper diverses activités lignocellulolytiques au

sein de larges complexes protéiques appelés cellulosomes qui peuvent être attachés à la membrane cellulaire ou libérés dans le milieu extracellulaire [120]. Cependant, la plupart des microorganismes lignocellulolytiques sécrètent des enzymes non-associées. C'est le cas des champignons ascomycètes aérobies tels que *Trichoderma* et *Aspergillus* sur lesquels les recherches pour la production industrielle d'enzymes se sont principalement portées, en raison de leur capacité à sécréter des cocktails efficaces pouvant atteindre des titres supérieurs à 100 g/L [18].

L'hydrolyse enzymatique des parois végétales demeure difficile à appréhender en raison de la structure complexe des polymères pariétaux. Ces composés étant insolubles, les enzymes sont obligées d'agir à l'interface solide-liquide, induisant des réactions beaucoup plus lentes que dans le cas d'enzymes diffusant librement [18]. Toutefois, il est admis qu'une conversion efficace requiert l'intervention de plusieurs types d'enzymes agissant de manière synergique sur les différents constituants des parois.

## **4 Les enzymes lignocellulolytiques**

### **4.1 Classification des enzymes lignocellulolytiques**

La base de données CAZy (Carbohydrate Active enZymes) regroupe l'ensemble des enzymes pouvant créer, modifier ou cliver des liaisons glycosidiques [121]. Elle fut initiée en 1989 avec la première classification de cellulases en familles de CAZymes basée sur des homologies de séquences d'acides aminés [122], avant d'être étendue à toutes les glycoside hydrolases (GH), puis à toutes les enzymes agissant sur les liaisons glycosidiques [116].

Cette base de données divise les enzymes lignocellulolytiques en trois grandes catégories : les GH (EC 3.2.1.-) regroupant les enzymes pouvant cliver les liaisons entre deux unités saccharidiques, les carbohydrate estérases (CE) (EC 3.1.1.-) regroupant les enzymes pouvant cliver des liaisons ester carboxylique notamment au niveau des hémicelluloses, et les activités auxiliaires (AA) regroupant des enzymes clivant les liaisons de la lignine ou des polysaccharides à l'aide d'un mécanisme d'oxydo-réduction [121].

Bien qu'elle permette de distinguer les enzymes lignocellulolytiques en fonction de leur structure et de leur activité, la classification CAZy semble moins satisfaisante quand il s'agit de distinguer les enzymes en prenant comme référence les fractions pariétales qu'elles visent. Ainsi, les GH regroupent aussi bien des enzymes agissant sur la cellulose que sur les hémicelluloses. De ce fait, la dénomination des enzymes lignocellulolytiques varie au sein de

la communauté scientifique, en fonction principalement du but considéré lors de la dégradation des parois. Certains considèrent que les hémicellulases font partie des enzymes accessoires, qui regroupent toutes les enzymes dont le but est d'exposer les fibrilles de cellulose, et donc de faciliter l'accès des cellulases [123, 124]. D'autres considèrent les hémicellulases comme une catégorie à part entière s'ajoutant aux deux précédentes. Toutefois, la notion d'hémicellulases varie également dans la littérature. Elles peuvent ainsi regrouper uniquement les enzymes agissant sur les chaînes principales des hémicelluloses, et donc ne pas tenir compte des activités dites « débranchantes » de certaines GH ou des CE qui sont alors considérées comme des enzymes accessoires [125, 126]. Pour d'autres, les hémicellulases sont l'ensemble des enzymes dégradant les hémicelluloses, indépendamment de leur spécificité d'action [115, 127]. C'est cette dernière classification des activités enzymatiques qui sera adoptée ici.

## 4.2 Les cellulases

### 4.2.1 Importance et diversité des cellulases

De manière ironique, les recherches sur les cellulases ont débuté au cours de la Seconde Guerre mondiale afin de prévenir leur action, lorsque l'armée américaine a lancé un programme destiné à lutter contre la détérioration des textiles en coton entrant dans la conception des uniformes et des tentes lors de campagnes dans les jungles du Pacifique Sud [128]. Ces recherches ont abouti dans les années 1950 à l'identification du champignon filamenteux producteur de cellulases *Trichoderma viride* [129]. Renommé *Trichoderma reesei* dans les années 1970 en hommage à Elwyn T. Reese qui l'a découvert [130], il est depuis devenu l'organisme le plus cultivé pour la production de cellulases [131].

Les cellulases représentent désormais la troisième classe d'enzymes les plus largement produites au niveau industriel [132]. Elles sont utilisées dans des domaines aussi variés que l'industrie papetière, l'industrie textile, la production de bière et de vin ou encore l'alimentation animale [133, 134]. Elles sont destinées à devenir les principales enzymes industrielles en cas de développement d'un procédé rentable et efficace de production de biocarburant par dégradation enzymatique des parois végétales [132].

Bien que toutes les cellulases catalysent l'hydrolyse de liaisons  $\beta$ -(1,4) entre deux résidus de glucose, des différences de structure et de mécanisme d'action sont observées entre

deux espèces, mais aussi entre les enzymes produites par un même organisme. C'est pourquoi les cellulases sont réparties au sein de plusieurs familles de GH (Tableau 1) [121].

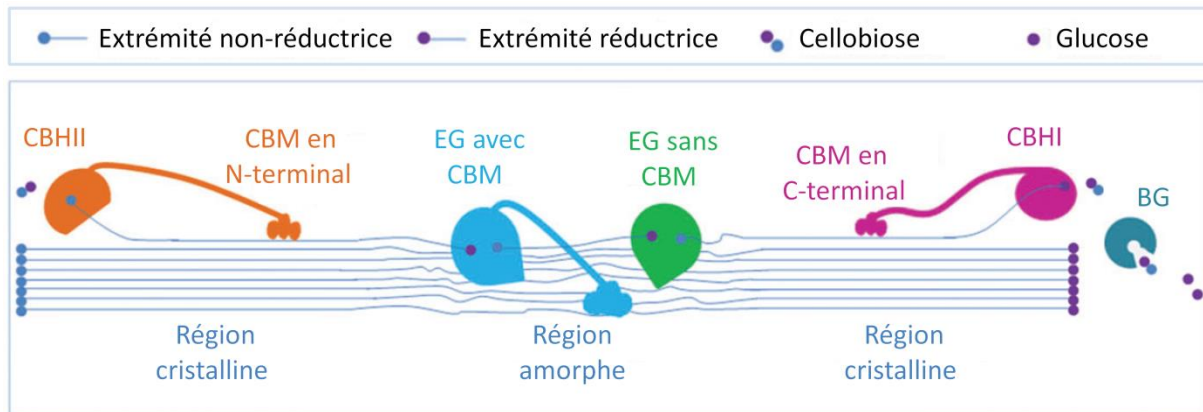
**Tableau 1.** Répartition des cellulases dans les différentes familles de glycosides hydrolases (d'après la base de données CAZy [121]).

Catégories d'enzymes	Organismes	Activités recensées	Familles de GH
Endoglucanases	Archées	7	5 / 12
	Bactéries	410	5 / 6 / 8 / 9 / 10 / 12 / 26 / 44 / 45 / 48 / 51 / 74 / 124
	Eucaryotes	251	5 / 6 / 7 / 9 / 12 / 44 / 45 / 74
Cellodextrinases	Bactéries	12	1 / 3 / 5 / 9
	Eucaryotes	3	1
Cellobiohydrolases	Bactéries	20	5 / 6 / 9 / 48
	Eucaryotes	93	6 / 7
$\beta$ -glucosidases	Archées	11	1 / 116
	Bactéries	198	1 / 2 / 3 / 9 / 119
	Eucaryotes	196	1 / 3 / 5 / 30

#### 4.2.2 Mode d'action des cellulases

Les cellulases peuvent être divisées en trois catégories d'enzymes qui diffèrent par leurs propriétés structurales : les endoglucanases ou 1,4- $\beta$ -D-glucane glucanohydrolases (EC 3.2.1.4), les exoglucanases comprenant les cellodextrinases, ou 1,4- $\beta$ -D-glucane glucanohydrolases (EC 3.2.1.74), et les cellobiohydrolases, ou 1,4- $\beta$ -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), et enfin les  $\beta$ -glucosidases, ou  $\beta$ -glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) [56, 115, 125, 128, 135-137].

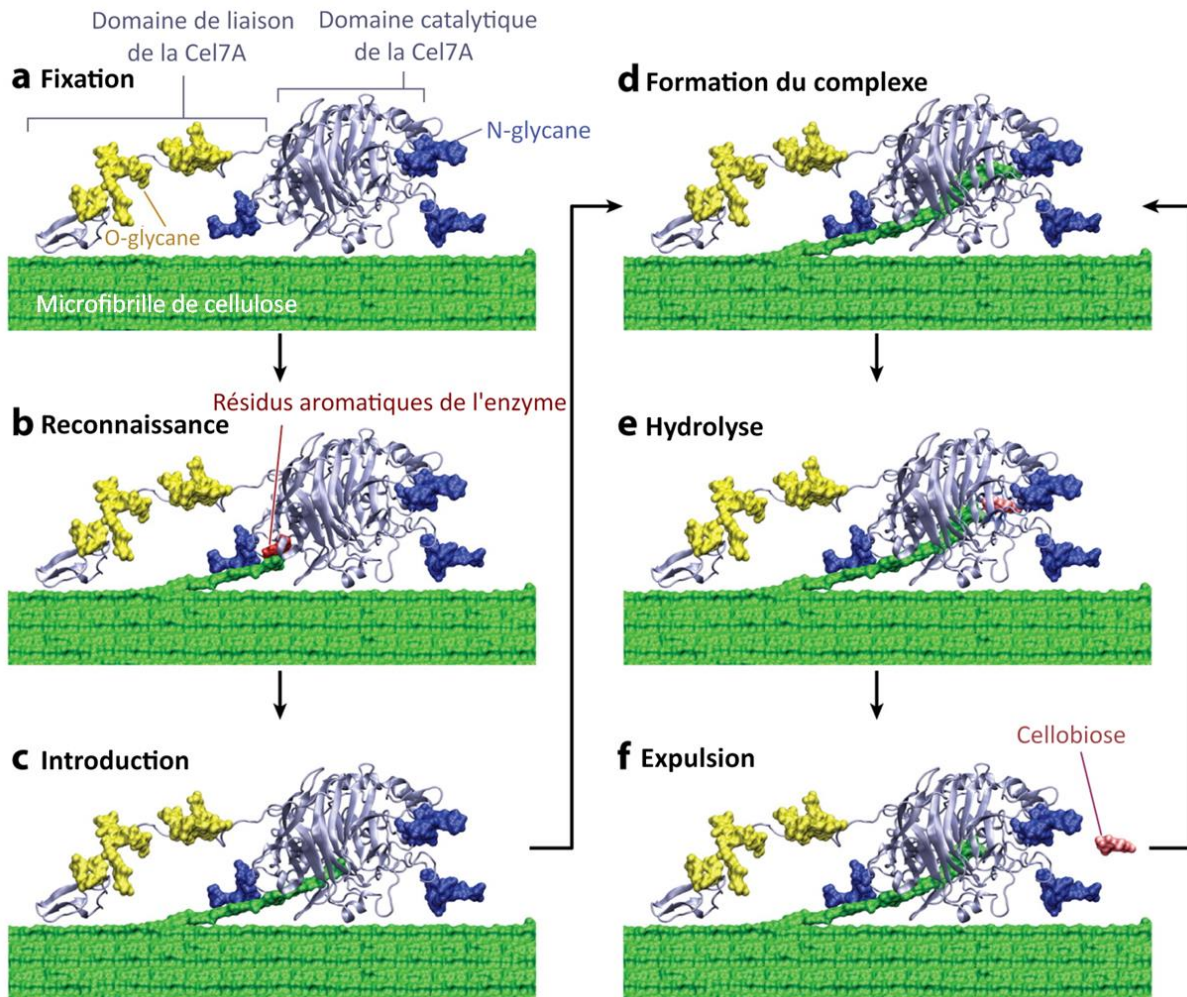
Les endoglucanases (EG) peuvent cliver de manière aléatoire les liaisons  $\beta$ -(1,4) internes des régions amorphes. Les exoglucanases agissent de manière processive pour hydrolyser les extrémités réductrices et non-réductrices et libérer soit du glucose dans le cas des cellodextrinases, soit du cellobiose dans le cas des cellobiohydrolases (CBH). Enfin, les  $\beta$ -glucosidases (BG) hydrolysent le cellobiose produit en monomère de glucose [137] (Figure 14).



**Figure 14** - Modèle classique de l'action des cellulases sur une macrofibrille de cellulose. EG : endoglucanase, CBH : cellobiohydrolase, CBM : *carbohydrate binding module*, BG :  $\beta$ -glucosidase. Adaptée d'après Liu *et al.* (2016) [136].

Les systèmes cellulolytiques naturels et commerciaux sont dominés par les CBH qui agissent de manière processive sur les chaînes de cellulose [138]. Les CBH de type I et de type II représentent ainsi jusqu'à 60% et 20% des enzymes produites par *T. reesei* respectivement [130, 139]. Il est important de noter que les CBH de type I et de type II sont désormais appelées Cel7A et Cel6A dans la nomenclature révisée des enzymes lignocellulolytiques [140]. Les premières recherches effectuées pour déterminer la structure des CBH ont montré que le site actif de ces enzymes était situé au sein d'un tunnel [141-143] ou d'une crevasse [133]. Ces structures expliquent la différence de mécanisme catalytique avec les EG. Les enzymes Cel7A et Cel6A se fixent à la surface des microfibrilles de cellulose (Figure 15-a) puis viennent se positionner au niveau de leurs extrémités réductrices et non-réductrices respectivement (Figure 15-b) [18, 136]. Les chaînes de cellulose sont ensuite introduites dans le site actif de manière individuelle (Figure 15-c et 15-d), au sein duquel elles seront hydrolysées (Figure 15-e). À la fin de la réaction, le produit est expulsé et l'enzyme s'associe de nouveau à la chaîne raccourcie pour réaliser une nouvelle hydrolyse (Figure 15-f) [18]. En raison de la rotation à  $180^\circ$  entre les résidus de glucose vicinaux, les CBH libèrent des molécules de cellobiose, et non des monomères de glucose [141, 144]. L'observation de la processivité de l'enzyme Cel7A de *T. reesei* par microscopie de force atomique a montré que son activité catalytique était indispensable pour lui permettre de glisser le long des chaînes de cellulose [145].





**Figure 15** - Dégradation des microfibrilles de cellulose cristallines par une Cel7A. Adaptée d'après Chundawat *et al.* (2011) [18].

Ce mécanisme processif a également été observé chez certaines EG [146, 147]. Ces enzymes agissent alors de manière semblable aux CBH, mais en coupant la fibrille de cellulose qui passe à travers le site actif à divers endroits [68].

#### 4.2.3 Synergie au sein du système cellulolytique

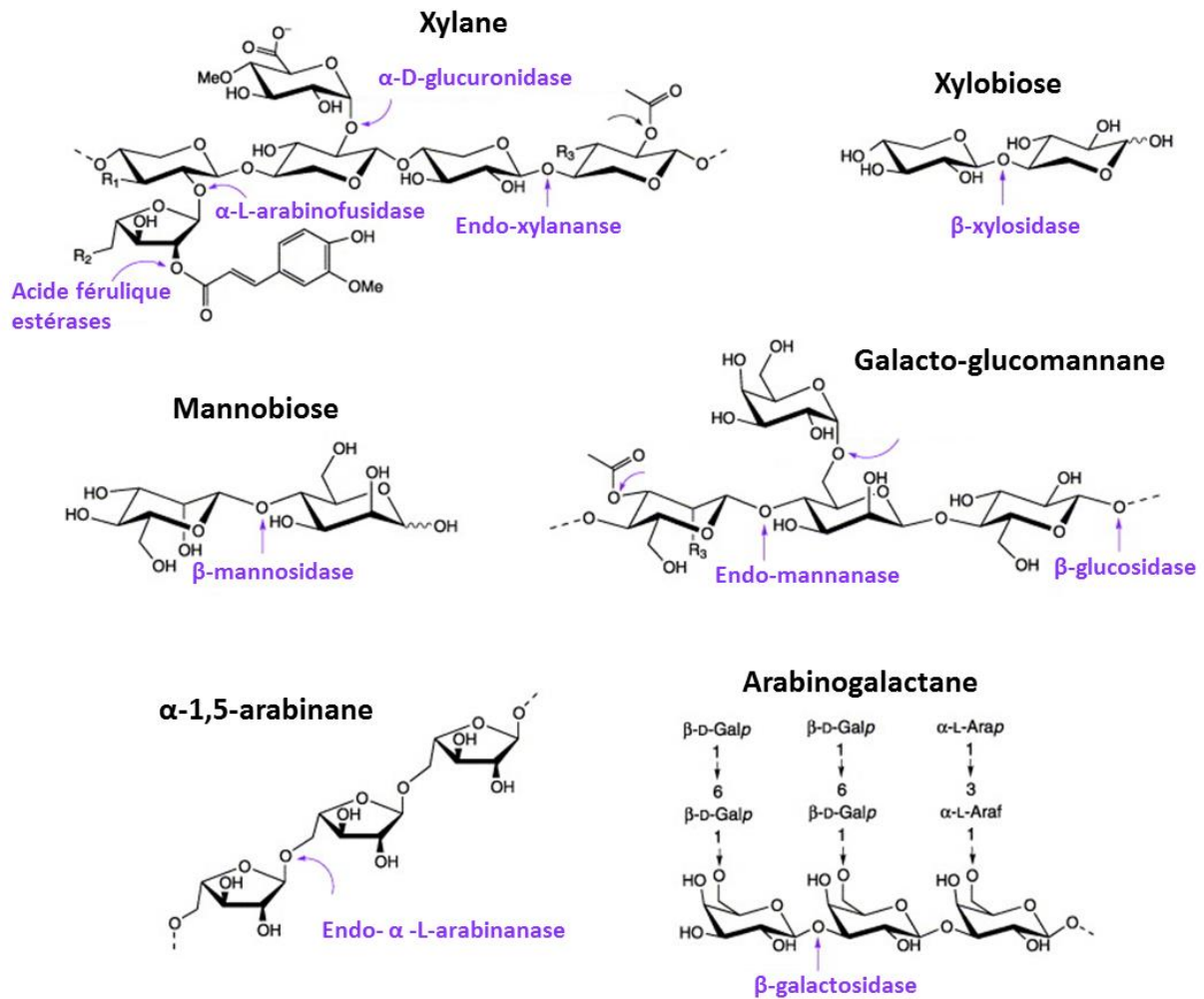
Une synergie entre les différents types de cellulases a été observée dès les premiers travaux sur ces enzymes [148], et s'opère à plusieurs niveaux. Une première synergie, dite « endo-exo » et décrite pour la première fois par Wood *et al.* [149], résulte de l'action des endoglucanases qui permettent la formation de nouvelles extrémités réductrices et non réductrices qui pourront être attaquées par les Cel7A et les Cel6A respectivement [150]. Un deuxième type de synergie, dénommée « exo-exo » par Fagerstam et Petterson [151], a été observé entre les Cel7A et les Cel6A, mais son mécanisme précis reste incompris. Deux

hypothèses différentes font état d'une potentielle activité endolytique de la part d'une des deux CBH, ou d'une différence de spécificité des deux CBH : l'action de l'une permettrait de libérer une surface plus adéquate à la fixation, et donc à l'action de l'autre [152]. Enfin, les  $\beta$ -glucosidases dégradent le cellobiose responsable d'une inhibition par le produit des CBH [137, 153].

### **4.3 Les hémicellulases**

Les hémicellulases regroupent les GH et les CE responsables de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et ester retrouvées au sein des hémicelluloses [121]. Les bactéries aérobies telles que les *Bacilli* sécrètent des systèmes enzymatiques incomplets aboutissant à la formation d'oligosaccharides qu'elles pourront ensuite dégrader à l'aide d'enzymes intracellulaires [123]. Cette stratégie leur confère un avantage sur les autres organismes qui ne sont pas capables de dégrader les oligosaccharides, et est également mise à profit pour une production biotechnologique d'oligosaccharides dérivés des hémicelluloses, pouvant être valorisés comme tensioactifs, produits cosmétiques ou encore entrer dans la composition d'emballage alimentaire [154]. Les cocktails sécrétés par les champignons filamenteux tels que *Trichoderma* et *Aspergillus*, qui contiennent des hémicellulases à des concentrations élevées, peuvent permettre de dégrader complètement le polysaccharide en ses monomères constitutifs [123].

En raison de leur plus grande complexité structurale et chimique, les hémicelluloses requièrent un plus grand nombre d'activités enzymatiques que la cellulose pour être hydrolysées efficacement. Toutefois, le nombre de liaisons différentes à cliver est relativement restreint (Figure 16).



**Figure 16** - Les motifs structuraux basiques retrouvés au sein des hémicelluloses et les enzymes responsables de leur hydrolyse. Adaptée d'après Shallom et Shoham (2003) [123].

Ce nombre réduit de motifs structuraux est toutefois suffisamment important pour justifier la grande diversité des hémicellulases, qui se traduit aussi bien par le nombre d'activités enzymatiques définies que par le nombre de familles GH et CE et le nombre d'enzymes recensées dans la base de données CAZy (Tableau 2) [121, 155].

**Tableau 2.** Répartition des hémicellulases dans les différentes familles de glycoside hydrolases (d'après la base de données CAZy [121]).

Activités enzymatiques	Organismes	Activités recensées	Familles
Endo- $\beta$ -(1,4)xylanase	Archées	1	GH 12
	Bactéries	378	GH 5 / 8 / 10 / 11 / 16 / 26 / 30 / 43 / 51 / 62 / 98
	Eucaryotes	236	GH 3 / 9 / 10 / 11 / 30
Exo- $\beta$ -(1,4)xylanase	Archées	2	GH 3 / 116
	Bactéries	95	GH 3 / 30 / 39 / 43 / 52 / 120
	Eucaryotes	47	GH 3 / 30 / 39 / 43 / 51 / 54
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	Archées	1	GH 3
	Bactéries	100	GH 2 / 3 / 10 / 43 / 51 / 62
	Eucaryotes	79	GH 3 / 43 / 51 / 54 / 62
Endo- $\alpha$ -(1,5)arabinanase	Bactéries	21	GH 43
	Eucaryotes	11	GH 43
$\alpha$ -glucuronidase	Bactéries	13	GH 4 / 67
	Eucaryotes	4	GH 67
Endo- $\beta$ -(1,4)mannanase	Bactéries	100	GH 5 / 9 / 26 / 44 / 134
	Eucaryotes	66	GH 5 / 26 / 134
Exo- $\beta$ -(1,4)mannosidase	Archées	3	GH 1
	Bactéries	13	GH 1 / 2 / 5
	Eucaryotes	15	GH 1 / 2
$\alpha$ -galactosidase	Archées	4	GH 36 / 57
	Bactéries	63	GH 4 / 27 / 31 / 36 / 97 / 110
	Eucaryotes	66	GH 27 / 36
$\beta$ -glucosidase	Archées	11	GH 1 / 3 / 116
	Bactéries	198	GH 1 / 2 / 3 / 9 / 116
	Eucaryotes	196	GH 1 / 3 / 5 / 30 / 39
Endo-galactanase	Bactéries	10	GH 53
	Eucaryotes	11	GH 53
Acétyl xylane estérase	Bactéries	35	CE 2 / 3 / 4 / 7 / 12 / 15
	Eucaryotes	26	CE 1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6
Acétyl mannane estérase	Bactéries	2	CE 1 / 4
	Eucaryotes	3	CE 3 / 16
Acides férulique et <i>p</i> -coumarique estérases	Bactéries	12	CE 1
	Eucaryotes	7	CE 1

Les activités hémicellulasiques recensées reflètent la distribution des hémicelluloses dans le règne végétal. Les enzymes les plus représentées, comme les endo- et

exo- $\beta$ -(1,4)xylanases et les  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases pour les GH et les acétyl xylane estérases pour les CE sont toutes impliquées dans l'hydrolyse des liaisons des xylandes [121]. Les xylandes, ou leurs formes substituées, représentent les hémicelluloses majoritaires des parois primaire et secondaire des mono- et dicotylédones [74]. Viennent ensuite les activités relatives à la dégradation des mannanes et glucomannanes (endo- $\beta$ -(1,4)mannanase et  $\beta$ -glucosidase par exemple) qui constituent les hémicelluloses majoritaires des parois des conifères et des algues vertes [74].

Comme dans le cas des cellulases, une certaine synergie existe entre les différentes catégories d'hémicellulases. L'homosynergie décrit la complémentarité d'action existante entre deux enzymes hydrolysant les chaînes principales des hémicelluloses, alors que l'hétérosynergie décrit une complémentarité entre une hydrolase des chaînes principales et une enzyme à activité débranchante [156]. Cette dernière synergie s'explique par le fait que les ramifications bloquent l'accès des enzymes à la chaîne principale. Les groupements acétyles, par exemple, peuvent créer un encombrement stérique empêchant l'action des enzymes, comme cela a été observé pour les endoxylanases [155]. Toutefois, l'hydrolyse des ramifications peut parfois être délétère pour certaines activités enzymatiques. Une xylanase produite par *Erwinia chrysanthemi* D1 nécessite ainsi la présence d'un acide 4-O-méthylglucuronique substitué pour pouvoir hydrolyser les liaisons xylosidiques [157]. Les activités débranchantes inhibent alors l'action des enzymes des chaînes principales dans une relation dénommée antisynergie [156].

L'hydrolyse des hémicelluloses permet d'améliorer l'accès des cellulases à la cellulose et donc de faciliter l'hydrolyse de ce polymère [76, 158]. La synergie entre cellulases et hémicellulases peut également être observée dans l'autre sens, puisque de nombreuses endoglucanases sont capables d'hydrolyser les xylandes avec une préférence pour les chaînes non ramifiées [159].

#### **4.4 Structure modulaire des glycoside hydrolases**

La nature même des substrats lignocellulosiques, qui sont des matériaux composites solides et insolubles, réduit la surface de contact avec les enzymes. Pour cette raison, la majorité des liaisons glycosidiques cibles des GH est souvent inaccessible [160]. Afin d'optimiser leur fixation sur la cellulose et les hémicelluloses et donc améliorer leur activité catalytique, de nombreuses glycoside hydrolases ont adopté une structure modulaire

comprenant un domaine catalytique, et un ou plusieurs domaines non-catalytiques de liaison aux polysaccharides (*Carbohydrate Binding Module*, CBM) [18, 126, 160].

L'existence des CBM a été décrite pour la première fois par Van Tilbeurgh *et al.* en 1986 qui proposait une organisation bifonctionnelle de la Cel7A de *T. reesei* comportant un site actif d'une part et un site de fixation à la cellulose insoluble d'autre part [161]. Ces sites de fixation furent tout d'abord dénommés CBD (pour *Cellulose Binding Domains*) car les premiers exemples décrits s'appliquaient tous à la fixation de la cellulose. L'appellation CBM a ensuite été adoptée pour mieux rendre compte de la diversité de ligands de ces modules protéiques [160].

La base de données CAZy dénombre actuellement 81 familles de CBM regroupant des modules dont la taille peut varier entre une quarantaine et environ 300 résidus d'acides aminés [121]. Environ 40% des cellulases et hémicellulases fongiques possèdent un CBM [126]. Dans le cas des cellulases, il s'agit la plupart du temps d'un CBM de la famille 1 dont la taille fait environ 40 acides aminés [121, 127].

La présence d'un CBM n'est pas indispensable à l'activité catalytique. Toutefois, cette dernière est généralement plus importante chez les enzymes possédant un module de fixation permettant d'augmenter la concentration effective d'enzymes à la surface des substrats [127, 162]. Les CBM de la famille 1 ont une affinité préférentielle pour la face hydrophobe de l'isomorphe I de la cellulose, ou cellulose cristalline, qui est considérée comme le site d'attaque des cellulases [163]. Chez les CBH, il a été montré que les CBM se fixaient sélectivement à la surface des fibrilles de cellulose au niveau des extrémités réductrices, ciblant ainsi la région au niveau de laquelle l'enzyme va agir [160]. De plus, certaines études tendent à montrer que les CBM pourraient, au-delà de leur rôle de fixation, avoir une activité de désorganisation de la cellulose responsable d'une amélioration de l'activité des cellulases [164, 165] et par conséquent être utilisés sous forme de modules recombinants pour améliorer l'efficacité de la saccharification [166]. Toutefois, cette capacité à désorganiser la cellulose n'est pas généralisable à tous les CBM fongiques [160].

#### **4.5 Les activités auxiliaires**

Les activités auxiliaires désignent des enzymes qui participent à la dégradation des polymères pariétaux, non pas par un mécanisme hydrolytique comme les GH et les CE, mais par des réactions d'oxydo-réduction. Ces activités se divisent en deux catégories en fonction

du substrat dégradé : les enzymes lignolytiques radicalaires qui catalysent la dégradation enzymatique de la lignine, et les *Lytic Polysaccharides Mono-Oxygenases* (LPMO) [121].

#### 4.5.1 Les enzymes lignolytiques radicalaires

Les enzymes lignolytiques radicalaires regroupent des enzymes qui dégradent la lignine au travers de processus oxydatifs non spécifiques [167-169]. Elles sont regroupées dans les familles AA1 à AA8 de la base de données CAZy. Ces familles regroupent majoritairement des laccases et des peroxydases [121].

Le mode d'action de ces enzymes a été décrit comme une « combustion enzymatique » au cours de laquelle le potentiel oxydant du peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène moléculaire est exploité par les peroxydases et les laccases respectivement pour oxyder les unités aromatiques de la lignine [167, 170]. Ces enzymes sont naturellement produites par certains organismes, tels que les champignons de la pourriture blanche ou de la pourriture brune [167].

Bien que ces enzymes soient étudiées depuis les années 1980 [170], très peu d'exemples fructueux de la valorisation enzymatique de la lignine ont été décrits [167]. Cela est principalement dû au fait que le taux de production de ces enzymes, notamment dans le cas des peroxydases, demeure relativement bas, y compris chez les organismes recombinants [168]. L'action de dégradation de ces enzymes est relativement lente, peu spécifique, et elles sont en plus capables de catalyser la repolymérisation des unités aromatiques. C'est pourquoi les traitements chimiques sont aujourd'hui privilégiés pour valoriser la lignine [169]. Il existe toutefois des enzymes lignolytiques non radicalaires qui clivent spécifiquement les liaisons entre les monolignols et qui offrent des perspectives prometteuses dans l'optique de valorisation de la lignine sous forme de composés à haute valeur ajoutée [169].

#### 4.5.2 Les *Lytic Polysaccharides Mono-Oxygenases* (LPMO)

La récente découverte des LPMO (également appelés PMO) a bouleversé le paradigme depuis longtemps accepté selon lequel la dégradation de la cellulose résultait uniquement de mécanismes hydrolytiques [171]. Pourtant, dès les premiers travaux sur les cellulases en 1950, Reese *et al.* avaient suggéré que l'hydrolyse efficace de la cellulose nécessitait probablement l'intervention d'une composante non hydrolytique [148].

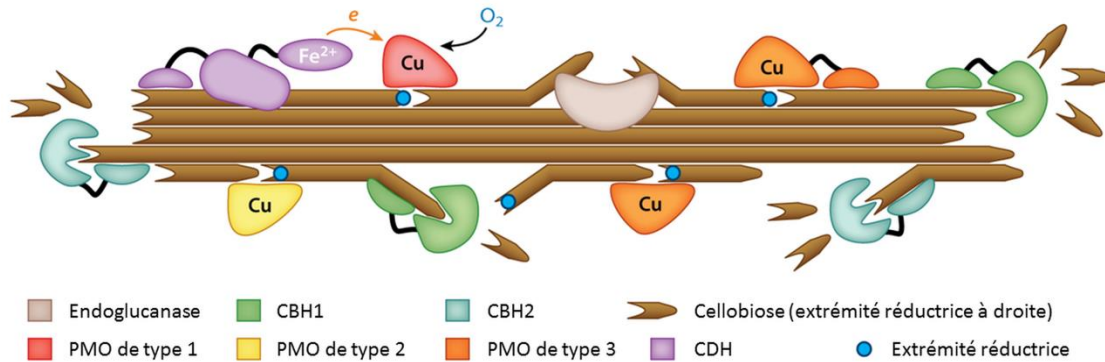
La première mention de ces activités date du début des années 1990 avec l'identification de la protéine fongique CEL1 présentant une architecture semblable aux cellulases fongiques,

bien que la séquence de son site actif présumé ne correspondait à aucune séquence connue [172]. Cette enzyme fut classée dans la famille GH61 de la base de données CAZy [171]. En 2005, des travaux montrèrent que la protéine bactérienne CBP21, identifiée alors comme un CBM de la famille 33, pouvait améliorer la dégradation enzymatique de la chitine, un analogue structurel de la cellulose cristalline [173], et ce n'est qu'en 2010 qu'il fut montré que cette protéine était en réalité une enzyme clivant les liaisons glycosidiques de la chitine en produisant des extrémités réductrices oxydées [174]. Le terme « *Lytic Polysaccharides MonoOxygenases* » fut proposé pour la première fois en 2012 pour nommer ces enzymes ainsi que les membres de la famille GH61 présentant de fortes homologues de structure avec les CBM33 [68]. Cette découverte a induit une modification de la classification CAZy et la création de la catégorie des activités auxiliaires, au sein desquelles les LPMO constituent les familles AA9-10-11 et 13 [121].

Les LPMO catalysent le clivage des liaisons osidiques de la cellulose via un mécanisme oxydatif impliquant une hydroxylation au niveau du carbone C1 ou du carbone C4, résultant en la formation d'une extrémité de chaîne oxydée [68, 171, 175]. L'apport d'électrons au niveau de la liaison osidique est assuré par un atome de cuivre situé au niveau du site actif de l'enzyme. Les électrons nécessaires à la réaction d'oxydation peuvent provenir directement de molécules présentes dans la paroi, comme les sous-unités aromatiques de la lignine, ou être fournis par des enzymes telles que la cellobiose deshydrogénase (CDH) synthétisée par le microorganisme cellulolytique et qui sert alors de partenaire redox aux LPMO [171].

Contrairement aux structures en tunnel ou en crevasse observées chez les GH, le site de fixation au substrat des LPMO est plat et donc mieux adapté pour se fixer à la surface de la cellulose cristalline [68, 171, 174, 175]. Cette structure permet ainsi de s'affranchir de la contrainte inhérente aux GH, qui ne peuvent accueillir dans leur site actif que des chaînes de cellulose isolées, et de cliver directement les liaisons osidiques au sein des régions cristallines [171, 174]. Les LPMO agissent donc en synergie avec les GH en créant plus efficacement des extrémités accessibles pour les CBH (Figure 17). Cette synergie est principalement décrite pour la dégradation de la cellulose, mais il a été montré que les LPMO pouvaient également agir sur certaines hémicelluloses et notamment sur les xyloglucanes, en dépit des substitutions présentes le long de la chaîne principale constituée de la répétition d'unités de glucose [176].





**Figure 17** - Action synergique des LPMO et des GH pour l'hydrolyse de la cellulose. Adaptée d'après Beeson *et al.* (2015) [171].

Les LPMO pourraient être aussi communes et importantes que les GH et participer de manière équivalente à la dégradation efficace de la cellulose. Les champignons cellulolytiques sont les seuls organismes à produire les 3 familles de LPMO connues, ce qui souligne l'importance de ces enzymes dans la déconstruction efficace des parois végétales [175]. Les préparations commerciales d'enzymes lignocellulolytiques fongiques tel que le cocktail Cellic® CTec2 contiennent ainsi des activités LPMO [177].

#### 4.6 Les protéines accessoires

Certaines protéines non enzymatiques, ne pouvant donc pas dégrader les polymères pariétaux, sont également sécrétées par certains organismes dans le but de favoriser l'action des enzymes lignocellulolytiques.

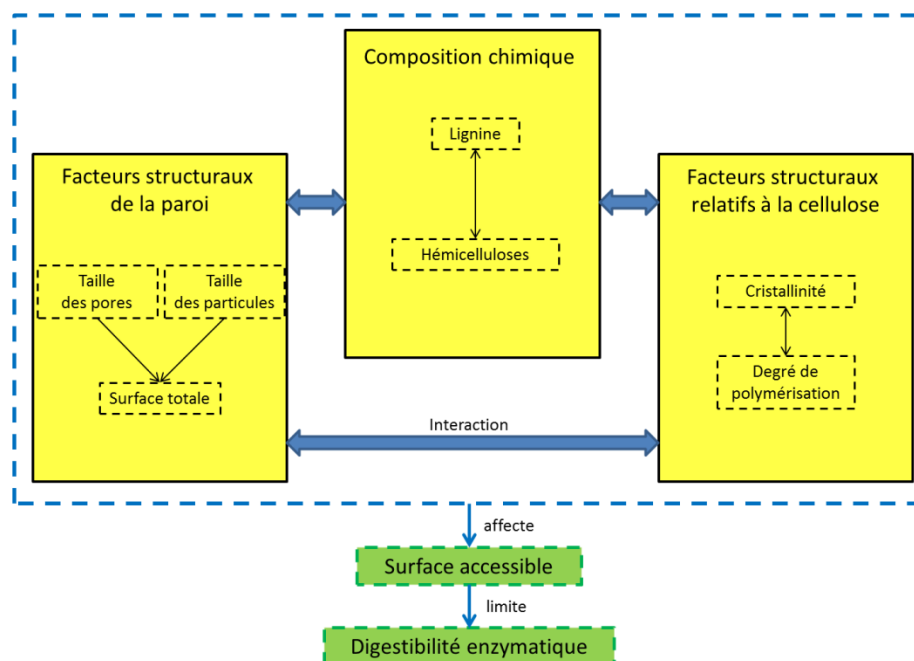
Les expansines sont des protéines capables de désorganiser le réseau de liaisons hydrogène de la cellulose, facilitant ainsi la fixation des cellulases sur les microfibrilles de cellulose [178]. Les expansines microbiennes ont reçu une attention particulière en raison de leurs similitudes avec les expansines végétales, intervenant dans les mécanismes d'élongation de la paroi primaire [102]. Les expansines microbiennes sont exprimées en grande quantité par les systèmes recombinants, au contraire des expansines végétales. Les protéines microbiennes et végétales possèdent une structure analogue constituée de deux domaines, dont le domaine D1 ressemble aux GH45. Chez les deux familles d'expansines, ce domaine est caractérisé par l'absence du même résidu catalytique, ce qui suggère une origine commune de ces expansines [179].

Des protéines ressemblant aux expansines sont retrouvées parmi les cocktails produits par les champignons lignocellulolytiques, comme les cerato-platanines et les loosenines [179].

Les swollenines sécrétées notamment par *T. reesei*, possèdent une séquence protéique similaire à celles des expansines et reliée à un CBM de la famille 1 [179]. Une amélioration de l'efficacité des cellulases en présence de ces protéines a été observée sur la cellulose cristalline [180].

## 5 La récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique

En dépit de l'arsenal enzymatique déployé par les organismes lignocellulolytiques pour dégrader les différentes fractions pariétales, l'hydrolyse enzymatique de la biomasse demeure l'étape empêchant le développement à l'échelle industrielle des bioraffineries de deuxième génération. Les plantes ont en effet évolué pour que leur paroi, structure essentielle à leur développement, soit résistante aux dégradations chimiques et enzymatiques [64, 66, 69]. La récalcitrance à l'hydrolyse, d'un point de vue industriel, peut être définie comme l'ensemble des facteurs qui augmentent les besoins en énergie, le coût et la complexité des opérations de bioraffinage [181]. La récalcitrance peut être observée à plusieurs échelles. Certains tissus comme l'épiderme, le sclérenchyme ou les faisceaux vasculaires, assurant des rôles de protection ou de transport au sein de la plante, sont ainsi reconnus comme plus difficiles à dégrader [182]. Au niveau de la paroi, la récalcitrance résulte aussi bien de la composition chimique que de facteurs structuraux (Figure 18).



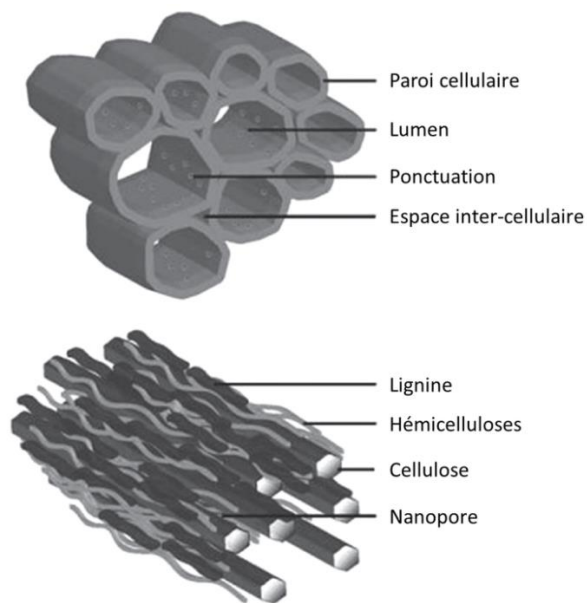
**Figure 18** - Facteurs influençant la digestibilité enzymatique de la biomasse.  
Adaptée d'après Zhao *et al.* (2012) [69].

## 5.1 Les facteurs structuraux

Le prérequis à la dégradation enzymatique des composés pariétaux est l'adsorption des enzymes à la surface de leur substrat. La surface accessible est donc le facteur critique qui limite la digestibilité des parois [183]. Cette surface accessible regroupe aussi bien la surface externe des parois que leur surface interne [69, 184].

La surface externe dépend de la taille des particules soumises à l'hydrolyse. La réduction de la taille des particules par une étape de broyage préalable à l'hydrolyse permet d'augmenter leur surface et donc d'accroître la digestibilité de la cellulose pure [185] ou de la biomasse dans son ensemble [186, 187].

La surface interne désigne la surface induite par la porosité des parois. Elle est beaucoup plus importante que la surface externe des particules, et contribue à 90% aux interactions entre les enzymes et leur substrat, et donc à l'efficacité de la digestibilité enzymatique [188]. Différentes échelles de porosité existent au sein des tissus végétaux (Figure 19).



**Figure 19** - Représentation des différentes échelles de porosité des tissus végétaux.  
Adaptée d'après Viamajala *et al.* (2010) [189].

Le lumen des cellules, dont la taille s'exprime à l'échelle du micron représente l'espace laissé par les cellules végétales après leur mort et délimité par les parois. Ces parois comportent également des ponctuations permettant la communication entre les lumens de deux cellules adjacentes, dont la taille se situe entre 20 et 100 nm [184]. Ces deux types de porosité semblent suffisants pour permettre une diffusion efficace des enzymes. À l'inverse,

les nanopores existant entre les polymères pariétaux, et dont le diamètre est estimé à 5-10 nm, sont trop petits pour permettre une diffusion efficace des enzymes.

Un diamètre moyen de 5,1 nm est souvent avancé pour caractériser les cellulases [184, 190, 191]. Des mesures effectuées par diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) ont permis de déterminer des rayons hydrodynamiques ( $R_H$ ) de plusieurs enzymes lignocellulolytiques. Chez *T. reesei*, un  $R_H$  de 3,5 nm a été mesuré pour l'endo- $\beta$ -(1,4)xylanase II [192], et une valeur de  $4,2 \pm 0,5$  nm a été obtenue pour l'enzyme Cel7A [193].

La nanoporosité des parois résulte de la proportion des différents composés pariétaux ainsi que de leur organisation structurale. L'incorporation des fibrilles de cellulose au sein d'une matrice amorphe évoque la structure du béton armé, où la cellulose assure un rôle important dans l'organisation et la résistance du matériau [194]. Les hémicelluloses et la lignine remplissent l'espace entre les fibrilles afin de consolider la structure, mais aussi prévenir la dégradation de la cellulose.

## **5.2 Facteurs relatifs à la lignine**

La lignine et les LCC de manière générale sont considérés comme le principal facteur responsable de la faible digestibilité naturelle des parois végétales [69, 136, 195, 196]. Il a été observé pour plusieurs biomasses que les parois deviennent de plus en plus récalcitrantes à l'hydrolyse à mesure que la plante se développe et que ses tissus se lignifient [197-199]. La lignine limite la dégradation enzymatique au travers de deux mécanismes primaires : en formant une barrière physique qui restreint l'accessibilité aux polysaccharides, et en interagissant de manière non spécifique avec les enzymes [69, 195].

La structure de la lignine, qui dépend de sa composition, influe sur le recouvrement des fibrilles de cellulose, puisque des molécules linéaires composées d'unités reliées par des liaisons  $\beta$ -O-4' couvriraient une plus large surface [200]. Des lignines condensées seraient ainsi plus favorables pour la dégradation enzymatique [201]. Toutefois, l'impact de la composition de la lignine, qui influe directement sur l'établissement des liaisons, demeure contrasté. Les unités S sont plus susceptibles de former des liaisons  $\beta$ -O-4' en raison de l'encombrement stérique des groupements méthoxy sur leur cycle aromatique [202], et donc de former des molécules linéaires qui réduiraient l'accès des cellulases aux microfibrilles. Pourtant, il a été suggéré que la lignine des herbacées impactait moins l'hydrolyse enzymatique en raison de sa plus forte teneur en unités S qu'en unités G, qui favorisent la

formation de lignine branchée [195]. De plus, le ratio S/G, souvent utilisé comme un indicateur de la teneur des principales unités constitutives de la lignine, semble ne pas avoir d'influence sur le rendement de saccharification de différents hybrides de peuplier [203, 204], ou de luzerne [205] non prétraités. En raison de leur faible proportion, l'impact des unités H sur la saccharification a été moins étudié. Certaines études montrent toutefois qu'un enrichissement en sous-unités H, naturel ou induit génétiquement, réduit la récalcitrance de la biomasse [206, 207], en raison, notamment, d'une baisse du poids moléculaire des lignines [195]. La présence et la proportion d'acides hydroxycinnamiques influencent également la récalcitrance à l'hydrolyse des parois, notamment dans le cas des acides férulique et *p*-coumarique qui sont les plus importants chez les graminées [195]. Ces acides sont en effet impliqués dans l'établissement de la proximité spatiale des différents polymères pariétaux puisqu'ils permettent l'établissement de liaisons covalentes entre les hémicelluloses seules ou la formation de LCC, notamment au niveau des ponts diféruliques [18, 79]. Ainsi, il a été observé qu'une proportion moindre en acide férulique ou en acide *p*-coumarilique améliorerait la digestibilité des parois de maïs [208] et de graminées prétraitées au peroxyde d'hydrogène respectivement [209]. Toutefois, une forte teneur en acides hydroxycinnamiques peut diminuer la récalcitrance des parois en raison de la plus grande facilité à rompre les liaisons ester que ces molécules établissent entre elles, comme cela a été montré par l'étude de lignées de maïs génétiquement modifiées [201].

La fixation non-covalente des enzymes sur la lignine se fait par la mise en place simultanée d'interactions hydrophobes, électrostatiques et par l'établissement de liaisons hydrogène. L'affinité des enzymes pour la lignine semble différer en fonction de la catégorie d'enzymes considérée, et l'action des enzymes serait donc gênée par une perturbation de leur action synergique [136]. Les CBM retrouvés notamment chez les CBH et qui permettent une meilleure fixation des enzymes à la surface des polysaccharides, jouent un rôle important dans la liaison non-productive des enzymes [126]. Il a été montré que les interactions avec la lignine de CBH de *T. reesei* dépourvues de CBM étaient beaucoup moins importantes que celles des enzymes natives [210], et que les résidus aromatiques responsables de l'affinité des CBM avec la cellulose contribuaient également à l'affinité des CBM pour la lignine [211]. Les enzymes piégées à la surface de la lignine seraient également plus susceptibles à la dégradation thermique que les enzymes libres. Une étude menée sur les cellulases de *T. reesei* mises en contact avec des résidus lignifiés a montré que l'adsorption des enzymes est dépendante de la température. Ces enzymes se décrochaient moins facilement, et montraient

par la suite une activité plus faible lorsque l'incubation avec les résidus se déroulait à 45°C par rapport à une incubation à 4°C, laissant suggérer une dénaturation des enzymes lors de l'adsorption [212].

### **5.3 Facteurs relatifs aux polysaccharides**

La faible proportion d'organismes lignocellulolytiques capables de dégrader la lignine montre que cette dernière est beaucoup moins réactive que les polysaccharides pariétaux [119]. Toutefois, la structure de ces polymères présente également certaines caractéristiques qui diminuent l'action catalytique des enzymes.

Les hémicelluloses présentent une diversité de constituants et de motifs structuraux qui compliquent sa dégradation et sa valorisation et qui nécessitent l'intervention simultanée de nombreuses enzymes (Figure 16). Au niveau de l'organisation de la paroi, les hémicelluloses interagissent étroitement avec les fibrilles de cellulose via l'établissement de liaisons hydrogène, mais aussi avec les lignines par l'établissement de liaisons covalentes au niveau des résidus d'acide férulique [74]. Elles maintiennent donc la lignine au contact de la cellulose dont elles réduisent la surface accessible en formant une barrière physique autour des microfibrilles [69, 124, 155].

Le rôle des hémicelluloses dans le phénomène de récalcitrance a été démontré par le fait que l'hydrolyse de la cellulose pouvait être améliorée par l'ajout d'hémicellulases au cours de la réaction enzymatique [76, 158, 213, 214]. Toutefois, l'impact de cette fraction pariétale sur l'hydrolyse de la cellulose est mineur par rapport à celui de la lignine, puisque les hémicelluloses peuvent être facilement dégradées par des traitements enzymatiques ou chimiques dans des conditions douces [69, 155].

La cellulose elle-même participe au phénomène de récalcitrance de la biomasse par l'arrangement de ces microfibrilles, en particulier au niveau des régions cristallines [69]. De nombreuses études ont montré une corrélation négative entre l'indice de cristallinité de la cellulose et le rendement d'hydrolyse [215-217]. Il est généralement admis que les régions amorphes moins bien structurées se dégradent beaucoup plus rapidement que les régions cristallines [218]. Toutefois, l'importance des régions cristallines est contestée, puisqu'il a été montré que la cristallinité de la cellulose n'évoluait pas au cours de la saccharification [219-222], alors qu'elle devrait augmenter si les régions amorphes étaient plus rapidement hydrolysées [218]. Cette stabilité contre-intuitive pourrait être expliquée, tout au moins en partie, par l'action des LPMO, qui en clivant les liaisons osidiques directement au niveau des

régions cristallines, pourrait perturber le réseau de liaisons hydrogène et ainsi participer à la création de nouvelles régions amorphes.

## **6 Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique**

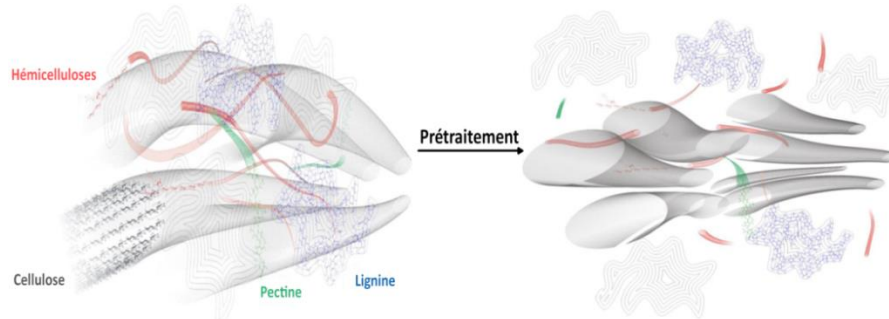
Des solutions plus ou moins sophistiquées ont été mises au point pour outrepasser la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique et améliorer la digestibilité des biomasses.

Les progrès effectués depuis quelques années dans le séquençage des génomes et dans le développement des outils de génie génétique sont ainsi mis à profit pour essayer de modifier à la fois l'expression des enzymes et la croissances des plantes [125]. Les expériences d'ingénierie de la paroi se sont principalement concentrées sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, mais aussi sur certaines cultures dédiées au génome séquencé parmi lesquelles figurent le panic érigé (*switchgrass*), ou le peuplier [36, 108, 223]. Ces recherches visent principalement à réduire la récalcitrance des parois en altérant la voie de biosynthèse de la lignine [108, 223]. Les expériences d'ingénierie génétique des enzymes visent à faire exprimer les enzymes lignocellulolytiques par des bactéries recombinantes, ou à accroître leur production chez les organismes qui les sécrètent naturellement [224]. Des enzymes aux propriétés modifiées, pouvant travailler à un pH plus alcalin [225], à une température plus élevée [226], ou montrant une moins forte inhibition par le glucose [227], ont également été développées pour s'adapter aux conditions des processus industriels. La diminution des interactions non-spécifiques par la modification de l'affinité des CBM avec la lignine est également étudiée [228, 229].

Cette affinité peut être partiellement estompée par l'ajout de surfactants polymériques comme le Tween ou le polyéthylène glycol qui en interagissant avec la lignine, préviennent la fixation non-productive des enzymes [230, 231]. D'autres agents bloquants peuvent être utilisés, tels que des protéines ou des peptides [232], ou des ions métalliques divalents [233]. Cette méthode, bien que relativement simple à mettre en œuvre, ne permet cependant pas d'outrepasser la récalcitrance résultant de l'organisation structurale des biopolymères.

Le prétraitement de la biomasse permet de réduire cette récalcitrance en modifiant la structure et/ou la composition chimique de la paroi végétale. Il s'agit d'une étape cruciale dans le processus de valorisation de la biomasse, permettant d'améliorer la transformation subséquente des composés pariétaux [75, 234]. Pour ce faire, les prétraitements doivent permettre d'accroître la surface des substrats accessible et réactive aux enzymes, et donc induire une augmentation de la porosité des parois, une désorganisation ou l'élimination de la

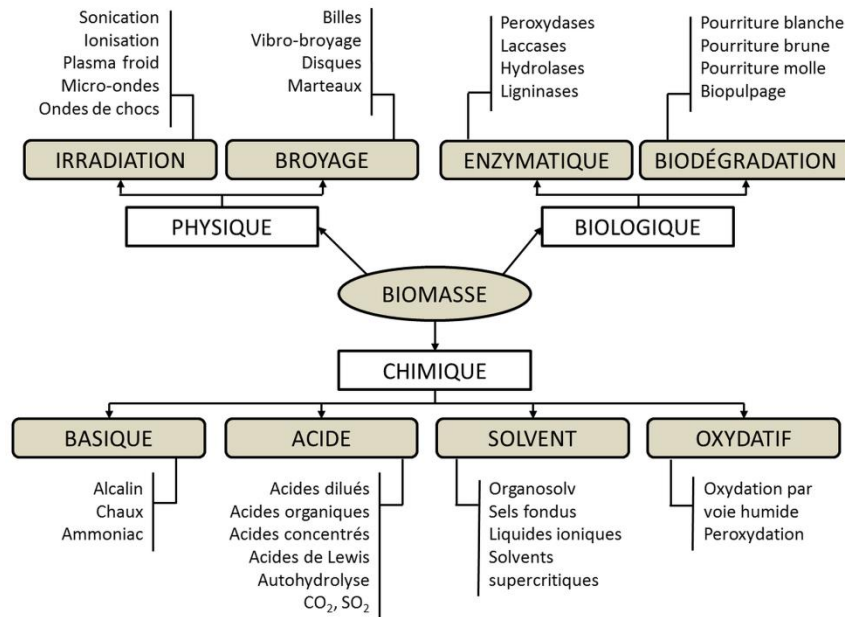
lignine entourant les fibrilles de cellulose, une séparation des hémicelluloses et de la cellulose et une diminution de la cristallinité de la cellulose [235]. La Figure 20 schématise l'impact des prétraitements au niveau pariétal.



**Figure 20** - Représentation schématique de l'impact des prétraitements.  
Adaptée d'après Silveira *et al.* (2015) [236].

Afin d'être rentable d'un point de vue industriel, un prétraitement doit permettre de réduire les coûts de l'ensemble de la chaîne de valorisation, et en améliorer les profits. Le prétraitement idéal doit donc nécessiter un apport en énergie aussi faible que possible, minimiser les pertes en composés pariétaux afin d'assurer leur valorisation optimale, permettre une diminution du chargement en enzymes nécessaires pour assurer une hydrolyse efficace et ne pas former de produits de dégradation inhibiteurs des enzymes hydrolytiques ou des organismes fermentaires intervenant dans les étapes subséquentes [75, 236, 237]. Aucun prétraitement répondant à tous les critères mentionnés jusqu'à présent n'a encore été mis au point. Toutefois, de nombreux procédés ont été développés, pouvant être regroupés en 4 catégories : les prétraitements biologiques, physiques, chimiques et physico-chimiques (Figure 21). En raison des effets conjugués de différents paramètres, la plupart des prétraitements peuvent être classés dans plusieurs catégories [234].





**Figure 21** - Méthodes de prétraitements utilisées pour la déconstruction de la biomasse. Adaptée d'après Silveira *et al.* (2015) [236].

### 6.1 Prétraitements biologiques

Les prétraitements biologiques font référence aux processus de dégradation de certains des composants de la paroi par des microorganismes préalablement à l'étape d'hydrolyse enzymatique [235, 236]. Ces prétraitements sont principalement réalisés par des basidiomycètes saprophytes divisés en deux catégories : les champignons de la pourriture blanche, et ceux de la pourriture brune. Les champignons de la pourriture blanche sont les plus étudiés car ils sont les seuls à pouvoir dégrader la lignine de manière efficace via l'action de peroxydases et de laccases, alors que les champignons de la pourriture brune modifient simplement la structure de la lignine sans la dégrader afin de pouvoir métaboliser les polysaccharides [238, 239].

La faible température de développement des microorganismes lignocellulolytiques, généralement comprise entre 15 et 40°C, est un avantage sur le plan environnemental car les prétraitements biologiques consomment peu d'énergie [236, 239]. Il est toutefois nécessaire de nettoyer les résidus prétraités dans des conditions de température plus drastiques que celles du prétraitement afin d'éliminer les résidus de lignine, mais surtout d'inactiver les champignons pour la saccharification [240, 241].

Ces prétraitements ne sont pour le moment pas applicables à l'échelle industrielle, en raison du temps relativement long nécessaire pour assurer une délignification efficace de la biomasse, qui peut durer des semaines, voire des mois [236, 239].

## **6.2 Prétraitements physiques**

Les prétraitements physiques font référence aux processus mécaniques ou radiatifs permettant de désorganiser la structure de la paroi végétale [235, 236].

Les prétraitements mécaniques les plus communs consistent à diminuer la taille du matériel végétal par un ensemble de techniques de déchiquetage, broyage et fraisage afin d'atteindre des tailles de particules variant généralement entre 0,2 et 30 mm [235, 236]. Cette réduction permet d'augmenter la surface accessible des polymères pariétaux, mais aussi de diminuer le degré de polymérisation et la cristallinité de la cellulose [235, 242]. De nombreux prétraitements chimiques et biologiques nécessitent une étape préalable de broyage pour atteindre une efficacité optimale [236]. Aucun processus basé uniquement sur le broyage de la biomasse n'est pour le moment applicable à l'échelle industrielle, en raison du coût énergétique de la diminution mécanique de la taille du matériel végétal [75, 243].

Un autre type de prétraitement physique repose sur la désorganisation des parois soumises à des rayonnements gammas, plasmas, ionisants, microondes ou encore ultrasons [236]. Les rayonnements ultrasons agissent par exemple en modifiant la structure de la biomasse par des phénomènes de différence de pression localisés au niveau de bulles de cavitation formées par évaporation de l'eau contenue dans les parois [244]. L'échauffement et le cisaillement au niveau de ces bulles provoquent également des modifications chimiques des polymères pariétaux [245]. Ce type de prétraitements s'effectue généralement sur des temps courts et à des températures faibles [236]. L'utilisation combinée de rayonnements et de catalyseurs chimiques, ou encore de liquides ioniques, permet d'améliorer davantage l'efficacité de ces prétraitements [246].

## **6.3 Prétraitements chimiques**

Les prétraitements chimiques regroupent les processus utilisant des réactifs chimiques ou des solvants pour diminuer la récalcitrance des parois. Les conditions de prétraitements et leurs mécanismes d'action dépendent des réactifs utilisés [235].

### **6.3.1 Prétraitement à l'acide dilué**

L'utilisation d'acide dilué figure parmi les prétraitements principaux et les plus prometteurs, et elle est la méthode la plus employée à l'échelle industrielle [235, 247-249]. L'acide dilué peut être mélangé à la biomasse sous forme liquide ou pulvérisé à la surface des

résidus, et le prétraitement peut se dérouler ou non sous agitation [237]. Il permet une hydrolyse acide des liaisons osidiques accessibles, entraînant principalement une dégradation des hémicelluloses, et particulièrement des xylanes, en monomères. Le xylose peut ensuite être transformé en furfural qui peut être extrait et valorisé [235, 237, 247, 248]. La cellulose amorphe est également sensible à l'action de l'acide dilué, ce qui entraîne une diminution du degré de polymérisation de la cellulose favorable à l'action des enzymes, surtout quand les conditions sont drastiques, mais également une augmentation de la cristallinité du polymère [247, 248]. Une délignification partielle est également induite et la lignine résiduelle est redistribuée au sein de la paroi sous une forme plus condensée [235, 247]. Cette élimination ciblée de fractions pariétales permet d'améliorer l'accessibilité des enzymes à la cellulose [235]. Elle s'accompagne d'une augmentation de la porosité. Des mesures du temps de relaxation de l'eau dans des échantillons de peuplier prétraité montre que cette augmentation est probablement causée par l'élargissement de pores existants plutôt que par la création de nouveaux pores [250]. L'élimination des hémicelluloses favorise également l'action des enzymes car la présence de xylo-oligomères, produits à partir des xylanes au cours de la saccharification, inhibe fortement l'activité des cellulases [251].

L'efficacité du prétraitement à l'acide dilué dépend de plusieurs paramètres, tels que la taille des particules initiales, la température et la durée de prétraitement, la concentration en acide, mais aussi de la structure du réacteur [236]. Ces prétraitements sont généralement réalisés à des températures comprises entre 120 et 220°C, pendant des durées allant de quelques secondes à une heure. Les concentrations en acide sont généralement comprises entre 0,2 et 4% (m/v) [237, 247, 248]. Une concentration en acide sulfurique de 2% a ainsi été établie comme optimale pour le prétraitement de la paille de blé [252].

Le choix des conditions de prétraitement est extrêmement important car elles vont en déterminer l'efficacité. Ainsi, une température de prétraitement inférieure à 120°C ne permet pas une augmentation importante du rendement d'hydrolyse [253, 254]. À l'inverse, des conditions de prétraitement trop drastiques peuvent entraîner des effets non désirés, tels que la formation d'inhibiteur de la saccharification comme le furfural dérivé du xylose, le 5-hydroxyméthylfurfural dérivé du glucose ou encore des acides phénoliques [249]. De plus, les polysaccharides peuvent subir des réactions de déshydratation et/ou de réassemblage avec la lignine pour créer une pseudo-lignine qui inhibe encore plus l'action des cellulases que la lignine seule [247]. L'effet de la température et de la durée de prétraitement sur la formation de cette pseudo-lignine a ainsi été mis en évidence chez le peuplier [255].

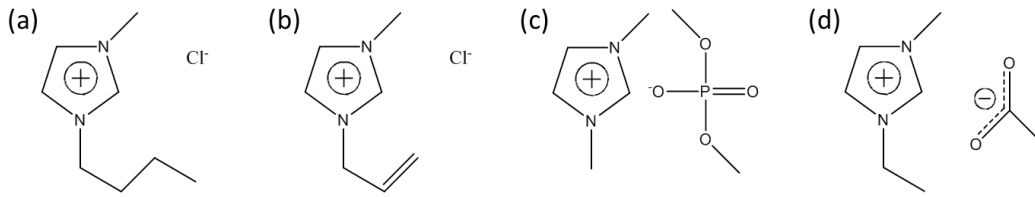
Différents acides minéraux peuvent être utilisés pour prétraiter la biomasse. Le plus courant est l'acide sulfurique en raison de son coût relativement faible, mais les acides nitrique, chlorhydrique et phosphorique peuvent également être employés [237, 248]. Des acides organiques comme l'acide maléique ou l'acide oxalique sont également utilisés et permettent une formation moins importante d'inhibiteur [236, 249].

Bien qu'il soit considéré comme un des prétraitements les plus prometteurs, le prétraitement à l'acide dilué présente certains désavantages. Les matériaux utilisés pour la conception des réacteurs doivent résister à la corrosion provoquée par l'acide et sont donc plus onéreux que ceux des réacteurs classiques. De plus, il est nécessaire de laver les résidus prétraités pour retirer les inhibiteurs, mais aussi l'acide qui doit par la suite être neutralisé ou recyclé, ce qui augmente le coût du processus [237, 248, 249].

### 6.3.2 Prétraitement au liquide ionique

Les liquides ioniques sont des sels formés par l'association d'un cation et d'un anion et qui présentent la particularité d'être liquides à température ambiante, ou à une température proche. Ils connaissent un essor important depuis une quinzaine d'années, et sont appliqués dans des domaines variés comme la synthèse chimique, la catalyse et la biocatalyse, ou la conception de dispositifs électro-chimiques [19, 256]. Les liquides ioniques sont considérés comme l'un des solvants les plus prometteurs pour le développement de la chimie verte en raison de leur faible volatilité et de leur faible inflammabilité, ainsi que de leurs propriétés ajustables en fonction du choix du cation et de l'anion qui les constituent [256].

L'utilisation de liquides ioniques dans le cadre du prétraitement de la biomasse est relativement récente. Swatloski *et al.* ont été les premiers à montrer que la cellulose pouvait être solubilisée sans dérivatisation, puis régénérée, dans certains liquides ioniques dont le 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure [257]. Les premiers essais de dissolution partielle de résidus de bois datent de 2006 [258], et la première dissolution complète de chêne et de pin broyés, dans le liquide ionique 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate a été rapportée en 2009 [259]. De nombreux liquides ioniques sont aujourd'hui utilisés comme solvant pour prétraiter la biomasse. Les principaux liquides ioniques étudiés dans ce but sont des sels d'imidazolium, contenant des cations de type 1,3 dialkylimidazolium (Figure 22) [19, 249].



**Figure 22** - Principaux liquides ioniques utilisés pour le prétraitement de la biomasse. 1-butyl-3-méthylimidazolium chlorure (b) 1-allyl-3-méthylimidazolium chlorure (c) 1,3-diméthylimidazolium diméthyl phosphate (d) 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate. Adaptée d'après Elgharbawy *et al.* (2016) [260].

L'utilisation de liquides ioniques représente une alternative intéressante car les modifications qu'ils apportent aux polymères pariétaux ne sont pas observées avec les autres prétraitements [236]. La cellulose régénérée après prétraitement présente ainsi une structure beaucoup plus poreuse et amorphe correspondant à l'isomorphe II [19, 256]. Cette baisse de la cristallinité de la cellulose est causée par la rupture des liaisons hydrogène du polymère [261, 262]. Il est généralement considéré que l'anion joue un rôle important dans cette déstructuration, notamment les anions basiques qui ont une meilleure capacité à établir des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyle de la cellulose. De longues chaînes alkyles sur le cation réduisent la solubilité de la cellulose [19, 257]. De nombreux liquides ioniques possèdent également la capacité de solubiliser la lignine [256]. Cette dernière est extraite de la biomasse, le plus souvent suite à la mise en place d'interactions  $\pi$ - $\pi$  ou  $n$ - $\pi$  entre les cycles aromatiques et le cation [263, 264]. La lignine solubilisée subit également une défragmentation qui semble dépendre majoritairement du groupe fonctionnel de l'anion [265]. Après précipitation, cette lignine présente une masse molaire plus faible, mais surtout une polydispersité moindre que des lignines obtenues par d'autres méthodes d'extraction [266]. L'élimination partielle de la lignine augmente la surface accessible des polysaccharides aux enzymes [19].

Le fractionnement de la biomasse peut être réalisé de deux manières en fonction du choix du liquide ionique. Certains liquides ioniques permettent de dégrader partiellement la lignine et les hémicelluloses, résultant en la formation d'un résidu solide enrichie en cellulose qui n'est que très peu modifiée [19]. Toutefois, la dissolution complète de la biomasse est la méthode privilégiée. Elle permet ensuite, par des étapes de précipitation successives à l'aide d'anti-solvants, de régénérer les différentes fractions pariétales [236]. Les anti-solvants les plus communs pour régénérer la cellulose sont l'eau, le méthanol ou l'éthanol [256]. Dans le cas d'une dissolution complète, l'utilisation de liquides ioniques comportant des propriétés d'acidité de Brønsted, peuvent être utilisés pour dégrader directement les polysaccharides [19,

236]. Ainsi, un rendement de 17% a été obtenu pour la production de xylose lors du prétraitement de la paille de blé par un liquide ionique contenant un anion hydrogènesulfate ( $\text{HSO}_4^-$ ) [267].

Les conditions de prétraitement dépendent à la fois de la biomasse et du liquide ionique utilisé. Il est généralement reconnu qu'une température élevée et un temps de prétraitement long favorisent une meilleure diffusion du liquide ionique [19]. Toutefois, une température trop élevée peut entraîner une dégradation importante de la biomasse, et donc une diminution du rendement de régénération des différentes fractions [268]. La taille des résidus végétaux est également un paramètre critique du prétraitement, qui est plus efficace dans le cas de petites particules car les contacts avec les ions sont favorisés [236]. Le liquide ionique 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate a toutefois montré de bonnes capacités pour solubiliser des particules relativement larges (jusque 2 mm) grâce à un gonflement rapide des structures pariétales favorisant leur déstructuration [269, 270]. L'humidité de la biomasse est également à prendre en compte puisqu'elle peut induire une diminution de la solubilisation des fractions pariétales en raison de la compétition des molécules d'eau pour l'établissement des liaisons hydrogène [19, 236].

Un choix adéquat du liquide ionique et de l'anti-solvant peut permettre de valoriser l'ensemble des composés de la biomasse [236]. Toutefois, la présence de liquide ionique induit une diminution de l'activité des enzymes lors de la saccharification, qui résulterait plus d'une inhibition et d'une baisse de leur diffusion à cause d'une augmentation de la viscosité du milieu que d'une dénaturation [271]. Des étapes de rinçage des résidus sont donc nécessaires, ce qui augmente le coût du prétraitement [256]. De plus, les liquides ioniques sont pour le moment relativement onéreux par rapport à d'autres solvants classiques. Il est donc indispensable de les recycler à la fin du prétraitement [19, 236, 249]. Des études ont montré qu'il était possible de réutiliser les liquides ioniques plusieurs fois, sans perte de leur efficacité à prétraiter la biomasse malgré l'accumulation de composés pariétaux, et notamment de lignine soluble, au fur et à mesure des recyclages [272-274].

### 6.3.3 Prétraitement au chlorite de sodium

En 1921, le chimiste allemand chimiste allemand Erick Schmidt a découvert qu'il était possible de purifier des fibrilles de cellulose par action du dioxyde de chlore  $\text{ClO}_2$ , un produit volatile coûteux et explosif. Le dioxyde de chlore est aujourd'hui délivré sous forme de chlorite de sodium  $\text{NaClO}_2$  plus stable [275]. De nos jours, le chlorite de sodium intervient

dans la composition de gels thérapeutiques et est utilisé comme désinfectant des eaux, ou comme agent blanchissant dans les industries papetière et textile [276].

Cette action blanchissante du chlorite de sodium est causée par sa capacité à délignifier le matériel végétal [277-279]. Le traitement au chlorite de sodium est devenu une procédure standard de délignification d'échantillons de biomasse [277], et la méthode conventionnelle pour isoler l'holocellulose, qui constitue la fraction polysaccharidique totale des parois [278, 280]. La délignification au chlorite n'est toutefois pas appliquée à l'échelle industrielle pour le prétraitement de la biomasse.

Le chlorite de sodium dégrade la lignine par un mécanisme oxydatif [281]. L'oxydation des liaisons osidiques peut également être responsable d'une dégradation des polysaccharides [282]. L'ajout d'acide acétique permet de limiter cette dégradation oxydative mais ces conditions de prétraitements peuvent favoriser une hydrolyse acide des liaisons osidiques, qui demeure toutefois limitée en présence de lignine [283].

Le prétraitement au chlorite de sodium est généralement réalisé entre 60°C et 70°C, pendant une durée variant entre 4 h et 8 h [277]. Ce traitement a été appliqué à divers substrats dans le but d'isoler la cellulose ou de faciliter sa dégradation enzymatique. Un taux de délignification de 96% a été obtenu sur des échantillons de peuplier avec une dégradation mineure des hémicelluloses [277]. Des rendements de saccharification de 90% et proches de 100% ont été obtenus après délignification de miscanthus [216] et de bagasse [284] respectivement. Agrawal *et al.* ont émis l'hypothèse que l'amélioration de la saccharification observée sur des échantillons de pin délignifiés était partiellement due à une augmentation de la porosité des parois [285]. Toutefois, une étude menée sur des échantillons de paille de blé explosés à la vapeur, puis délignifiés a montré une disparition de la porosité, expliquée par un gonflement et une recombinaison de la cellulose obstruant les pores [286].

#### 6.3.4 Autres prétraitements chimiques

De nombreux autres prétraitements chimiques ont été développés. Le Tableau 3 propose une liste non-exhaustive des principaux prétraitements chimiques.

Tableau 3. Liste des principaux prétraitements chimiques.

Prétraitement	Principe	Effet sur les parois	Caractéristiques	Références
Alcalin	Mise en contact de la biomasse avec des composés alcalins (CaO, NH <sub>3</sub> , NaOH, KOH...).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délignification par saponification.</li> <li>• Élimination des groupements acétyles et des acides uroniques.</li> <li>• Dépolymérisation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conditions moins drastiques que celles du prétraitement à l'acide dilué.</li> <li>• Temps de prétraitement long (heures, voire jours).</li> <li>• Lavages nécessaires pour éliminer les composés basiques.</li> <li>• Faible formation d'inhibiteurs.</li> </ul>	[235, 236, 287]
Oxydatif	Prétraitement de la biomasse par des agents oxydants (ozone, peroxyde d'hydrogène, oxygène ou acide peracétique).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délignification.</li> <li>• Dépolymérisation partielle des hémicelluloses.</li> <li>• Dépolymérisation et augmentation de la cristallinité de la cellulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible rendement.</li> <li>• Forte production d'inhibiteur de la saccharification et de la fermentation.</li> <li>• Hémicelluloses dégradées non valorisables.</li> </ul>	[235, 249]
Organosolv	Prétraitement dans un solvant organique (méthanol, éthanol, acétone...), avec ou sans ajout de catalyseur (acide ou base organique ou inorganique).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délignification sans modification de la structure du polymère.</li> <li>• Élimination des hémicelluloses.</li> <li>• Faible dépolymérisation et gonflement de la cellulose.</li> <li>• Augmentation de la taille des pores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meilleure possibilité de valorisation de la lignine.</li> <li>• Effet inhibiteur des solvants organiques.</li> <li>• Coût important du recyclage des solvants.</li> </ul>	[235, 236, 288]
Solvant eutectique profond	Fractionnement de la biomasse par solubilisation partielle dans un solvant eutectique profond (solvant ayant une température de fusion moindre que celle de ses constituants) de manière similaire au prétraitement au liquide ionique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilisation de la lignine.</li> <li>• Élimination des hémicelluloses.</li> <li>• Dépolymérisation partielle de la cellulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possibilité de synthétiser ses solvants avec des composés végétaux (chlorure de choline, fructose).</li> <li>• Possibilité de fonctionnalisation de la cellulose.</li> <li>• Haute viscosité de certains solvants eutectiques.</li> <li>• Possible dégradation des résidus des hémicelluloses et de la cellulose.</li> </ul>	[249, 289]



## 6.4 Prétraitements physico-chimiques

Les prétraitements physico-chimiques regroupent les prétraitements dont l'action repose sur une modification des polymères pariétaux amplifiée par l'effet induit par certains paramètres tels que la température ou la pression.

### 6.4.1 Prétraitement hydrothermique

Le prétraitement hydrothermique présente l'avantage majeur de déstructurer la biomasse sous l'action de l'eau, qui est un solvant peu onéreux et non polluant permettant de s'affranchir de nombreuses contraintes écologiques ou relatives à la sécurité des installations [235, 236, 290]. Ce prétraitement consiste à mettre la biomasse en contact avec de l'eau chauffée à haute température, généralement entre 150°C et 240°C, à une pression élevée pouvant monter jusqu'à 5 MPa afin de maintenir l'eau à l'état liquide. La durée du prétraitement varie de quelques minutes à plusieurs heures [235, 236, 249, 291].

Le prétraitement de la biomasse est réalisé sous l'effet de la dissociation de l'eau à température élevée qui entraîne une production d'ions hydronium  $H_3O^+$  responsables de la rupture de certaines liaisons osidiques et de la libération des acides organiques dérivés des groupements acétyles, et dans une moindre mesure des acides uroniques, présents dans les hémicelluloses [292]. Les ions hydronium libérés par ces acides amplifient le phénomène de dégradation des parois, et leur action est considérée comme plus importante que celle des ions provenant uniquement de l'eau [290, 293].

Le pH du milieu devient donc légèrement acide au cours du prétraitement, induisant des effets similaires à ceux décrits précédemment pour le prétraitement à l'acide dilué [293]. Ainsi, en fonction des conditions de prétraitement, les hémicelluloses peuvent être complètement dégradées [290]. Ces hémicelluloses sont éliminées sous forme d'oligosaccharides qui peuvent ensuite être convertis en sucres monomériques par hydrolyse acide par exemple, avec un rendement proche de 90% [237]. La production de sucres monomériques est minimisée par rapport au prétraitement à l'acide dilué car le pH est plus élevé, ce qui diminue également la formation de produits de dégradation inhibiteurs [236, 291]. La lignine est partiellement solubilisée pendant le prétraitement suite à la rupture des liaisons éthers provoquant la libération des monolignols liés par des liaisons  $\beta$ -O-4' et des groupements méthoxy situé sur les cycles aromatiques [235, 293]. Toutefois, l'eau ne pouvant solubiliser une quantité importante de lignine, celle-ci se recondense au cours du

prétraitement et se redépose alors à la surface de la biomasse, mais interagit moins fortement avec la cellulose résiduelle [235, 291]. Les effets du prétraitement sur la cellulose sont généralement limités, bien que cette dernière soit partiellement dégradée au niveau des régions amorphes [290].

Une proportion importante de la biomasse est éliminée au cours du prétraitement. Entre 40% et 60% du chargement initial sont récupérés sous forme de résidu solide, et la perte en cellulose peut s'élever entre 4% et 22% [237]. Ce résidu est beaucoup plus susceptible à l'hydrolyse enzymatique en raison de l'augmentation de la surface de la cellulose suite à l'élimination des hémicelluloses et la réorganisation de la lignine [236, 249]. Toutefois, la lignine recondensée peut avoir un impact négatif sur la saccharification. Il a notamment été montré que l'ajout de lignine extraite de résidus de bois prétraités entraînait une diminution du rendement d'hydrolyse de la cellulose pure en raison d'une plus grande adsorption des enzymes sur la lignine condensée [294-296].

L'utilisation de l'eau comme solvant de prétraitement est intéressante d'un point de vue économique car elle permet la conception de réacteur beaucoup moins onéreux que ceux dédiés au prétraitement à l'acide dilué, puisque le milieu est moins corrosif [237]. Toutefois, la pression apportée au système pour maintenir l'eau sous forme liquide nécessite un apport énergétique important [236, 249, 293]. Une partie de cette énergie est compensée par le fait qu'il n'est pas nécessaire de réduire fortement la taille du matériel végétal car celui-ci se décompose pendant le prétraitement [236].

#### 6.4.2 Autres prétraitements physico-chimiques

De nombreux autres prétraitements physico-chimiques ont été développés. Le Tableau 4 propose une liste non-exhaustive des principaux prétraitements physico-chimiques.

Tableau 4. Liste des principaux prétraitements physico-chimiques.

Prétraitement	Principe	Effet sur les parois	Caractéristiques	Références
Sulfite (SPORL)	Dérivé de l'industrie papetière. Mise en contact de la biomasse avec des ions sulfite ou bisulfite et de l'acide sulfurique dans des conditions de température élevées.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sulfonation de la lignine et diminution de l'affinité pour les enzymes.</li> <li>Dépolymérisation des hémicelluloses.</li> <li>Dépolymérisation partielle de la cellulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Applicable sur une large variété de biomasses.</li> <li>Dégradation des sucres.</li> <li>Grand volume d'eau nécessaire.</li> <li>Coût du recyclage des produits chimiques.</li> </ul>	[236, 249, 297]
Explosion à la vapeur	Imprégnation de la biomasse sous pression par de la vapeur saturée, puis relâchement rapide de la pression pour exploser les structures.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Déliquification partielle.</li> <li>Hydrolyse des hémicelluloses.</li> <li>Dépolymérisation partielle de la cellulose.</li> <li>Augmentation de la porosité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de coût de recyclage.</li> <li>Faible coût énergétique.</li> <li>Formation d'inhibiteurs de la fermentation.</li> <li>Baisse du rendement à cause de l'étape de lavage des résidus prétraités.</li> </ul>	[235, 249, 298]
Explosion à l'ammoniac (AFEX)	Imprégnation de la biomasse sous pression dans de l'ammoniac liquide, puis relâchement rapide de la pression pour évaporer l'ammoniac et exploser les structures.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Décrystallisation de la cellulose</li> <li>Pas de dégradation des hémicelluloses.</li> <li>Gonflement des parois qui présentent une plus grande surface accessible.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de formation d'inhibiteur.</li> <li>Faible coût.</li> <li>Possibilité de recycler l'ammoniac.</li> <li>Efficace pour des substrats pauvres en lignine.</li> </ul>	[236, 249, 299]
CO <sub>2</sub> supercritique	Prétraitement par des solvants (eau, ammoniac, mais majoritairement CO <sub>2</sub> ...) soumis à des températures et pressions supérieures à leur point critiques au-delà desquelles ils adoptent des propriétés particulières.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dépolymérisation partielle de la cellulose en glucose.</li> <li>Hydrolyse acide des hémicelluloses.</li> <li>Faible dépolymérisation de la lignine.</li> <li>Déstructuration des parois quand la pression est relâchée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Meilleur pénétration des petits pores.</li> <li>Faible coût énergétique.</li> <li>Faible toxicité du CO<sub>2</sub>.</li> <li>Possibilité de réaliser le prétraitement et la saccharification simultanément à 35°C.</li> <li>Inefficace sur les biomasses ne contenant pas d'humidité.</li> </ul>	[236, 249, 300]

## **7 Évaluation de la récalcitrance des parois**

### **7.1 Analyse des caractéristiques de la biomasse**

L'efficacité des prétraitements est principalement mesurée par la quantification du glucose libéré au cours de l'hydrolyse enzymatique, puisque le plus souvent, l'objectif du prétraitement est d'améliorer le rendement de saccharification de la biomasse en réduisant sa récalcitrance. De nombreuses techniques d'analyses existent pour mesurer l'évolution des caractéristiques de la biomasse suite au prétraitement [235].

La détermination de la composition chimique fait partie des analyses indispensables pour comprendre l'effet des prétraitements. Des protocoles de dégradation des différentes fractions pariétales basés sur une hydrolyse acide en deux étapes sont établis depuis longtemps, et sont désormais harmonisés pour assurer une homogénéité des résultats [301]. Des études sont toujours menées pour rendre ces analyses moins consommatrices à la fois en échantillons, mais aussi en temps [302]. La spectroscopie infrarouge permet également, grâce à l'analyse des bandes relatives à certains groupements spécifiques, de suivre l'évolution des différents polymères pariétaux de manière semi-quantitative, et le développement d'outils statistiques pourrait permettre la mise en place de modèles robustes pour prédire la structure des parois [303].

La spectroscopie infrarouge peut ainsi être utilisée pour déterminer la cristallinité de la cellulose, même si des approches de cristallographie par diffraction des rayons X sont privilégiées [304]. La spectroscopie Raman peut aussi donner des informations sur la structure de la cellulose, mais aussi sur celles des hémicelluloses et de la lignine [305]. La structure de la lignine, sa composition ainsi que les liaisons entre les différents monolignols, peut être étudiée par RMN bidimensionnelle notamment [306].

Un autre facteur structural communément analysé est la porosité des échantillons, en raison de son influence importante sur la surface accessible de la cellulose [184]. Différentes techniques ont été développées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Les mesures de porosité effectuées par exclusion de solutés [307], par marquage de Simon [183] ou par adsorption d'azote [308] présentent des biais relatifs à la taille des sondes utilisées et ne donnent pas une mesure absolue de la taille des pores. La tomographie électronique permet de visualiser ces pores directement en trois dimensions dans la biomasse, mais elle nécessite une étape de déshydratation qui peut modifier la porosité par hornification des structures [309]. Des mesures du temps de relaxation  $T_2$  de l'eau par résonance

magnétique nucléaire (RMN) à bas champ permettent de s'affranchir de ce problème, tout en réalisant la mesure dans des conditions relativement proches de celle de l'hydrolyse enzymatique [310].

## **7.2 Apport des techniques de microscopie**

L'utilisation de différentes techniques de microscopie permet de visualiser l'effet des prétraitements sur la structure des parois. La microscopie électronique à balayage a ainsi été utilisée, par exemple, pour observer la désorganisation de la structure d'échantillons de blé [311], de peuplier [299] et de miscanthus [312] soumis à différents prétraitements et a permis de mettre en évidence la formation de gouttelettes de lignine à la surface des échantillons suite à la recondensation du polymère. La surface des échantillons peut également être analysée par microscopie à force atomique. Une meilleure exposition des microfibrilles [311] et la formation de gouttelettes de lignine [313] ont ainsi été observées après prétraitement hydrothermique d'échantillons de blé. La spectroscopie Raman est le plus souvent couplée à l'imagerie en microscopie pour cibler les polymères d'intérêt [305].

La microscopie de fluorescence est devenue une des techniques les plus employées pour l'étude de systèmes biologiques en raison de sa sensibilité, de sa sélectivité et de la possibilité de suivre plusieurs marqueurs fluorescents au cours d'une même observation [314]. Ces expériences peuvent se baser sur l'observation directe de l'autofluorescence des parois. Par exemple, le gonflement réversible des parois de peuplier au cours du prétraitement au 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate a été suivi par microscopie confocale [315]. Il est également possible d'observer l'organisation de la paroi par l'utilisation de sondes fluorescentes. La redistribution des hémicelluloses résiduelles au sein de parois de maïs prétraité à l'acide dilué [316] ou de peuplier prétraité de manière hydrothermique [317] a ainsi pu être observée par immunomarquage. L'affinité des CBM pour certains polysaccharides peut également être mises à profit pour étudier l'effet des prétraitements [317].

## **7.3 Analyse de la dynamique enzymatique**

Toutes les techniques de caractérisation décrites jusqu'à présent se concentrent sur l'évolution du substrat au cours du prétraitement pour expliquer l'amélioration de l'activité enzymatique lors de la saccharification. Toutefois, la dynamique des enzymes est également susceptible d'être modifiée. La diffusion des enzymes peut également être étudiée par différentes techniques de microscopie [314].

La première étude sur la diffusion de cellulases par microscopie a été réalisée en 1997 par Jervis *et al.* qui ont analysé la diffusion de cellulases bactériennes fluorescentes et de leur CBM par microscopie confocale grâce à la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP). Il ont ainsi pu montrer que la processivité des enzymes n'était pas un facteur limitant au cours de l'hydrolyse, puisque 70% des sondes pouvaient se déplacer avec une vitesse de diffusion comprise entre  $2 \times 10^{-11}$  et  $1,2 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s [318]. Une étude de la diffusion de dextrans fluorescents sur un substrat hautement cellulosique (du papier filtre) a montré que la mobilité des sondes était grandement influencée par la porosité de l'échantillon [319].

Bien qu'elles mettent en évidence des paramètres influençant les interactions et la mobilité des enzymes pendant l'hydrolyse, ces études ont été réalisées sur des substrats modèles qui ne reflètent pas exactement les phénomènes se déroulant dans les parois. Une étude menée sur des tiges de maïs délignifiées au chlorite de sodium, analysées par différentes techniques de microscopie a permis de mettre en évidence l'action homogène des cellulases fongiques au sein des parois [320]. Il a été montré que la dégradation enzymatique démarrait au niveau du lumen, et que les cellulases pénétraient au sein des fibrilles de celluloses pour les désorganiser. Cette étude a également présenté un suivi en temps réel de la saccharification des échantillons par microscopie optique. Toutefois, les observations microscopiques n'ont pas permis de comprendre en détail les mécanismes de l'amélioration de la saccharification après prétraitement en raison de la synergie entre les différentes enzymes lignocellulolytiques susceptibles d'être influencées par de nombreux paramètres.

Luterbacher *et al.* ont étudié la diffusion d'une Cel7A de *T. reesei* marquée avec une sonde fluorescente au sein d'échantillons de bois dur soumis à un prétraitement biphasique à base de dioxyde de carbone supercritique et d'eau [321]. Une meilleure interaction des enzymes au niveau des régions comportant moins de lignine, indiquées par une plus faible autofluorescence, a pu être observée. L'observation de l'évolution de la fluorescence en temps réel a également révélé une meilleure pénétration des enzymes chez les échantillons prétraités, principalement dans les zones où la structure était la plus altérée. Toutefois, le modèle précédemment établi par ce groupe, à partir d'expériences similaires réalisées sur du papier filtre [322], n'a pas pu être appliqué de manière aussi efficace en raison de la complexité des parois [323].



**OBJECTIFS DE LA THÈSE ET  
STRATÉGIE DE RECHERCHE**

## **1 Objectifs scientifiques**

La récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique est un phénomène complexe faisant intervenir de nombreux paramètres chimiques et structuraux qui diminuent l'activité des enzymes au sein des parois lignocellulosiques. De nombreux prétraitements ont été mis au point pour réduire cette récalcitrance. Toutefois, la plupart des analyses des effets des prétraitements se concentrent sur l'évolution de la composition du substrat et notamment de sa teneur en glucose pour expliquer l'augmentation du rendement d'hydrolyse, et peu d'études sont disponibles sur l'évolution de la dynamique enzymatique en lien avec la diminution de la récalcitrance des parois. Pourtant, le rôle de barrières physiques joué par les hémicelluloses et la lignine, les liaisons non-productives des enzymes à la surface de la lignine, la nanoporosité des parois sont considérés comme autant de facteurs responsables d'une faible accessibilité des enzymes à leur substrat et à leur diffusion dans la paroi.

L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer quels sont les facteurs relatifs à la structure et à la composition de la biomasse qui limitent non seulement l'activité des enzymes mais également leur progression dans la matrice pariétale. L'analyse de ces corrélations pourrait fournir des pistes d'amélioration des prétraitements déjà développés, mais aussi de sélection ou de modification des enzymes pour leur permettre d'outrepasser certains facteurs de la récalcitrance bien ciblés.

Pour répondre à cette problématique, nous avons constitué un ensemble d'échantillons contrastés dont nous avons quantifié les caractéristiques structurales et chimiques. Leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique a également été évaluée par des mesures de rendement de saccharification. Enfin, l'accessibilité de différentes sondes fluorescentes dans les parois a été mesurée.

## **2 Stratégie de recherche**

### **2.1 Constitution d'un panel d'échantillons de biomasses contrastés**

Les travaux menés pour évaluer l'impact des prétraitements ont permis de montrer l'influence de plusieurs facteurs sur la digestibilité des parois. La teneur en lignine et en hémicelluloses, les interactions entre les polymères, la porosité des parois, ont ainsi été avancées comme autant d'explications à la récalcitrance. Toutefois, le nombre et les conditions variables de réalisation des prétraitements, ainsi que le large spectre de biomasses



utilisées, induisent parfois des résultats contradictoires qui compliquent les interprétations et la généralisation des résultats obtenus.

Pour pallier ce problème, nous avons constitué un ensemble conséquent d'échantillons de biomasses contrastées. Le choix des biomasses s'est porté sur le peuplier et le miscanthus, deux espèces représentatives des cultures dédiées, et la paille de blé, un résidu de culture agricole produit en grande quantité dans la Région Grand-Est. En plus de leur intérêt économique, ces espèces présentent l'avantage de posséder des structures pariétales différentes, puisque le peuplier est une angiosperme à bois dur alors que le miscanthus et le blé sont des graminées.

Ces biomasses ont été soumises à des prétraitements sélectionnés pour leurs effets contrastés sur la composition chimique et la structure des parois végétales. Le prétraitement à l'acide dilué est considéré comme l'une des principales méthodes de prétraitement qui permet d'améliorer la saccharification en éliminant presque totalement les hémicelluloses, qui sont hydrolysées sous forme de monosaccharides pouvant être récupérés et valorisés ultérieurement. Le prétraitement hydrothermique a lui aussi été sélectionné pour une mise en place à l'échelle industrielle, notamment car il permet de prétraiter la biomasse sans l'utilisation de solvants ou autres produits chimiques qui nécessitent des étapes supplémentaires pour être éliminés et recyclés. Son efficacité réside dans l'élimination partielle des hémicelluloses et de la lignine et la réorganisation de la lignine résiduelle permettant un meilleur accès à la cellulose. Le prétraitement au liquide ionique est relativement récent, mais prometteur en raison de son efficacité et de la possibilité de recycler et réutiliser ces solvants. Il permet une solubilisation plus ou moins efficace des différents composés pariétaux et une élimination partielle de la lignine permettant un meilleur accès aux polysaccharides dont la structure a été altérée, notamment dans le cas de la cellulose rendue plus amorphe, et donc plus facilement hydrolysable. Enfin, le prétraitement au chlorite de sodium, couramment utilisé dans l'industrie papetière, a été choisi car il reste la procédure standard utilisée en laboratoire pour délignifier les échantillons végétaux.

Nous avons ensuite fait le choix de pratiquer ces prétraitements non pas sur des biomasses broyées, mais sur des fragments de taille standardisée pour plusieurs raisons. La première est que le broyage, en réduisant les tailles des échantillons, induit la perte d'informations morphologiques intéressantes pour la compréhension de l'impact des prétraitements sur l'activité enzymatique. De plus, travailler avec des fragments permet la réalisation de coupes permettant d'étudier l'évolution des structures pariétales par des

techniques de microscopie. Enfin, la diffusion des sondes a pu être étudiée dans des structures pariétales ciblées, la paroi secondaire dans le cas présent, permettant une comparaison plus précise de la dynamique enzymatique au sein des différents échantillons.

## **2.2 Stratégie d'étude de la dynamique enzymatique**

La dynamique des enzymes a été étudiée par des mesures de mobilité de sondes fluorescentes par microscopie confocale de fluorescence. Le choix des sondes a été effectué en prenant en compte certaines considérations. Les sondes utilisées ne devaient pas posséder d'activité catalytique afin de différencier l'activité des enzymes et leur diffusion. Les sondes devaient avoir un comportement dynamique semblable à celui des enzymes. Leur taille devait être modulable, et elles devaient pouvoir être détectées de manière distincte dans les parois elles-mêmes fluorescentes en raison de la présence de la lignine et de ses structures aromatiques hautement conjuguées.

Notre choix s'est porté sur des molécules de polyéthylène glycol (PEG) porteuses d'un fluorophore de type rhodamine. Les PEG présentent l'avantage d'être synthétisés chimiquement, ce qui fait que leur taille est ajustable. De plus, il a été montré que les PEG pouvaient se fixer sur la lignine, de façon analogue aux liaisons non-spécifiques observées chez les cellulases et les hémicellulases. La rhodamine a été choisie comme fluorophore pour ses maxima d'excitation et d'émission relativement élevés (550 nm et 570 nm respectivement), situés dans une région du spectre de la lumière où la lignine est faiblement fluorescente.

## **3 Présentation des résultats**

Les résultats de nos recherches sont structurés en chapitres, chacun rédigé sous la forme d'articles scientifiques qui ont été soumis ou sont finalisés.

### **3.1 Chapitre 1**

Le premier chapitre traite des relations entre les facteurs caractéristiques de la paroi et leur susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique. Des biomasses d'origines botaniques variées (paille de blé, miscanthus, peuplier) ont été soumises à des prétraitements contrastés (acide dilué, hydrothermique, liquide ionique et chlorite de sodium). Les conditions de

prétraitements ont été sélectionnées de manière à améliorer le rendement de saccharification des échantillons tout en conservant leur intégrité structurale.

Une analyse multimodale combinant des approches microscopiques, spectrométriques et chimiques a ensuite permis d'analyser les changements induits au niveau de la morphologie, de la structure et de la composition des échantillons. L'étude des corrélations entre ces différents paramètres et le rendement de saccharification des échantillons a permis de déterminer l'effet générique de certains facteurs sur la récalcitrance de la biomasse. L'autofluorescence des parois est également apparue comme un indicateur fiable de la digestibilité enzymatique des parois.

### **3.2 Chapitre 2**

Le deuxième chapitre présente une étude de la caractérisation des sondes fluorescentes utilisées pour mesurer la diffusion des enzymes dans les parois. En effet, les propriétés spectrales et physiques des sondes fluorescentes sont en général peu ou partiellement décrites alors que ces données sont indispensables pour comprendre leur dynamique. Nous avons choisi d'analyser les propriétés spectrales et physiques de deux types de sondes, des dextrans et des PEG, porteurs de deux types de fluorophores relativement communs, la fluorescéine et la rhodamine. Le rayon hydrodynamique ( $R_H$ ) des sondes, une donnée souvent manquante parmi les informations disponibles auprès du fournisseur, a été mesuré par diffusion dynamique de la lumière. Ces mesures ont permis de caractériser en détails les sondes utilisées par la suite, mais aussi d'établir, pour chaque type de sondes, une équation prédictive de leur  $R_H$  en fonction de leur masse molaire applicable de manière plus générale à des sondes de composition similaire.

### **3.3 Chapitre 3**

Le troisième chapitre s'intéresse à l'évolution de la diffusion de sondes fluorescentes au sein de la paroi d'échantillons de peuplier soumis à différents prétraitements (hydrothermique, liquide ionique) au cours de l'hydrolyse enzymatique. Des mesures cinétiques de la saccharification, ainsi que de l'évolution de la composition chimique et de la diffusion de sondes fluorescents de taille similaire à celles des enzymes lignocellulolytiques ont été réalisées. Un plan d'expériences factoriel a permis de distinguer l'influence des prétraitements, de l'hydrolyse des polysaccharides et de la taille des sondes sur la mobilité de ces dernières. Des mesures de porosité ont également permis de corréler l'évolution de

certaines gammes de tailles de pores avec la diffusion des sondes et le rendement d'hydrolyse final. Nous avons pu ainsi souligner le lien entre la diffusion et les interactions des sondes pour expliquer leur mobilité au sein de la paroi, et ainsi montré l'influence conjuguée de la porosité et de la lignine sur la dynamique enzymatique.

### **3.4 Chapitre 4**

Le quatrième chapitre traite des interactions entre les sondes PEG-rhodamine et la lignine, dont l'importance dans le phénomène de récalcitrance a été montrée précédemment. Ces interactions ont été évaluées par la mesure de transfert d'énergie de résonance de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) pour des sondes de différentes tailles au sein des parois d'échantillons de peuplier et de pin soumis à des prétraitements hydrothermique et au chlorite de sodium, qui ont montré des effets contrastés sur la teneur et la structure de la lignine. L'impact des prétraitements sur la lignine a également été analysé par des mesures de temps de vie de fluorescence. Il est apparu que l'efficacité de FRET entre la lignine et les sondes dépendait à la fois de la structure de la lignine et de la taille des sondes, suggérant un effet conjugué de l'organisation de la lignine et de la porosité sur les interactions des sondes avec la lignine.

### **3.5 Chapitre 5**

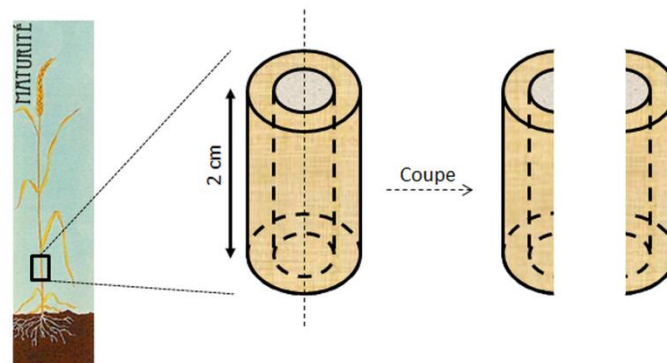
Le cinquième et dernier chapitre présente une étude de la visualisation en temps réel de l'action conjuguée d'un cocktail cellulasique couplé à une *Lytic Polysaccharide Monoxygenase* (LPMO). L'utilisation de techniques de microscopie de fluorescence et de spectrométrie infrarouge issues de sources synchrotron ont permis de montrer la synergie existant entre les enzymes au sein de parois d'échantillons de miscanthus prétraité. Une dégradation préférentielle de la cellulose en fonction du type cellulaire a également été observée, soulignant les disparités de structure et de récalcitrance à l'échelle tissulaire.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 1 Biomasses sélectionnées

### 1.1 Paille de blé

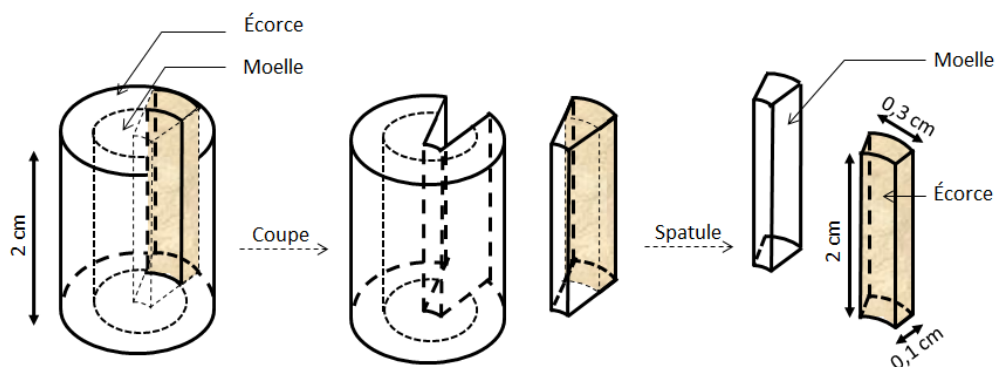
Les plants de blé (*Triticum aestivum*) de la variété Haussmann ont été cultivés en Champagne-Ardenne et récoltés à maturité par des professionnels de la coopérative agricole Vivescia en juillet 2012. Des fragments de 2 cm ont été coupés à la lame jetable à partir de l'entrenœud 3, à une distance d'au moins 1 cm des nœuds. Ces fragments ont ensuite été de nouveau coupés en deux dans le sens de la longueur (Figure 23).



**Figure 23** - Préparation des fragments de blé.

### 1.2 Miscanthus

Les plants de miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) ont été plantés en avril 2006 sur des parcelles expérimentales du site INRA d'Estrées-Mons (Hauts-de-France, France) et récoltés en Février 2008 (récolte tardive). Des fragments de  $2 \times 0,3 \times 0,1$  cm ont été coupés à la lame jetable à partir de l'entrenœud 4. La moelle, souvent dégradée au cours des prétraitements, a été retirée à l'aide d'une spatule pour ne conserver que l'écorce des fragments (Figure 24).



**Figure 24** - Préparation des fragments de miscanthus.

### 1.3 Peuplier

Les plants de peuplier (*Populus nigra x deltoides*) ont été cultivés sur des parcelles expérimentales sur le site INRA d'Estrées-Mons (Hauts-de-France, France). Les plants utilisés sont des taillis à très courte rotation (TTCR) récoltés très jeunes après 2 ans. Des fragments de  $2 \times 0,6 \times 0,2$  cm ont été coupés à la lame jetable à partir des tiges en se positionnant du côté de l'écorce (Figure 25). Les régions de ramification ont été évitées afin de ne pas avoir de bois de tension dans les échantillons.

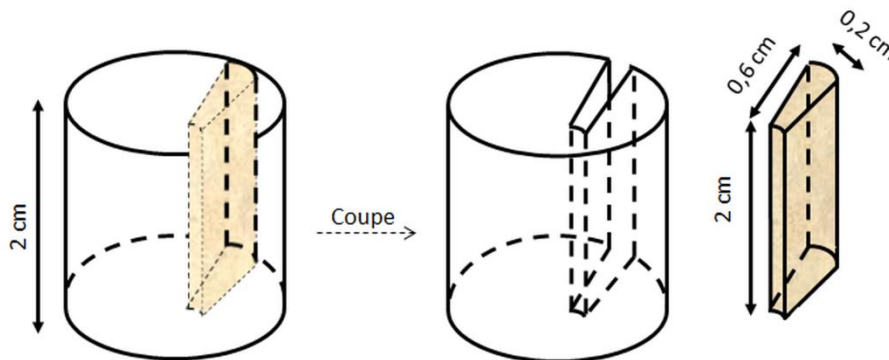


Figure 25 - Préparation des fragments de peuplier.

### 1.4 Préparation des échantillons de biomasse

#### 1.4.1 Inclusion des fragments dans le polyéthylène glycol (PEG)

Les fragments de biomasse sont placés dans de l'eau ultra pure, puis tirés sous vide partiel à 0,4 bar  $3 \times 15$  minutes, avant d'être laissés à température ambiante 24 h sous agitation à l'aide d'un agitateur orbital. Une fois les fragments complètement immergés, l'ensemble des étapes précédemment décrites est répété avec des solutions de polyéthylène glycol (MM = 1450 g/mol) de concentrations croissantes (30% m/v puis 50% m/v dans l'eau ultra pure). Après cette troisième immersion, les fragments sont placés 16 h dans une solution de PEG pure à 70°C afin de maintenir le polymère à l'état liquide.

Les fragments sont ensuite plongés individuellement dans du PEG liquide au sein de capsules en plastique maintenues à une température de 70°C. La température est alors doucement abaissée afin d'assurer une polymérisation homogène du PEG dans la capsule.

#### 1.4.2 Broyage des fragments de biomasse lignocellulosique

Les fragments de biomasse de 2 cm sont coupés en morceaux de plus petite taille avant d'être introduits dans la chambre de broyage d'un broyeur centrifuge ZM 1000 (Retsch), constitué d'un rotor à 24 dents autour desquelles est placé un tamis annulaire dont les trous ont un diamètre de 80  $\mu\text{m}$ . Les broyages sont effectués à 15 000 rpm pendant 2 minutes. Les résidus solides sont à nouveau broyés 1 à 2 fois en fonction des échantillons.

#### 1.4.3 Ultra broyage des échantillons de biomasse lignocellulosique

200 mg de fragments de biomasse de 2 cm sont coupés en morceaux de plus petite taille avant d'être introduit dans un bol de broyage en zirconium de 25 mL pourvu d'une bille en zirconium de 10 mm de diamètre. Les broyages sont effectués à l'aide d'un broyeur planétaire MM 2000 (Retsch) réglé à une puissance de 90%. 4 cycles de broyages de 20 minutes, espacés de 10 minutes, sont réalisés, afin d'assurer un ultra broyage complet des parois sans dénaturer les polymères en raison d'une hausse trop importante de la température dans les bols de broyage.

## 2 Prétraitements

### 2.1 Prétraitement à l'acide dilué

Le prétraitement à l'acide dilué des échantillons de biomasse est adapté à partir de la méthode décrite par Belmokhtar *et al.* [324].

Les fragments de biomasse sont immergés dans de l'eau ultra pure puis tirés sous-vide  $4 \times 15$  minutes avant d'être laissés une nuit à 4°C afin de chasser l'air contenu dans les pores et ainsi assurer une meilleure diffusion des réactifs pendant le prétraitement.

Les fragments sont traités avec une solution d'acide sulfurique à 2% (v/v) dans des bombes de minéralisation équipées de gaines en téflon (Parr, États-Unis) avec un chargement en biomasse de 3,3% m/v. Les fragments sont maintenus à 170°C pendant 20 minutes à l'aide d'un bain d'huile. Après un refroidissement rapide des gaines dans la glace, les fragments sont rincés à l'eau ultra pure et à l'éthanol 50% jusqu'à ce qu'aucun composé soluble ne soit détecté dans le milieu de rinçage par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Les fragments de biomasse prétraités sont ensuite séchés à température ambiante jusqu'à ce que leur masse demeure constante.



## **2.2 Prétraitement hydrothermique**

Le prétraitement hydrothermique des échantillons de biomasse a été adapté à partir de la méthode décrite par Belmokhtar *et al.* [324].

Les fragments de biomasse sont immergés dans de l'eau ultra pure puis tirés sous-vide 4 × 15 minutes avant d'être laissés une nuit à 4°C afin de chasser l'air contenu dans les pores et ainsi assurer une meilleure diffusion des réactifs pendant le prétraitement.

Les fragments sont traités à l'eau ultra pure dans des bombes de minéralisation équipées de gaines en téflon (Parr, États-Unis) avec un chargement en biomasse de 3.3% m/v. Les fragments sont maintenus à 180°C pendant 60 minutes à l'aide d'un bain d'huile. Après un refroidissement rapide des gaines dans la glace, les fragments sont rincés à l'eau ultra pure et à l'éthanol 50% jusqu'à ce qu'aucun composé soluble ne soit détecté dans le milieu de rinçage par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Les fragments de biomasse prétraités sont ensuite séchés à température ambiante jusqu'à ce que leur masse demeure constante.

## **2.3 Prétraitement à l'Émim-acétate**

Le prétraitement au liquide ionique de fragments de biomasse lignocellulosique a été développé en se basant sur des protocoles décrits dans la littérature pour des biomasses broyées [273, 325, 326].

Les fragments de biomasse sont immergés dans de l'eau ultra pure puis tirés sous-vide 4 × 15 minutes avant d'être laissés une nuit à 4°C afin de chasser l'air contenu dans les pores et ainsi assurer une meilleure diffusion des réactifs pendant le prétraitement.

Les fragments sont traités au 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate dans des bombes de minéralisation équipées de gaines en téflon (Parr, États-Unis) avec un chargement en biomasse de 6% masse/volume. Les fragments sont maintenus à 130°C pendant 40 minutes à l'aide d'un bain d'huile. Après un refroidissement rapide des gaines dans la glace, les fragments sont rincés à l'eau ultra pure et à l'éthanol 50% jusqu'à ce qu'aucun composé soluble ne soit détecté dans le milieu de rinçage par lecture de l'absorbance à 280 nm.

Les fragments de biomasse prétraités sont ensuite séchés à température ambiante jusqu'à ce que leur masse demeure constante.

## **2.4 Prétraitement au chlorite de sodium**

Le prétraitement au chlorite de sodium des échantillons de biomasse a été réalisé selon la méthode décrite par Wise *et al.* [280].

Les fragments de biomasse sont plongés dans de l'eau ultra pure puis tirés sous-vide 4 x 15 minutes avant d'être laissés une nuit à 4°C afin de chasser l'air contenu dans les pores et ainsi assurer une meilleure diffusion des réactifs pendant le prétraitement.

La délignification des échantillons est réalisée sur 1 g de biomasse, dans un milieu constitué de 40 mL d'eau ultra pure auxquels sont ajoutés 150 µL d'acide acétique glacial et 0,4 g de chlorite de sodium. Les incubations sont réalisées à 70°C. Le milieu de prétraitement, saturé en lignine, est renouvelé au bout d'une heure pour continuer le prétraitement. Le nombre d'incubations est ajusté pour chaque biomasse, afin d'assurer une délignification homogène des fragments : 3 incubations sont réalisées pour les fragments de blé, 6 pour les fragments de peuplier et 8 pour les fragments de miscanthus.

Après la dernière incubation, les échantillons sont rincés à l'eau ultra pure jusqu'à ce que le pH du milieu de rinçage demeure neutre. Les fragments sont ensuite séchés à température ambiante jusqu'à ce que leur masse demeure constante.

## **3 Hydrolyse enzymatique**

### **3.1 Détermination de l'activité FPU du cocktail Cellic® Ctec2**

Le dosage de l'activité du cocktail enzymatique Cellic® Ctec2 a été effectué selon la méthode de détermination de l'activité papier filtre (*Filter Paper Unit*, FPU), décrite par le National Renewable Energy Laboratory [327].

L'activité de différentes dilutions d'enzymes (1/50° à 1/600°) est mesurée en utilisant du papier filtre Whatman n°1 comme substrat de référence. Des bandes de 1 × 6 cm sont mises à incuber dans des tubes à hémolyse dans 1 mL de tampon citrate de pH 4,8 50 mM pendant 20 minutes à 50°C, puis 0,5 mL des différentes dilutions d'enzymes sont ajoutés à chaque tube pour initier la réaction. Cette dernière est stoppée au bout d'une heure par ajout de 3 mL de DNS, puis les tubes sont mis à incuber 5 minutes à 100°C. Après avoir laissé refroidir les tubes, le glucose libéré est dosé par lecture de l'absorbance à 540 nm des milieux réactionnels après dilution (100 µL de milieu dans 1,25 mL d'eau ultra pure).

La représentation graphique de la quantité de glucose libérée (en mg) par 0,5 mL d'enzymes en fonction de la dilution enzymatique est ensuite utilisée pour déterminer l'activité FPU à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité FPU/mL} = \frac{0,37}{[\text{enzyme}] \text{ pour libérer } 2,0 \text{ mg de glucose}}$$

avec le numérateur 0,37 dérivé du facteur pour convertir les 2,0 mg de glucose générés au cours de l'analyse en nmoles de glucose (2,0 / 0,18016) au sein du volume d'enzymes testé (0,5 mL) pendant un temps d'incubation de 60 minutes :

$$\frac{2,0 \text{ mg de glucose} / 0,18016 \text{ mg de glucose}/\mu\text{mol}}{0,5 \text{ mL de dilution enzymatique} \times 60 \text{ minutes}} = 0,37 \mu\text{mol/minute/mL}$$

### **3.2 Détermination de la teneur en protéines du cocktail enzymatique**

La détermination de la quantité de protéines contenues dans le cocktail Cellic® Ctec 2 est réalisée selon la méthode de Lowry [328]. Les protéines sont au préalable précipitées à l'acide trichloroacétique (TCA) afin de supprimer les substances interférentes contenues dans les cocktails enzymatiques commerciaux et qui pourraient réagir avec le colorant et fausser le dosage.

Des dilutions du cocktail enzymatique au 1/1000<sup>e</sup> et au 1/2000<sup>e</sup> sont effectuées dans l'eau ultra pure et 0,5 mL de ces dilutions sont mélangés à 0,5 mL d'une solution de TCA à 10% dans des microtubes de 2 mL. Les tubes sont homogénéisés et laissés 30 minutes à 4°C avant d'être centrifugés 5 minutes à 9 000 g. Les surnageants sont retirés des tubes et les culots sont séchés au concentrateur sous vide pendant 5 minutes. Les culots sont ensuite resuspendus dans 0,5 mL d'une solution de NaOH 0,4% + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dans l'eau ultra pure.

La suspension protéique ainsi obtenue est mélangée avec 1 mL d'une solution de CuSO<sub>4</sub> / tartatre double de sodium et de potassium / Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2% / 2% / 3% m/v), puis l'ensemble est homogénéisé et laissé pendant 10 minutes à température ambiante. 100 µl d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2 sont ajoutés, et l'ensemble est homogénéisé et laissé pendant 30 minutes à température ambiante.

La quantité de protéines contenues dans le cocktail enzymatique est alors déterminée par mesure de l'absorbance à 660 nm rapportée à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution de séralbumine bovine à 500 µg/mL.

### **3.3 Détermination des activités glucosidase et xylosidase**

La détermination des activités glucosidase et xylosidase du cocktail enzymatique est réalisée par mesure de la vitesse initiale d'hydrolyse de *para*-nitrophényl-glucoopyranoside (*p*NP-Glu) et xylopyranoside (*p*NP-Xyl) respectivement, à l'aide d'un spectrophotomètre.

900 µL d'une solution de *p*NP-saccharide sont mis à incuber à 50°C pendant 5 minutes dans une cuve de spectrophotométrie dans le passeur d'échantillons du spectrophotomètre, puis la réaction est initiée par ajout de 100 µl d'une dilution du cocktail enzymatique (1/500<sup>e</sup> pour le dosage de l'activité glucosidase et 1/10<sup>e</sup> pour le dosage de l'activité xylosidase). La libération du *p*NP, produit coloré, est suivi au cours du temps par mesure de l'absorbance à 401 nm.

Les activités enzymatiques, exprimées en UI/mL (Unité Internationale/mL) sont calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{UI/mL} = \frac{\text{Pente de la cinétique} \times 1000 \times \text{volume total}}{\varepsilon \text{ du } p\text{NP} \times \text{volume d'enzyme}} \times \text{dilution de l'enzyme}$$

avec  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire du *p*NP = 397 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

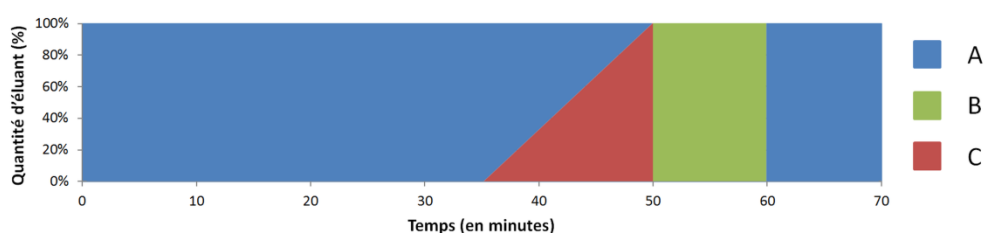
### **3.4 Saccharification des échantillons de biomasse lignocellulosique**

Environ 200 mg de fragments de biomasse, prétraités ou non, sont pesés avec précision, puis incubés dans une solution de tampon citrate pH 4,8 à 50 mM contenant 0,02% d'azoture de sodium pendant 20 minutes à 50°C. L'enzyme est ensuite ajoutée au milieu pour initier la réaction, qui se déroule avec un chargement en biomasse de 2% (m/v) et un chargement en enzyme de 90 FPU/g de biomasse. La réaction est arrêtée à différents temps (0 – 2 – 6 – 15 – 24 – 48 – 72 – 96 h) en plaçant les réacteurs dans la glace, et les fragments sont alors rincés par filtration avec 200 mL d'eau ultra pure. Les fragments sont ensuite séchés à température ambiante jusqu'à ce que leur masse demeure constante.

La libération des sucres contenus dans les parois végétales est suivie de façon cinétique pendant 96 h, par prélèvement aux temps susmentionnés de 100 µl de milieu réactionnel. Le cocktail enzymatique est désactivé par incubation à 90°C pendant 10 minutes, puis les prélèvements sont stockés à -20°C avant analyse de la teneur en sucre par chromatographie ionique échangeuse d'anions.

### 3.5 Chromatographie ionique échangeuse d'anions

Les échantillons sont filtrés (Polytétrafluoroéthylène (PTFE), 0,45  $\mu\text{m}$ ) avant d'être injectés sur une colonne CarboPac PA-1 échangeuse d'anions de 4  $\times$  250 mm (Thermo Fisher Scientific, Dionex, Sunnyvale, États-Unis) maintenue à 22°C. L'élution se fait à un débit de 1,2 mL/min de la manière suivante : A (eau ultra pure) à 100% pendant 40 minutes pour permettre l'élution des sucres neutres ; A 100-0% et B (300 mM d'acétate de sodium et 300mM d'hydroxyde de sodium dans de l'eau ultra pure) 0-100% pendant 15 minutes pour permettre l'élution des acides uroniques ; C (300 mM d'hydroxyde de sodium dans de l'eau ultra pure) 100% pendant 10 minutes ; et finalement A 100% pendant 5 minutes pour rééquilibrer la colonne (Figure 26). La détection en sortie de colonne se fait à l'aide d'un détecteur à ampérométrie pulsée PAD-2 maintenu à 30°C et à un pH basique par passage d'une solution post-colonne d'hydroxyde de sodium 300 mM dans l'eau ultra pure à un débit de 0,4 mL/min.



**Figure 26** - Méthode d'élution en chromatographie ionique échangeuse d'anions.

Le 2-déoxy-D-ribose est utilisé comme étalon interne pour l'analyse de tous les échantillons. La calibration de la chaîne d'analyse est réalisée à partir de solutions de D-fucose, D-arabinose, L-rhamnose monohydrate, D-galactose, D-glucose, D-xylose, D-mannose, acide D-galacturonique monohydrate et acide D-glucuronique à différentes concentrations.

## 4 Détermination de la composition chimique des échantillons de biomasse

### 4.1 Composition en sucres pariétaux par hydrolyse acide

Après broyage des échantillons à une granulométrie de 80  $\mu\text{m}$ , environ 10 mg d'échantillons sont pesés avec précision. 125  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acide sulfurique à 12 M sont ensuite ajoutés au broyat, et l'ensemble est agité pendant 2 h à température ambiante au cours de l'étape de gonflement. À la fin du gonflement, l'acide est dilué à une concentration

de 1 M par ajout de 1 375  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure, et le milieu réactionnel est porté à 100°C pendant 2 h sous agitation au cours de l'étape d'hydrolyse. Après cette étape, le milieu réactionnel est centrifugé à 9 000 g pendant 5 minutes. La teneur en sucre du milieu réactionnel est ensuite quantifiée par chromatographie ionique échangeuse d'anions.

#### **4.2 Détermination de la teneur en lignine**

La détermination de la teneur en lignine Klason des échantillons est réalisée par approximation de la masse du résidu non hydrolysable par l'acide sulfurique comme décrit par Monties [329].

Environ 200 mg d'échantillons de biomasse broyés à une granulométrie de 80  $\mu\text{m}$  sont pesés avec précision (masse M). Les échantillons sont ensuite laissés une heure à 100°C, puis après refroidissement dans un dessiccateur, pesés à nouveau pour déterminer leur teneur en humidité par calcul de la différence de masse. Les broyats sont ensuite traités avec 2 mL d'acide sulfurique à 12 M pendant 2 h à température ambiante. L'acide est ensuite dilué à une concentration de 1 M par ajout d'eau distillée, et le milieu de réaction est porté à reflux à 100°C pendant 3 h. Les résidus de biomasse sont ensuite filtrés et rincés sur des tubes de Goosch à l'eau ultra pure jusqu'à ce que le pH de sortie du filtrat soit neutre. Les résidus sont séchés à 100°C pendant 20 h, puis pesés (masse P1). Les résidus sont ensuite calcinés 4 h à 550°C, et après refroidissement dans un dessiccateur, pesés à nouveau (masse P2 qui correspond à la masse de cendres contenus dans les échantillons). La teneur en lignine acido-insoluble des échantillons est alors déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Lignine (\%)} = \frac{(P1 - P2)}{M} \times 100$$

#### **4.3 Quantification des protéines pariétales par combustion catalytique**

Entre 5 et 7 mg d'échantillons de biomasse broyés à une granulométrie de 80  $\mu\text{m}$  puis séchés à l'étuve à 80°C pendant 24h sont pesés avec précision dans des capsules en étain plissées de 5  $\times$  9 mm.

La teneur en azote des échantillons est mesurée à l'aide d'un analyseur élémentaire Euro EA 3000 (Eurovector, Italie) équipé d'un détecteur à conductivité thermique. Le signal obtenu est traité par le logiciel Eager 200 (Carlo Erba, Italie), puis rapporté à une gamme étalon de leucine pour déterminer la teneur en azote des échantillons, exprimée en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de

matière initiale. La teneur en protéines des échantillons de biomasses est ensuite déterminée en appliquant un facteur de conversion de  $\times 6,25$  [330].

#### 4.4 Caractérisation de la composition monomérique de la lignine

La composition monomérique des lignines est estimée selon la méthode décrite par Rolando *et al.* [331].

Environ 10 mg d'échantillons de biomasse broyés à une granulométrie de 80  $\mu\text{m}$  sont pesés avec précision (masse  $M$ ). Les échantillons sont traités par 10 mL d'une solution de réactif trifluorure de bore étherate / éthanethiol / dioxane (2,5/10/87,5 v/v/v) auxquels est ajouté 1 mL d'une solution de docosane à 250  $\mu\text{g/mL}$  et tétracosane à 248  $\mu\text{g/mL}$  utilisée comme étalon interne. Le mélange est ensuite porté à une température de 100°C pendant 4 h sous agitation. Après refroidissement (10 minutes), le mélange est transféré dans une solution contenant 30 mL de dichlorométhane et 5 mL de  $\text{NaHCO}_3$  à 0,4 M. Le pH du mélange est ajusté autour de 3-4 par ajout d'HCl à 6N. La phase organique est récupérée par décantation et cette dernière étape est répétée 2 fois avec l'ajout de 30 mL de dichlorométhane. La phase organique récoltée est évaporée sous vide jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,5 mL puis conservé sur du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

10  $\mu\text{L}$  du résidu sont ensuite mélangés à 20  $\mu\text{L}$  de pyridine et 70  $\mu\text{L}$  de N-O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide au cours de l'étape de silylation des monomères de lignine, qui se déroule une nuit à température ambiante. La quantification des monomères de lignine se fait par analyse des résidus silylés avec un chromatographe en phase gazeuse 6890 équipé d'une colonne capillaire DB1 en silice fondue de 30 m  $\times$  0,3 mm (J&W Scientific©) et d'un détecteur à ionisation de flamme (Agilent, États-Unis), en utilisant le docosane comme étalon interne ( $e_i$ ). Une référence lignocellulosique subit également l'éthane-thioacidolyse puis la silylation afin de contrôler le coefficient de réponse du module chromatographique quant à la détection des monolignols.

La quantité des monomères de lignine (en  $\mu\text{mol/g}$  de matière initiale), ci-après dénommé  $x$ , est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Quantité de monomères} = \frac{A_x}{A_{e_i}} \times 1,5 \times \frac{m_{e_i}}{M} \times 1000 \times \frac{1000}{MM_x}$$

avec  $A_x$  l'aire du pic du monomère de lignine ;  $A_{e_i}$  l'aire du pic de l'étalon interne ;  $m_{e_i}$  la masse d'étalon interne en mg,  $M$  la masse de biomasse initiale en mg ;  $MM_x$  la masse molaire du monomère de lignine en g/mol.

#### **4.5 Analyse des liaisons des sous-unités de la lignine par RMN**

L'analyse de la structure chimique de la lignine est effectuée par Résonance Magnétique Nucléaire selon la méthode décrite par Chantreau *et al.* [332]

Les échantillons de biomasse ultra broyés (100 mg) sont solubilisés dans 3,6 mL de DMSO et 1,8 mL de N-méthylimidazole pendant une nuit à température ambiante sous agitation. L'acétylation est réalisée par ajout de 1,8 mL d'anhydride acétique puis le mélange est laissé sous agitation pendant 4 h à température ambiante. Les échantillons acétylés sont ensuite floculés dans 600 mL d'eau ultra pure sous agitation. Les floculats ainsi obtenus sont conservés à 4°C avant d'être récupérés par centrifugation à 18 600 g pendant 15 minutes à 10°C. Les culots sont rincés à l'eau ultra pure et centrifugés à nouveau dans les mêmes conditions deux fois, puis séchés une nuit à température ambiante. 80 mg des culots acétylés sont ensuite solubilisés dans 600  $\mu$ L de  $\text{CDCl}_3$  pour l'analyse RMN.

L'acquisition des spectres RMN est réalisée sur un spectromètre Bruker 600 MHz équipé du logiciel TopSpin 3.1. Les profils 2D obtenus sont calibrés sur les signaux du  $^1\text{H}$  (7,26 ppm) et du  $^{13}\text{C}$  (77,2 ppm) du  $\text{CDCl}_3$ .

### **5 Analyse de la structure des échantillons de biomasse**

#### **5.1 Mesure de porosité par Résonance Magnétique Nucléaire**

Les fragments de biomasse sont immergés dans de l'eau ultra pure pendant 96 h avant d'être analysés par RMN bas-champ à l'aide d'un spectromètre Minispec mq20 (Bruker, États-Unis). Les mesures de décroissance du temps de relaxation  $T_2$  sont effectuées en utilisant une séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) avec une durée d'impulsion  $\tau = 0,1$  ms et une acquisition de 16 000 points. Pour chaque échantillon, 256 scans sont accumulés.

Le traitement des spectres est effectué par traitement continu avec une Transformée de Laplace Inverse. Les distributions sont modélisées à l'aide de lois normales asymétriques, à l'aide d'un logiciel développé spécifiquement pour ces analyses par la plateforme BIBS du centre INRA de Nantes.



## **5.2 Microscopie électronique à balayage à émission de champ**

Des coupes de 60  $\mu\text{m}$  sont réalisées à partir des fragments de biomasse inclus dans le PEG et rincées à  $3 \times 2$  minutes à l'eau ultra pure. Les coupes sont ensuite déshydratées par incubation d'une heure dans l'éthanol, puis dans du *tert*-butanol, avant d'être laissées sous vide une nuit pour permettre de sécher complètement les échantillons.

Les coupes sont ensuite rendues conductrices par dépôt de chrome par pulvérisation cathodique, avant d'être observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL 6700F équipé d'un canon à émission de champ avec une tension d'accélération de 5 kV.

## **5.3 Microscopie électronique à balayage**

Les fragments de biomasse sont coupés à environ 0,5 cm d'une des extrémités et apposés, sans préparation supplémentaire, sur une surface en graphite collée sur un porte-échantillon avec une orientation de  $45^\circ$ . L'échantillon est ensuite inséré dans la chambre d'un microscope électronique à balayage de table Hitachi TM-1000 équipé d'un canon à électron constitué d'un filament en tungstène et soumis à une tension d'accélération de 15 kV.

Les observations sont effectuées sous vide modéré en mode standard à des grossissements de  $\times 150$  et  $\times 300$ .

# **6 Caractérisation des sondes fluorescentes**

## **6.1 Analyse par diffusion statique de la lumière**

Des solutions de sondes fluorescentes à 2 mg/mL dans du tampon  $\text{NaNO}_3$  50mM +  $\text{NaN}_3$  0,02% (m/v) sont préparées et laissées une nuit à température ambiante sans agitation pour permettre la solubilisation des sondes sans altérer leur structure. Les solutions sont ensuite filtrées (PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ ) et 150  $\mu\text{L}$  sont injectés sur un système de chromatographie d'exclusion stérique (SEC). L'élution est réalisée à un débit de 1 mL/min à l'aide d'une solution tampon ( $\text{NaNO}_3$  50mM +  $\text{NaN}_3$  0,02% (m/v)) à  $50^\circ\text{C}$ . Le système SEC est composé d'un dégazeur en ligne DU 4007 (Uniflows Co, Japon), d'un passeur d'échantillons Waters 717 Plus, d'une pompe HPLC Waters 515, d'un four à colonne Waters Column Heater Module, d'une colonne SHODEX SB-805 HQ (8,0  $\times$  300 mm, limite d'exclusion : 4 000 kDa), d'une colonne SHODEX SB 803 HQ (8,0  $\times$  300 mm, limite

d'exclusion : 100 kDa) et d'une colonne SHODEX SB-802.5 HQ (8,0 × 300 mm, limite d'exclusion : 10 kDa). La détection en sortie de colonne est assurée par 3 détecteurs connectés en série : un détecteur UV à barrette de diodes Waters 2996, un détecteur de diffusion de lumière multi angle (MALS) Dawn-Heleos II travaillant à une longueur d'onde de 785,6 nm (Wyatt Technology, États-Unis) et un réfractomètre différentiel Waters 2996 PhotoDiode Array.

Les données sont analysées à l'aide du logiciel Astra 6.1, en utilisant des valeurs de  $dn/dc$  de 0,134 et 0,147 pour les sondes de type dextran et PEG respectivement, telles que fournies par Wyatt Technology.

## **6.2 Analyse par diffusion dynamique de la lumière**

Le rayon hydrodynamique des sondes fluorescentes est mesuré à partir de solutions à 2 mg/mL dans du tampon  $\text{NaNO}_3$  50mM +  $\text{NaN}_3$  0,02% (m/v) à l'aide d'un détecteur de diffusion dynamique de la lumière DynaPro NanoStar, travaillant à une longueur d'onde de 785,6 nm (Wyatt Technology, États-Unis). Les mesures sont réalisées en ligne après élution sur le système de chromatographie stérique, ou directement avec les solutions non éluées disposées dans des cuvettes à usage unique. Pour les mesures en mode cuvette, 20 acquisitions sont effectuées, avec un temps d'acquisition ajusté en fonction de la conformation et de la taille de la molécule.

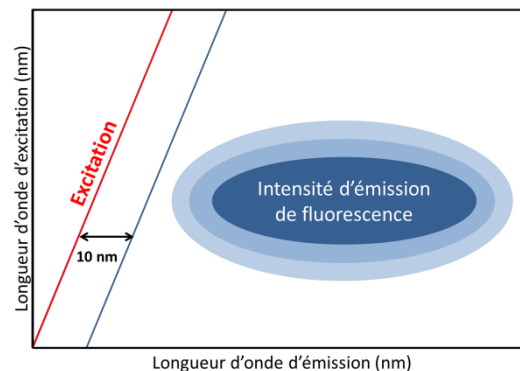
Les données sont analysées à l'aide du logiciel Dynamics 7.1 (Wyatt Technology, États-Unis), en utilisant des valeurs de  $dn/dc$  de 0,134 et 0,147 pour les sondes de type dextran et PEG respectivement, telles que fournies par Wyatt Technology.

## **6.3 Spectroscopie de fluorescence**

Les propriétés spectrales des sondes fluorescentes sont mesurées à l'aide d'un spectrofluorimètre FP8300 équipé d'une lampe au xénon et piloté par le logiciel Spectra Manager II (Jasco, France) couplé avec un module Peltier ETC 815 (Jasco, France) réglé à 25°C.

Des cartes de contour de fluorescence (Figure 27) sont acquises pour des solutions de sondes fluorescentes à une concentration de 0,1% (m/v), avec un balayage des longueurs d'onde d'excitation entre 250 nm et 600 nm et un incrément de longueur d'onde de 1 nm, et une mesure des longueurs d'onde d'émission entre  $\lambda_{ex} + 10$  nm et 650 nm, avec un intervalle de mesure de 0,2 nm. La sensibilité du photomultiplicateur est fixé à 450 V pour toutes les

sondes fluorescentes, en se basant sur les mesures effectuées pour la sonde PEG-rhodamine de 1 kDa, afin d'éviter la saturation du détecteur.



**Figure 27** - Représentation schématique d'une carte de contour de fluorescence.

## 7 Microscopie confocale de fluorescence

### 7.1 Réalisation de coupes pour les observations microscopiques

Pour les observations en microscopie, des coupes transversales de 60  $\mu\text{m}$  sont réalisées à partir des fragments inclus dans le PEG à l'aide d'un microtome Microm HM 360 (Microm, Microtech, France) équipé d'une lame jetable. Les coupes obtenues sont rincées 3  $\times$  2 minutes à l'eau ultra pure afin d'éliminer le PEG résiduel. Le traitement des coupes est ensuite dépendant de l'expérience réalisée.

### 7.2 Observations de l'autofluorescence des parois végétales

Des coupes transversales de 60  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à partir des fragments inclus dans le PEG, lavées puis incubées 15 minutes dans une solution de glycérol 50% à pH 9 pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être montées dans ce milieu entre lame et lamelle.

Les observations de l'autofluorescence des parois sont effectuées par microscopie confocale à fluorescence à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Allemagne) équipé de 3 faisceaux lasers à 405, 488, 552 nm.

Les observations de l'autofluorescence des parois sont effectuées à travers un objectif à immersion de grandissement  $\times 63$  en utilisant l'excitation par le laser à 405 nm réglé à une puissance de 1%. Le filtre acousto-optique (*Acousto-Optic Tunable Filter*, AOTF) est réglé afin de mesurer la fluorescence émise entre 415 et 650 nm à l'aide d'un détecteur hybride

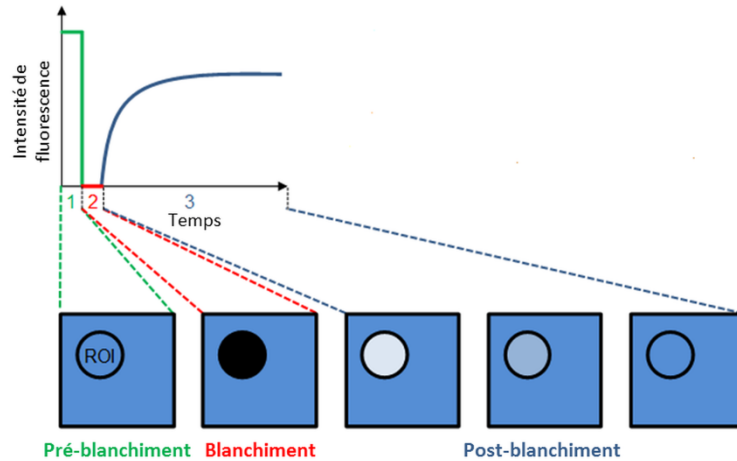
Leica HyD. Des mosaïques d'images de  $2048 \times 2048$  pixels avec une vitesse de scan de 400 Hz sont prises avec un facteur de grossissement  $\times 1$ . Les images obtenues sont traitées à l'aide du logiciel Leica Application Suite X 2.0 (Leica Microsystems, Allemagne).

### 7.2.1 Fluorescence Recovery After Photobleaching

Des coupes de biomasses de  $60\mu\text{m}$  sont incubées dans une solution de sondes fluorescentes à 0,01% (m/v) une nuit à  $20^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans le milieu de sondes fluorescentes, et l'ensemble est scellé avec du vernis à ongles. Les observations sont effectuées au niveau du parenchyme supra-vasculaire pour les échantillons de blé et de miscanthus et au niveau du xylème pour les échantillons de peuplier.

Les expériences de FRAP sont réalisées avec un facteur de grossissement de  $\times 4,5$  et à une vitesse de scan de 1400 Hz, avec des prises d'images de  $128 \times 256$  pixels. Le blanchiment est effectué au niveau d'une région d'intérêt circulaire de  $3\mu\text{m}$  de diamètre centrée au niveau de la lamelle moyenne. Les paramètres d'imagerie utilisés pour chaque expérience sont les suivants (Figure 28) :

- Pré-blanchiment : acquisition de 10 images avec un délai de 51 ms entre chaque image avec une excitation par le laser à 552 nm réglé à une puissance de 1% ;
- Blanchiment : 20 répétitions avec un délai de 51 ms entre chaque image (temps total de blanchiment = 1 s) avec une excitation de la région d'intérêt par les lasers à 488 nm et 552 nm réglés à une puissance de 100% ;
- Post-blanchiment 1 : acquisition de 200 images avec un délai de 51 ms entre chaque image avec une excitation avec le laser à 552 nm réglé à une puissance de 1% ;
- Post-blanchiment 2 : acquisition de 300 images avec un délai de 2 s entre chaque image avec une excitation avec le laser à 552 nm réglé à une puissance de 1%.



**Figure 28** - Les différentes étapes d'une mesure de recouvrement de fluorescence. Adaptée d'après Paës (2014) [333].

Les valeurs de recouvrement de fluorescence  $R(t)$  au sein de la région d'intérêt sont corrigées en utilisant la moyenne d'intensité de fluorescence de 3 régions de référence de même taille que la région d'intérêt et également centrées au niveau de la lamelle moyenne. Ces valeurs sont ensuite normalisées pour chaque image en prenant en compte la moyenne d'intensité de fluorescence de la région d'intérêt avant blanchiment  $I_{pre}$  et la première valeur d'intensité de fluorescence après le blanchiment  $I_0$  grâce au calcul suivant :

$$R(t) = \frac{I_t - I_0}{I_{pre} - I_0}$$

Les données de recouvrement de fluorescence sont ensuite modélisées à l'aide d'une équation à double exponentielle à 4 paramètres  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , et  $d$  à l'aide du logiciel SigmaPlot 12.0 (Systat Software, États-Unis) :

$$R(t) = a \times (1 - e^{-bt}) + c \times (1 - e^{-dt})$$

La fraction mobile FM, exprimée en %, est définie comme la fraction de sondes pouvant se déplacer et contribuant donc au recouvrement de fluorescence correspond à la valeur de recouvrement mesurée au plateau, donc quand  $t$  tend vers l'infini. Elle peut être mathématiquement déterminée par simplification de l'équation précédente :

$$MF = a + c$$

### 7.2.2 Förster Resonance Energy Transfer

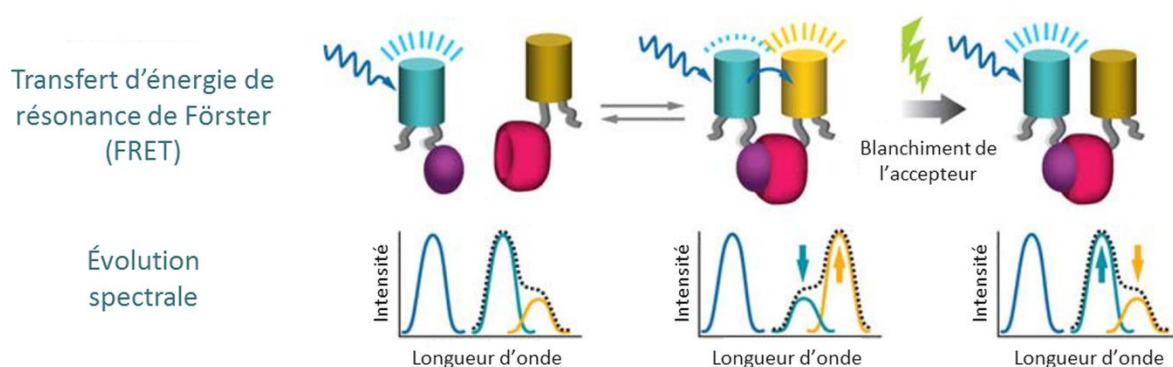
Des coupes transversales de biomasses de 60  $\mu\text{m}$  préparées extemporanément sont mises à incuber dans des solutions de sondes fluorescentes dont la concentration a été calculée de telle sorte que la concentration en rhodamine dans le milieu soit de 1,6  $\mu\text{M}$ . Après une

incubation d'une heure à 20°C à l'obscurité, les coupes sont rincées dans un bain d'eau ultra pure pendant 5 minutes puis montées entre lame et lamelle dans un milieu constitué de 50% de glycérol et de 50% de tampon phosphate à pH7 à 0,01 M, puis le système est scellé avec du vernis à ongles.

Les mesures d'interaction des sondes fluorescentes avec la lignine sont effectuées par microscopie confocale par mesure des interactions de type *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET) entre la lignine, considérée comme le donneur, et la sonde fluorescente étudiée, considérée comme l'accepteur. La mesure de cette interaction se fait par blanchiment de l'accepteur. Le laser à 488 nm est utilisé pour mesurer la fluorescence de la lignine émise entre 500 et 570 nm et le laser à 552 nm est utilisé pour mesurer la fluorescence des sondes émise entre 570 et 700 nm.

Les expériences de FRET sont réalisées avec un facteur de zoom de  $\times 1$ , une vitesse de scan de 400 Hz, une résolution d'images de  $1024 \times 1024$  pixels et les paramètres d'acquisition suivants (Figure 29) :

- Pré-blanchiment : mesure de l'intensité de fluorescence sur les 2 canaux au cours d'une seule acquisition, avec une excitation par le laser à 488 nm réglé à une puissance de 30%, et une excitation par le laser à 552 nm réglé à 1% ;
- Blanchiment : 50 répétitions avec une excitation d'une région d'intérêt mesurant  $60 \times 80 \mu\text{m}$  par le laser à 552 nm réglé à une puissance de 100% ;
- Post-blanchiment : mesure de l'intensité de fluorescence sur les 2 canaux au cours d'une seule acquisition, avec une excitation par le laser à 488 nm réglé à une puissance de 30%, et une excitation par le laser à 552 nm réglé à 1%.



**Figure 29** - Transfert d'énergie par résonance de Förster et impact sur l'intensité de fluorescence des molécules en interaction. Adaptée d'après Fricket *et al.* (2006) [334].

L'efficacité d'interaction des sondes fluorescentes avec la lignine, exprimée en %, est calculée par comparaison de l'intensité de fluorescence de la lignine avant blanchiment  $I_{pre}$  et après blanchiment  $I_{post}$  à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Efficacité de FRET} = \frac{I_{pre}}{I_{post}} \times 100$$





## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**





# **CHAPITRE 1**

## **RÉSUMÉ ÉTENDU**

La récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique constitue, avec le coût relativement élevé des enzymes lignocellulolytiques, le principal obstacle au développement des bioraffineries de deuxième génération. La réalisation préalable de prétraitements destinés à désorganiser la structure de la paroi végétale en modifiant l'agencement des biopolymères est nécessaire pour augmenter le rendement d'hydrolyse. Les nombreuses études menées sur les effets de ces prétraitements ont permis d'identifier de nombreux facteurs impliqués dans le phénomène de récalcitrance des parois. Toutefois, la diversité des prétraitements et des substrats utilisés rend difficile une appréciation globale de l'impact et de l'importance de ces différents facteurs.

Le principal objectif de cet article est de déterminer des marqueurs de la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique qui puissent être généralisés à différents types de biomasses, et d'évaluer leur importance relative sur le rendement de saccharification.

Pour ce faire, nous avons mené une analyse multimodale sur des biomasses d'origines botaniques variées (paille de blé, miscanthus, peuplier) soumis à des prétraitements aux effets contrastés (acide dilué, hydrothermique, liquide ionique et chlorite de sodium) afin de générer un panel d'échantillons aux propriétés chimiques et structurales hétérogènes.

Les expériences de saccharification ont révélé que la délignification par le chlorite de sodium permettait d'obtenir les meilleurs taux de glucose libéré après 96 h. Les autres prétraitements présentent des effets contrastés, notamment le prétraitement au liquide ionique dont l'efficacité est relativement faible sur les échantillons de paille de blé et de peuplier, mais beaucoup plus importante sur le miscanthus.

Les analyses microscopiques des échantillons ont montré des modifications importantes de la morphologie de chacune des biomasses après prétraitement, mais aussi des altérations importantes de la structure des parois. L'observation de l'autofluorescence des échantillons, généralement associée à la lignine dans les tissus matures, a dévoilé une répartition différente du polymère au sein des échantillons prétraités. Une baisse importante de la taille des microfibrilles, ou plus vraisemblablement des agrégats de microfibrilles, a été mesurée après prétraitement pour chacune des biomasses, suggérant un réarrangement des différents polymères pariétaux.

L'étude de la porosité des échantillons par RMN bas champ a confirmé ces modifications de structure. Une augmentation globale de la taille des pores après prétraitement a été détectée pour les échantillons de paille de blé et pour les échantillons de

miscanthus prétraités, sauf pour le prétraité au liquide ionique. Dans le cas du peuplier, seule la porosité inférieure à 30 nm est augmentée après prétraitement.

L'analyse de la composition chimique a révélé une diminution de la teneur en hémicelluloses au sein des échantillons plus importante après le prétraitement à l'acide dilué qu'après le prétraitement hydrothermique et une baisse de la teneur en lignine importante pour les échantillons prétraités au chlorite de sodium. Le prétraitement au liquide ionique n'a que peu modifié la composition des différentes biomasses.

L'analyse de la composition de la lignine par thioacidolyse a dévoilé une baisse de la teneur en sous-unités labiles après l'ensemble des prétraitements à l'exception du prétraitement au liquide ionique. L'étude de la lignine par RMN a montré une diminution de la proportion des liaisons  $\beta$ -O-4' après prétraitement, sauf pour le liquide ionique dont l'effet est contrasté en fonction des biomasses. L'évolution du ratio S/G semble dépendre à la fois de la biomasse et du prétraitement considérés. Toutefois, l'ensemble de ces données suggère la présence d'une lignine plus condensée après prétraitement, résultant probablement de l'effet combiné de la rupture des liaisons  $\beta$ -O-4' et d'une réorganisation des structures résiduelles.

L'étude des corrélations entre l'ensemble des facteurs mesurés et le rendement de saccharification final des différents échantillons a permis de distinguer certains marqueurs de la récalcitrance à l'hydrolyse. Le rôle négatif de la lignine a été confirmé, et la présence de sous-unités G semble induire une récalcitrance plus importante chez l'ensemble des biomasses étudiées. La porosité est également un facteur important probablement impliquée dans la meilleure diffusion des enzymes, et une augmentation des pores de diamètre inférieur à 30 nm corrèle de manière importante avec la libération des sucres. L'influence conjuguée de la lignine et de la porosité semble cohérente, puisque la lignine est connue pour son rôle de remplissage de la nanoporosité. Enfin, l'autofluorescence des parois, liée à la teneur en lignine, mais aussi à son organisation structurale et à son environnement, montre une corrélation négative importante avec le rendement de saccharification de chacune des espèces considérées, et pourrait donc être utilisée de manière générique comme facteur prédictif de l'efficacité d'un prétraitement pour améliorer le rendement d'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique.

**Article soumis dans *Biotechnology for Biofuels*.**

---

## Multimodal analysis of pretreated biomasses highlights generic markers of biomass recalcitrance

Mickaël Herbaut<sup>1</sup>, Aya Zoghلامي<sup>1</sup>, Anouck Habrant<sup>1</sup>, Xavier Falourd<sup>2</sup>, Loïc Foucat<sup>2</sup>,  
Brigitte Chabbert<sup>1</sup>, Gabriel Paës<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fractionation of AgroResources and Environment (FARE) laboratory, INRA, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>2</sup> Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) laboratory, INRA, Nantes, France

Key-words: biomass, recalcitrance, pretreatment, saccharification, physico-chemical characteristics, correlation, fluorescence

### **ABSTRACT**

Plant cell walls' complex structure and composition hamper lignocellulolytic enzymes progression and accessibility to their substrate. Although biomass recalcitrance has been extensively studied and many factors have been proposed to explain the limitations of enzymatic digestibility, the exact mechanisms still necessitate to be further investigated. In order to address this issue, three representative biomass species (wheat straw, miscanthus and poplar) were submitted to standard pretreatments (dilute acid, hot water, ionic liquid and sodium-chlorite) allowing the creation of a set of contrasted samples. These samples were characterised by a large array of techniques including wet chemistry, relaxation and 2D NMR, electron and fluorescence microscopy. The efficiency of the different pretreatments was assessed by measuring the amount of glucose released after a 96h-saccharification, and correlations were determined between the saccharification yield and the different samples' features. The increase in porosity of the plant cell walls showed good correlations coefficients, but the main factors influencing saccharification were related not only to lignin content but also to its structure and composition. The fluorescence intensity of the different samples showed strong correlations with their susceptibility to enzymatic hydrolysis, meaning that fluorescence could be used to easily predict saccharification whatever the biomass species and pretreatments are.

## **BACKGROUND**

Lignocellulosic biomass from plants is a promising alternative to fossil carbon resources as it is the most abundant renewable carbon resource in the biosphere, with an estimated annual production of 10 to 50 billion tons available at a relatively low cost [1]. Dedicated crops such as poplar or miscanthus, and agricultural wastes such as wheat straw can be transformed to produce the entire range of compounds that are currently derived from petrochemistry without directly competing with the food industry via the valorisation of the plant cell walls' components [2]. Cellulose and lignin are the main polymer of the plant cell walls and account for 50% and 30% of the terrestrial carbon in the biosphere respectively [3, 4]. Cellulose fibrils are embedded in a matrix of hemicelluloses and lignin that are covalently linked and provide strength, mechanical support and protection to the plant cell wall [5]. The complex composition and the structural organisation of these biopolymers hinder their efficient valorisation through enzymatic hydrolysis, a phenomenon known as biomass recalcitrance [6-8]. Many factors have been proposed as critical to enzymatic hydrolysis of the plant cell walls, such as lignin and hemicelluloses contents, cellulose crystallinity and pore size [9, 10]. Pretreatments are thus a mandatory step in order to facilitate enzymes access to their substrate by disorganising the biopolymers network [11, 12]. Many pretreatment processes with contrasted effects have been developed in order to enhance the subsequent enzymatic digestibility. Dilute acid (DA) pretreatment is considered as one of the promising and leading pretreatment methods. DA mainly hydrolyses and removes hemicelluloses from the plant cell walls, making cellulose more accessible while producing lower amounts of fermentation inhibitors (such as furfural and hydroxymethylfurfural) than concentrated acid pretreatments [6, 12]. Hot water pretreatment (HW) is also considered as a relevant green process as it uses only water heated under pressure instead of chemical or solvents that would need to be recovered [12, 13]. It affects all plant cell wall fractions that are partially hydrolysed in the reaction medium, while the minor amount of solubilised lignin can undergo condensation and redeposition onto the fibres surface [6]. A relatively new pretreatment method is the use of ionic liquids (ILs) which are green solvents offering a selective fractionation of the plant cell wall compared to other conventional pretreatments [12]. ILs are able to dissolve large amount of cellulose, but also lignin in relatively mild conditions [6], and they have also been used to dissolve the whole lignocellulosic complex [14, 15]. Various ILs have been tested for biomass pretreatment, and it has been shown that those containing imidazolium cations are more efficient for solubilising lignin that mostly remains in the IL after biomass precipitation

during the regeneration step [14]. The recovered biomass is more prone to enzymatic hydrolysis, as cellulose is more porous and more essentially amorphous [12, 14, 15]. Acid-chlorite delignification (CHLO) originally developed by Wise *et al.* [16] has long been used in the paper industry as it allows the removal of lignin from the plant cell wall, but cellulose and hemicelluloses are also partially degraded depending on the biomass species [17]. However, even if acid-chlorite delignification is still the most popular and established laboratory method for the removal of lignin from biomass [18], it is unlikely that this process would ever be upscaled because of the high toxicity of the sodium chlorite.

All these pretreatments have been widely studied on various biomass species with different pretreatment conditions. Overall, it can be difficult to understand exactly how plant cell wall modifications induced by pretreatments impact enzymatic hydrolysis and more importantly, which structural and chemical features can explain the recalcitrance of lignocellulose. To address this issue, we have applied contrasted pretreatments (DA, HW, IL, CHLO pretreatments) to three representative biomass species, namely wheat straw and miscanthus which are typical grass species and poplar as a representative hardwood species, in order to generate a set of samples with different plant cell walls' structure and composition. A multimodal analysis of the samples was carried out by applying microscopy, wet chemistry and spectroscopy techniques in order to evaluate the changes of morphology, structure and chemical composition induced by the different pretreatments. The data obtained were then scrutinised in order to determine the influence of biomass features on the final saccharification yield.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant materials**

Wheat straw (*Triticum aestivum*) was grown in Champagne-Ardenne (France) and harvested at grain maturity stage. Internode 3 was isolated and cut in 2 cm-long fragments that were then halved in the longitudinal axis using a disposable blade. Miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) was planted on experimental plots in the INRA site of Estrées-Mons (France) and late-harvested 2 years after planting. Basal stem region (Internode 4) was cut in fragments of  $2 \times 0.3 \times 0.1$  cm, and the rind was isolated from the pith using a razor blade. Poplar (*Populus nigra x deltoides*) was cultivated on experimental plots in Estrées-Mons



(France) and harvested 2 years after planting. Fragments  $2 \times 0.6 \times 0.2$  cm in size were cut from the middle region of the main stem using a razor blade.

### **Biomass pretreatments**

#### **Dilute acid and hot water pretreatments**

Dilute acid (DA) and hot water (HW) pretreatments were performed on biomass fragments in mineralisation bombs equipped with Teflon cups (Parr) using a 2% (v/v) sulfuric acid solution or deionised water respectively [19]. Pretreatments were carried out at a ratio of 1:30 (500 mg of biomass for 15 mL sulfuric acid or deionised water for the DA and HW pretreatments respectively) using an oil bath to keep the fragments in the following conditions: 170°C for 20 minutes for the DA pretreatment, 180°C for 60 minutes for the HW pretreatment. The fragments were then cooled down in ice and thoroughly washed using deionised water and a 50% ethanol solution.

#### **Ionic liquid pretreatment**

Ionic liquid (IL) pretreatment of the biomass fragments was performed using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate with a biomass loading of 6% (m/v). Pretreatments were carried out using mineralisation bombs equipped with Teflon cups (Parr). Samples were kept at 130°C for 40 minutes in an oil bath. The fragments were then cooled down in ice, regenerated in deionised water at 4°C, filtered using 20 volumes of deionised water and thoroughly washed in deionised water and 50% ethanol.

#### **Sodium-chlorite pretreatment**

Sodium-chlorite-acetic-acid delignification (CHLO) was performed based on the procedure described previously [16]. Pretreatments were carried out on 1 g of biomass fragments using 0.15 mL of acetic acid and 1.25 g of sodium chlorite added to 40 mL of water for 1h at 70°C. These 1h-incubations were repeated a different number of times for wheat straw, poplar and miscanthus fragments in order to have a homogeneous delignification rate based on fragments bleaching. Fragments were then thoroughly washed using deionised water until water pH remains neutral.

### **Enzymatic hydrolysis**

Saccharification experiments were performed on the different biomass fragments using the Cellic® CTec 2 cocktail kindly provided by Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark). Cellulase activity was measured (157.3 FPU/ml) by the filter paper method using Whatmann No. 1 filter paper as standard substrate. Enzymatic hydrolysis were performed in a 0.1 M citrate buffer at pH 4.8 containing 0.02% sodium azide with a biomass loading of 2% (w/v) and an enzyme loading of 90 FPU/g of biomass. The glucose released after 96 h of reaction was measured by anionic exchange chromatography. Samples of the reaction medium were filtered (PTFE, 0.45 µm) prior to injection on a 4 × 250 mm CarboPac PA-1 anion exchange column (Dionex, Sunnyvale, United States) maintained to 22°C. Elution was performed at a flow rate of 1.2 mL/min using the following conditions: A eluent (MilliQ water) 100% for 40 min, then A 100-0% with B eluent (300 mM sodium acetate and 300 mM sodium hydroxide in MilliQ water) 0-100% for 15 min, then C eluent (300 mM sodium hydroxide in MilliQ water) for 10 min, and finally A 100% for 5 min. Detection was performed with the addition of a 300 mM sodium hydroxide solution at a flow rate of 0.4 ml/min using a PAD-2 pulsed amperometry detector (Dionex, Sunnyvale, United States), maintained at 30°C. Monosaccharides were quantified using both 2-deoxy-D-ribose as an internal standard and D-fucose, D-arabinose, L-rhamnose monohydrate, D-galactose, D-glucose, D-xylose, D-mannose, D-galacturonic acid monohydrate and D-glucuronic acid as standard solutions for calibration.

### **Samples observations**

#### **Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Fragments' overall morphology was investigated using an environmental tabletop electron scanning microscope Hitachi TM-1000 in low-vacuum mode without sputter coating. The transverse end surface of the samples was analysed using smaller fragments cut to a size of 0.5 cm placed on a graphite support with an inclination of 45°.

#### **Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM)**

60 µm-thin sections were coated with chromium in a sputter coater and examined with a JEOL 6700F field emission scanning electron microscope using an accelerating voltage of 5 kV. Images were analysed using the Image J software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) to

determine the Feret diameter of the observed fibrillary structure. Ten fibrils were measured on two different images for each sample and values were averaged for comparison.

### **Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)**

Plant cell walls' morphology as well as samples' fluorescence was assessed using a fluorescence confocal microscope Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) equipped with 63× oil-immersion objective, a 405 nm laser line and Leica HyD hybrid detector. 60µm-thin sections were infiltrated in 50% glycerol in 0.01 M phosphate buffer at pH 9 for 15 minutes prior to mounting in the same medium on a microscope slide as previously described [20]. Images were acquired 15 µm underneath the surface of the sections with a resolution of 2048 × 2048 pixels, a scan speed of 400 Hz, a numerical aperture of 1.4 and a ×1 zoom factor. The laser power was set to 20% and fluorescence emission was detected using the HyD detector in counting mode. The Acousto-Optic Tunable Filter was set to select fluorescence emission from 415 nm to 650 nm during measurements. Images were treated using the Leica Application Suite X 2.0 (Leica Microsystems, Germany). Fluorescence intensity measurements were repeated 5 times for each samples in regions of interest with a diameter of 3 µm centred on the plant cell walls, and values were averaged for comparison.

### **Biomass structural and compositional analysis**

#### **Low-field nuclear magnetic resonance relaxation measurements**

Fragments' porosity was assessed by low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxation measurements. 1 cm-long biomass fragments were soaked in water for 96 h prior to LF-NMR analysis using a Minispec mq20 spectrometer (Bruker) operating at 0.47 T (20 MHz proton resonance frequency) and equipped with a thermostated ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ )  $^1\text{H}$  probe. Fragments were packed in 10 mm diameter NMR tube to reach 1 cm height and left 10 min in the spectrometer for temperature stabilisation at 4°C. The transverse ( $T_2$ ) relaxation curves were acquired using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) sequence. The 180° pulse separation was 0.2 ms, 16,000 even echoes were collected and the acquisition was 256 scans with a recycle delay of 7 s resulting in a total acquisition time of about 45 min. An inverse Laplace transformation (ILT) was applied to convert the relaxation signal into a continuous distribution of  $T_2$  relaxation components. For this purpose, a numerical optimisation method was used by including non-negativity constraints and L1 regularisation and by applying a convex optimisation solver primal-dual interior method for convex objectives (PDCO) [21,

22]. Similar NMR acquisition and data treatment protocols were implemented on controlled pore glass samples of known diameters (Sigma Aldrich; pore size: 8, 25, 50 and 100 nm). A linear relationship ( $R^2 = 0.998$ ) between  $T_2$  values and pore diameter was thus established and used to convert  $T_2$  distributions of biomass fragments into pore size distributions.

### **Polysaccharides analysis**

The overall fragments' sugar content was assessed by acid hydrolysis as described previously [19]. Samples were milled to a granulometry of 80  $\mu\text{m}$  and then submitted to a two-step  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hydrolysis: 125  $\mu\text{L}$  of a 12 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution were added to 10 mg of biomass samples for 2h at room temperature under stirring, then acid was diluted to 1M for another 2 h-incubation at 100°C. Hydrolysed monomeric sugars were quantified by HPAEC-PAD as described previously.

### **Nitrogen content determination**

Milled samples were oven-dried overnight at 80°C, and 5 to 7 mg were weighted in tin capsules. Capsules were analysed using a EURO EA elemental analyser (Eurovector, Milan, Italy) equipped with a thermal conductivity detector. The samples were fully oxidised and nitrogen was converted into  $\text{N}_2$  and quantified using the Eager 200 software (Carlo Erba, Italy). Proteins amount in the plant cell walls was then calculated by applying a nitrogen-to-protein conversion factor of  $\times 6.25$  [23].

### **Klason lignin content**

The acid insoluble lignin content of the biomass fragments was quantified as described previously [24]. Milled samples (200 mg) were oven-dried during 1 h at 105°C and cooled down in a desiccator before weighing in order to determine their moisture content. Samples were then submitted to an acid hydrolysis by mixing with 2 mL of a 12 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution for 2 h at room temperature. The acid solution was then diluted to a concentration of 2 M by addition of deionised water before an incubation of 3 h at 100°C. The solid fraction was recovered, thoroughly washed and oven-dried at 105°C to a constant weight (weight A). The crucibles containing the dried samples were then calcined in a muffle at 550°C for 4 h and cooled down to room temperature in a desiccator before weighing (weight B). The insoluble lignin as well as the ash content was gravimetrically calculated by subtracting weights A and B from the initial biomass amount respectively.

### **Thioacidolysis**

The monomer composition of the labile ether-linked lignin fraction was determined by thioacidolysis as described by Lapierre *et al.* [25]. Milled samples (10mg) were incubated in a solution of ethanethiol / BF<sub>3</sub> etherate / dioxane (2.5 / 10 / 87.5 v/v/v) with the addition of 1 mL of a 250 µg/mL tetracosone solution as an internal standard. Alkyl aryl ether linkages disruption reaction was carried out at 100°C for 4 h, then the reaction mixture was cooled down to room temperature and extracted 3 times using 25 mL of dichloromethane. Lignin subunits were then silylated before quantification using a gas chromatographer equipped with a fused silica capillary DB1 column (30 m × 0.3 mm) (J&W Scientific©) and flame ionisation detector. The temperature gradient was 160-280°C at 2°C.min<sup>-1</sup>.

### **2D HSQC NMR analysis**

Lignin composition as well as monomer linkages was determined by 2D HSQC NMR analysis [26]. Milled samples (100 mg) were dissolved in 3.6 mL of DMSO and 1.8 mL of N-methylimidazole, and acetylated by addition of acetic acid for 4 h at room temperature. Samples were then precipitated in water, and centrifuged at 18,600 g for 10 min (Beckman JLA-10.500 rotor). The pellets were washed twice and centrifuged again as described above. Acetylated samples (80 mg) were dissolved in 0.6 mL CDCl<sub>3</sub> in a 5 mm NMR tube. NMR spectra were acquired and treated as described previously [24].

### **Data and statistical analysis**

Wet chemical analyses experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as mean ± standard deviation. An analysis of variance (ANOVA) was realised on the obtained values followed by a Tukey test for comparison with the corresponding untreated samples with a significance level of probability set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the SigmaPlot 12.0 software (Systat Software, Chicago, USA).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Selection of the pretreatments conditions**

The different pretreatments conditions were selected for the three biomass species regarding two important considerations: pretreatments had to be efficient enough to induce an increase in sugar release during enzymatic saccharification while preserving structural integrity

thereby allowing samples sectioning for photon and electron microscopic analyses. Focus was made on residence time and temperature of the different pretreatment processes, considered as the most impacting parameters [27, 28].

The DA pretreatment was performed at 170°C for 20 minutes with a 2% acid concentration according to previous works [19]. These conditions are in accordance with literature (temperatures between 160 and 230°C and acid concentration in the range of 2-5%) [13]. HW pretreatments are generally carried out at a temperature comprised between 150°C and 260°C [29]. The HW pretreatment conditions were adapted from previous works on poplar [30], and it was performed at 180°C for 60 minutes. Above this temperature, the plant cell wall structure was too disrupted to be imaged, especially for wheat straw samples. The IL 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate was selected due to its ability to more efficiently pretreat big particles compared to other imidazolium-based IL [31]. Time (40 minutes) and temperature (130°C) were selected based mostly on miscanthus fragments whose overall structure showed the most important disruption. The number of incubation steps during the CHLO pretreatment was adjusted for each biomass species in order to have a homogeneous delignification of the fragments: 3 × 1 h for the wheat straw fragments, 6 × 1 h for the poplar fragments and 8 × 1 h for the miscanthus fragments. Weight losses induced by the different pretreatment are displayed in Table 1.

**Table 1.** Weight losses induced by the different pretreatments on each biomass species.

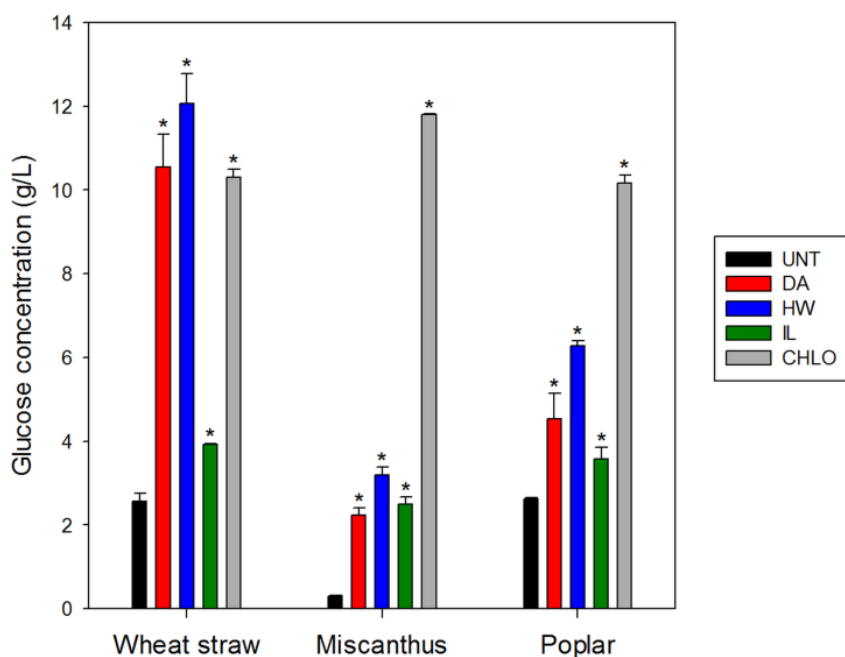
Weight losses are expressed in percentage of initial dry matter, as mean ± standard deviation.

Biomass	Pretreatment			
	DA	HW	IL	CHLO
Wheat straw	40.9 ± 1.4	35.5 ± 0.7	10.4 ± 1.2	20.3 ± 1.0
Miscanthus	26.8 ± 2.5	25.5 ± 0.9	1.5 ± 0.4	22.0 ± 3.0
Poplar	35.3 ± 3.0	31.4 ± 1.0	9.2 ± 1.3	22.9 ± 2.2

Overall, weight losses were more important for wheat straw and less important for miscanthus samples. The most important weight losses were observed after DA and HW pretreatments, while IL pretreatments induced the smallest matter removal, especially on miscanthus samples with only 1.5% loss. CHLO delignification removed similar amount of matter for each biomass species.

### Enzymatic hydrolysis of the biomass samples

Pretreatments efficiency was assessed by measuring the amount of glucose released after 96 h of enzymatic hydrolysis (Figure 1). Saccharification experiments were performed with an enzyme loading of 90 FPU/g of dry matter. This value is much higher than standard conditions usually found in literature (from 5 to 20 FPU/g of dry matter) [32-34], but it is rationale based on the fact that substrates are fragments with much lower accessible surface in comparison to milled samples.



**Figure 1.** Glucose concentration in the reaction medium after the 96 h enzymatic hydrolysis of the different biomass samples. Error bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between pretreated samples and the corresponding untreated sample. UNT: untreated, DA: dilute-acid pretreated, HW: hot water pretreated, IL: ionic liquid-pretreated, CHLO: sodium chlorite-pretreated.

Cellulose-to-glucose conversion after 96 h was similar for the untreated wheat straw and poplar samples whereas the enzymatic hydrolysis of miscanthus samples was much less efficient. All pretreatments induced a statistically significant increase in glucose release after saccharification for each biomass. CHLO was the most efficient pretreatment and allowed reaching a 4-fold higher glucose release for wheat straw and poplar samples, and even a 40-fold enhancement of glucose release for miscanthus samples. DA always induced a slightly smaller improvement of saccharification efficiency compared to HW pretreatment and the

degree of improvement of the final glucose production for this two pretreatments depended on the biomass species. IL pretreatment allowed small but significant increases in glucose release from wheat straw and poplar samples, but it was more efficient in improving saccharification of miscanthus samples. These differences in saccharification efficiency, regarding both pretreatments and biomass species influence, highlighted the contrasted susceptibility of the samples to enzymatic hydrolysis.

### **Morphological changes of the biomass samples after pretreatments**

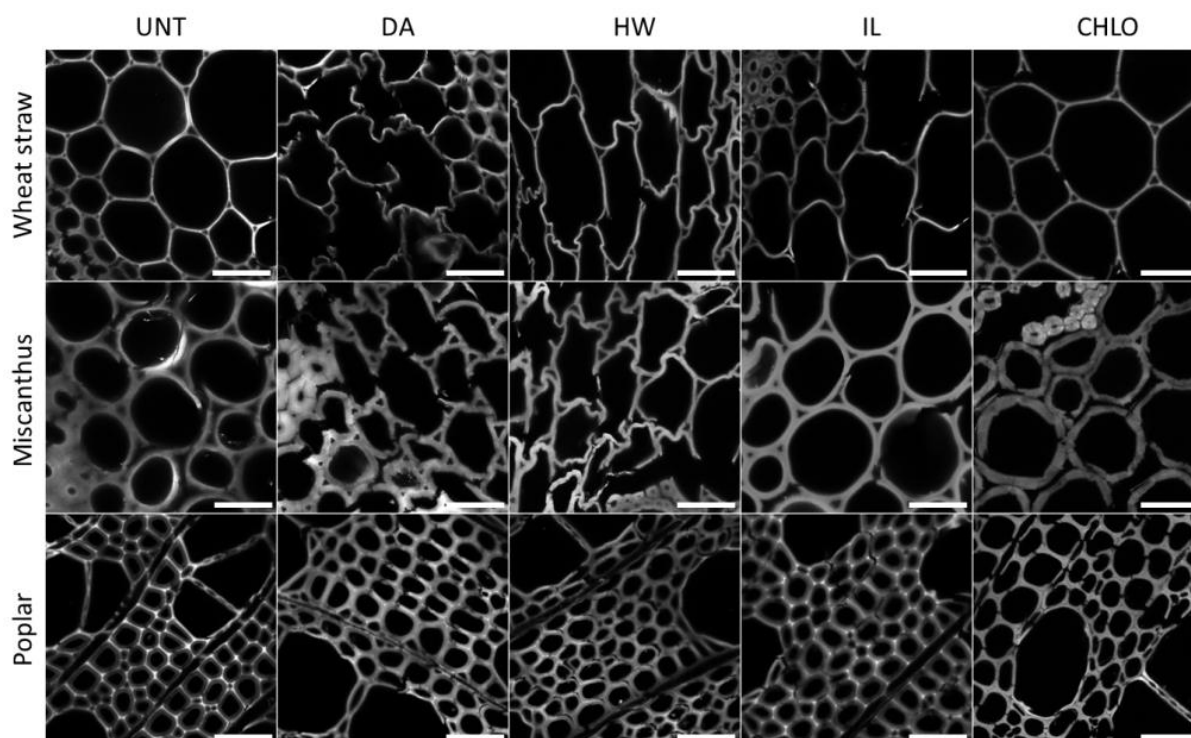
Changes of the overall morphology of the samples were observed after the different pretreatments, especially for the less rigid wheat straw samples that appeared shrivelled, suggesting some important structural modifications (Figure S1). The most notable difference was the change of colour of the pretreated samples, which is likely to be related to some modifications of lignin structure [35]. SEM images confirmed the structural alterations induced by pretreatments (Figure S2). Pretreated wheat straw samples exhibited smaller cell structure than untreated samples, while some decohesion of outer structure of the samples could be observed for the other biomass species and especially for pretreated poplar.

### **Structural characterisation of biomass cross-sections**

#### **Lignin distribution within the plant cell walls**

The structure of the plant cell walls was studied using fluorescence confocal microscopy to image 60- $\mu\text{m}$  thick transverse sections of the samples. Acquisitions were carried out with an excitation light of 405 nm allowing the observation of the autofluorescence of the cell walls (Figure 2). Autofluorescence in mature plant cell walls mainly originates from lignin, with very little or no contribution from the constitutive polysaccharide [36]. It can thus be assumed that autofluorescence gives an overview of lignin distribution within the plant cell walls.



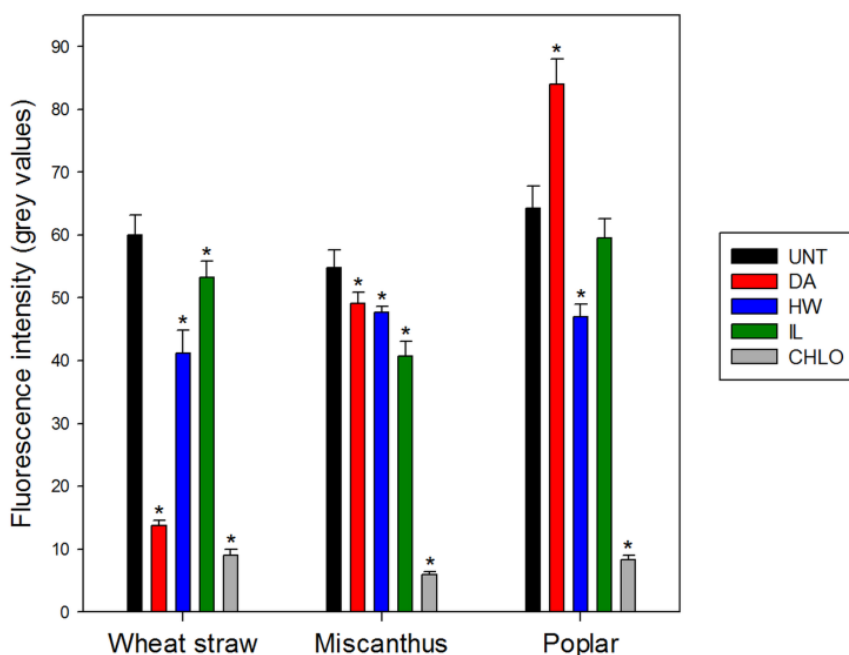


**Figure 2.** Confocal fluorescence images of wheat straw, miscanthus and poplar sections before and after pretreatments. Images were taken in the interfascicular parenchyma region for wheat straw and miscanthus samples, and in the xylem region for poplar samples using the same laser and detector settings. Grey scale values were optimised for each image to overcome visibility issue due to differences in fluorescence intensity. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ .

Lignin distribution of both untreated wheat straw and miscanthus sections was uniform. After DA and HW pretreatments, the parenchyma cell walls of these biomass species were highly deformed, indicating some important structural changes, while the more lignified sclerenchyma and vascular bundles were less impacted. This observation could also be made for IL-pretreated wheat straw to a lesser extent, whereas IL-pretreated miscanthus retained its overall structure. After CHLO delignification, the cell walls of the miscanthus sections appeared disjoined, likely because of the removal of lignin from the middle lamella. The autofluorescence pattern of the poplar cell walls was modified after pretreatments. While light was mainly emitted from the cell corners and the middle lamellae in untreated poplar section, the fluorescence distribution became more uniform after DA, HW and CHLO pretreatment, which could be due to important lignin redistribution inside the plant cell walls. Selig *et al.* proposed that lignin is fluidised during a pretreatment performed in neutral or acidic conditions above 120°C, and is then able to move among the plant cell walls matrix to redeposit on its surface [37]. It is then likely that lignin underwent some

condensation/repolymerisation reactions and redeposited more homogeneously in the plant cell wall. Interestingly, the lignin distribution was retained after IL pretreatment, although ILs are capable of partially removing lignin [14]. It is likely that lignin distribution was not altered efficiently due to the complex nature of the fragments. However, some disruptions between adjacent cell walls could be observed in the IL pretreated poplar which might result from a weakening of the structure of the middle lamella.

The fluorescence intensity of each sample was quantified by measuring the mean grey values in  $3 \times 3 \mu\text{m}$  circular regions of interest centred on the plant cell walls (Figure 3).



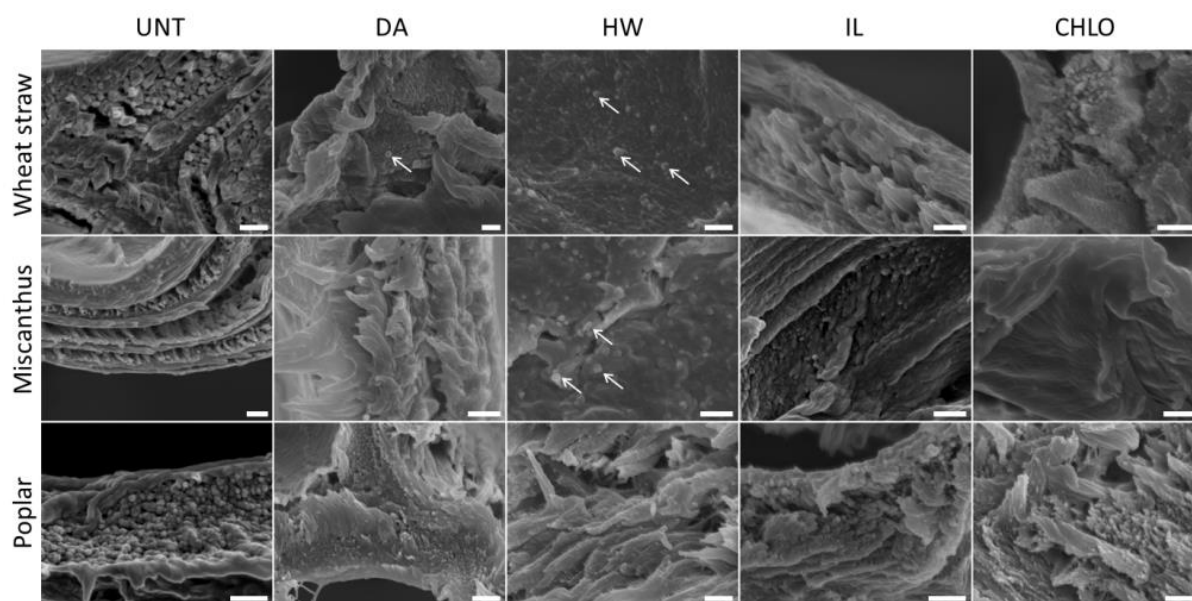
**Figure 3.** Fluorescence intensity (in grey values) of the untreated and pretreated biomass samples measured by fluorescence confocal microscopy. Measurements were performed in 5 different regions of interest, with the same laser and detection settings for all samples. Error bars indicate standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences between a pretreated sample and its corresponding untreated sample.

The fluorescence intensities of the three untreated biomass samples were similar with mean values around 55-65. DA pretreatment had contrasted effect on the fluorescence intensity depending on the biomass species. It induced a huge decrease in light emission in wheat straw samples and a more moderate reduction in miscanthus samples, while fluorescence intensity increased in DA-pretreated poplar. Fluorescence intensity decreased significantly in all HW-pretreated samples. For IL-pretreatment, a significant decrease was observed for wheat

straw and miscanthus samples compared to untreated samples, but not for poplar pretreated samples ( $p = 0.261$ ). Fluorescence intensity was greatly decreased after CHLO pretreatment for all biomass species. The evolution of fluorescence caused by the pretreatment processes seemed to depend both on the performed pretreatment and on the considered biomass species. However, a decrease in fluorescence intensity was observed for almost all pretreated samples, especially after CHLO pretreatment. These results show that fluorescence intensity of the plant cell wall seems to be related to the amount of lignin, but other parameters such as lignin composition and/or lignin interaction with polysaccharides must be involved as well.

### FE-SEM observations of the sections

In order to gain more details on the structural changes of the samples, 60  $\mu\text{m}$ -thick sections of the different fragments were prepared and observed using Field-Emission Scanning Electron Microscopy (Figure 4).

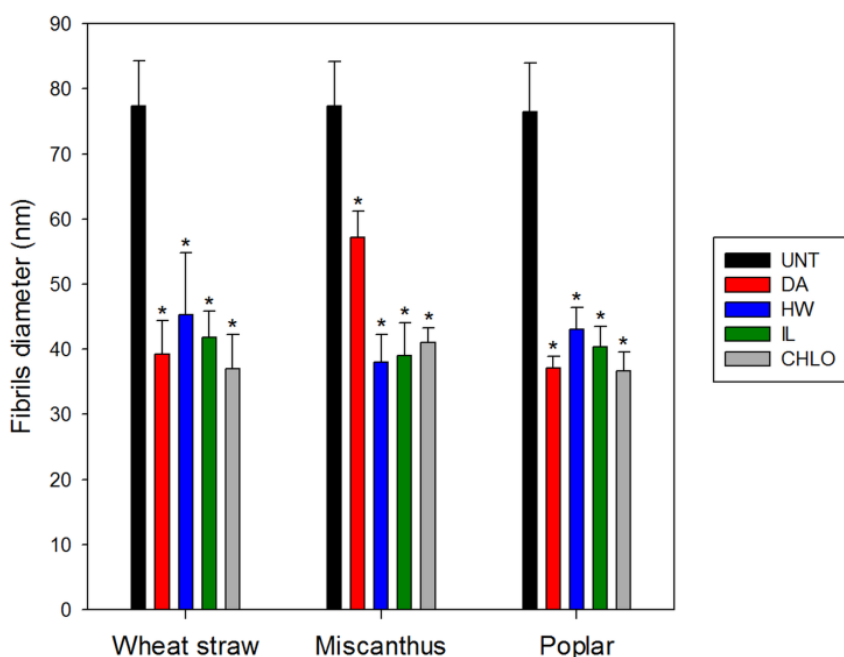


**Figure 4.** Plant cell walls' structure of the different fragments observed by FE-SEM. Scale bars: 500 nm.

Sections made from the untreated samples allowed the observations of the different layers of the cell walls composed of fibrillary structures. After pretreatments, these layers became less clearly visible. Moreover, pretreated plant cell walls were less resistant to sectioning, and some parts of the samples were folded up by the knife passage. In DA pretreated samples, some layers remained visible in all sections while observations were more complicated for

HW-pretreated samples, as plant cell walls were completely folded up during cutting of wheat straw and miscanthus samples. Nevertheless, some structures displaying bigger diameter (100 to 200 nm) compared to the surrounding fibrils could be observed (Figure 4, white arrows). It is likely that they were lignin droplets that can be produced during pretreatment performed under neutral or acidic conditions at and above 130°C [37]. Droplets of similar sizes have been observed after DA pretreatments of 2.5 cm-long miscanthus fragments [38] and HW pretreated wheat straw fragments [39]. CHLO pretreatment also greatly impacted layers structure while IL pretreatment seemed to have a lower impact on cell walls' overall morphology.

Macrofibrils diameter was measured and averaged in order to assess the impact of the different pretreatments on plant cell walls' organisation (Figure 5).



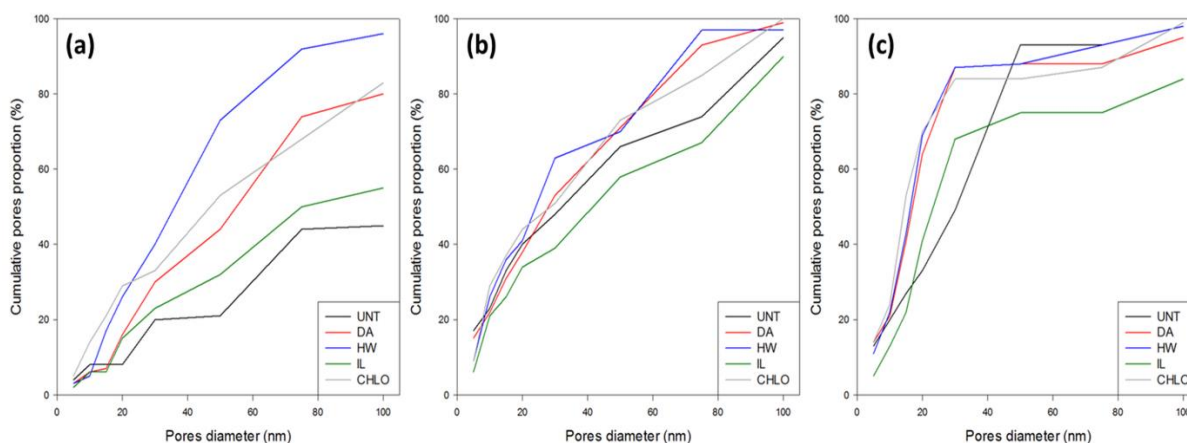
**Figure 5.** Macrofibrils diameter in untreated and pretreated biomass samples measured based on FE-SEM observations. Error bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences between a pretreated sample and its corresponding untreated sample.

The observed fibrillary structures displayed a similar diameter in untreated samples around 80 nm. Macrofibrils with diameters of 16 nm and 20 nm have been observed in poplar [40] and ginkgo [41] secondary cell walls respectively based on FE-SEM imaging. It is then likely that the fibrillary structures visible in the cell wall layers were aggregates of macrofibrils. All

pretreatments induced a reduction of the size of these aggregates. For almost all pretreated samples, the measured diameter was around 35-45 nm, which corresponded to almost half the size of the initial aggregates. Only DA-pretreated miscanthus samples displayed a lesser reduction of these structures sizes, with a diameter of 57 nm. This decrease in size of some microstructures of the plant cell walls after pretreatments is likely to induce an increase in accessible surface area of cellulose that might partially explain the improvement in saccharification efficiency [10].

### Evolution of samples' porosity

As the different microscopy techniques used to image the samples showed important changes of the plant cell wall structure, the modifications of porosity induced by the pretreatments was also investigated. The proportions of pores in different porosity ranges were measured using NMR analysis of the relaxation time of water absorbed within the samples. NMR was selected instead of others techniques such as nitrogen adsorption or mercury porosimetry as most of these techniques require drying the substrate prior to analysis, which might be responsible for an irreversible collapse of pores [42]. Moreover, analysing porosity in aqueous conditions allowed working in similar conditions as those of enzymatic hydrolysis. The proportions of pores between 5 and 100 nm are displayed in Figure 6.



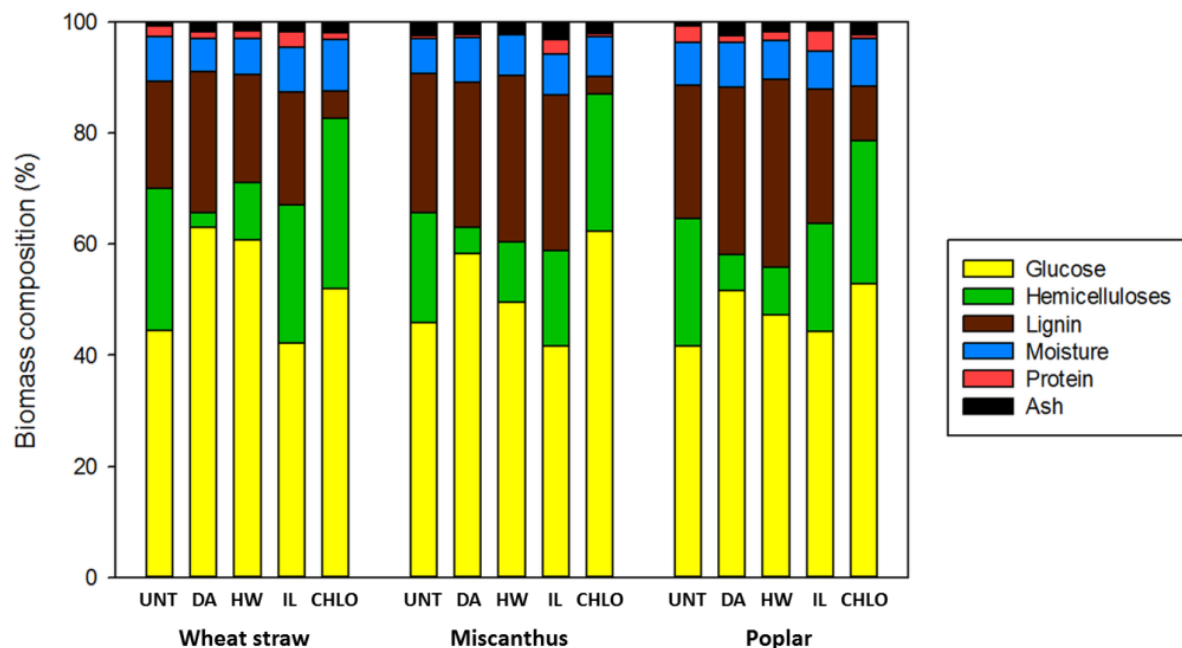
**Figure 6.** Cumulative pore size distribution of untreated and pretreated samples. Pores proportions are expressed as a cumulative percentage of the overall samples' porosity. (a) wheat straw, (b) miscanthus and (c) poplar.

Untreated samples displayed important differences in their porosity pattern. While wheat straw showed a low amount of small pores with only 45% of the pores having a size below

100 nm, almost all pores sizes were comprised below this threshold for untreated poplar and miscanthus samples. DA, HW and CHLO pretreatments all induced an increase in the proportion of pores with a size of 10-15 nm and more compared to the untreated samples. An increase in pore diameter had already been observed using NMR techniques in milled poplar after DA pretreatment [43]. The impact of IL pretreatment depended on the biomass species. Wheat straw pretreated samples exhibited a higher proportion of pores with a size comprised between 15 and 100 nm after pretreatments, while the porosity of miscanthus was decreased by the pretreatment process. IL-pretreated poplar porosity was also lowered, except for pores on the range 20-30 nm. An increase in the porosity above 10 nm is likely to allow a better penetration and diffusion of enzymes, considering the nominal diameter of 5.1 nm representative of the size of cellulases [44], resulting in a higher glucose release, but this factor must be connected with other structural and chemical parameters [10, 45]

### **Chemical composition**

In order to better understand the structural changes induced by the different pretreatments, and especially the changes observed in lignin deposition, the chemical composition of the samples was investigated. Monomeric sugars composition and lignin content were analysed to quantify the main fractions of the plant cell walls. Moisture, protein and ash contents were also measured (Figure 7).



**Figure 7.** Chemical composition of the untreated and pretreated biomass samples. Compositions are expressed as weight percentages (% w/w) of the dry biomass amount.

The glucose content of both untreated wheat straw and miscanthus samples was around 45% while it was determined to be 40% in the untreated poplar samples. DA pretreatment induced a decrease in hemicelluloses content for all biomass species, as expected [6], which was responsible for an increase in the relative glucose and lignin contents. Similar results were obtained with the HW-pretreated samples, but with a lower decrease in the hemicelluloses content. The glucose content was highly increased up to 61% in the HW-pretreated wheat straw samples whereas the lignin content remained unchanged. For miscanthus and poplar HW-pretreated samples, the increase in glucose content was lower (from 46% to 49% and from 42% to 47%, respectively) while lignin content increased for both biomass species (from 25% to 29% and from 24% to 33%, respectively). It is likely that lignin was partially removed from the HW-pretreated wheat straw samples while it remained in the poplar and miscanthus samples. It is noteworthy that miscanthus reacted in the same manner as poplar and displayed differences with wheat straw whereas these two biomass species belong to the same family. The IL pretreatment slightly impacted the chemical composition of the three biomass species, with a small decrease of the hemicelluloses content, which is consistent with the small weight losses observed after pretreatment (Table 1). This is interesting because ILs are known to partially remove lignin and hemicelluloses while almost all the initial cellulose can be recovered within the regenerated biomass [14]. It is likely that the physical state of the

samples (unmilled fragments), hampers the removal of these fractions that remain inside the plant cell walls, but with a modified structure more favourable to enzymatic hydrolysis. This steric hindrance would also explain the small changes in fluorescence pattern for IL-pretreated samples. This effect was more visible for IL-pretreated poplar, whose fluorescence was still principally emitted from the middle lamella while it was more homogeneous for the other pretreated poplar samples (Figure 2). CHLO pretreatment induced a decrease in lignin content for the three samples, resulting in an increase in the relative amount of glucose and hemicelluloses.

The effect of the different pretreatments on biomass digestibility was estimated by measuring the proportion of the initial glucose content that was released in the reaction medium during the enzymatic hydrolysis (Table 2).

**Table 2.** Saccharification yield of the different biomass samples. Glucose yield after the 96 h enzymatic hydrolysis are expressed as a percentage of the initial glucose content. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

Biomass	Pretreatment				
	UNT	DA	HW	IL	CHLO
Wheat straw	29.48 $\pm$ 0.49	89.44 $\pm$ 2.86	97.18 $\pm$ 1.91	45.49 $\pm$ 0.83	97.76 $\pm$ 1.61
Miscanthus	3.27 $\pm$ 0.01	21.91 $\pm$ 1.70	27.75 $\pm$ 0.88	29.40 $\pm$ 2.15	93.02 $\pm$ 1.46
Poplar	29.93 $\pm$ 0.68	38.49 $\pm$ 1.35	59.20 $\pm$ 0.65	39.68 $\pm$ 1.17	92.53 $\pm$ 2.23

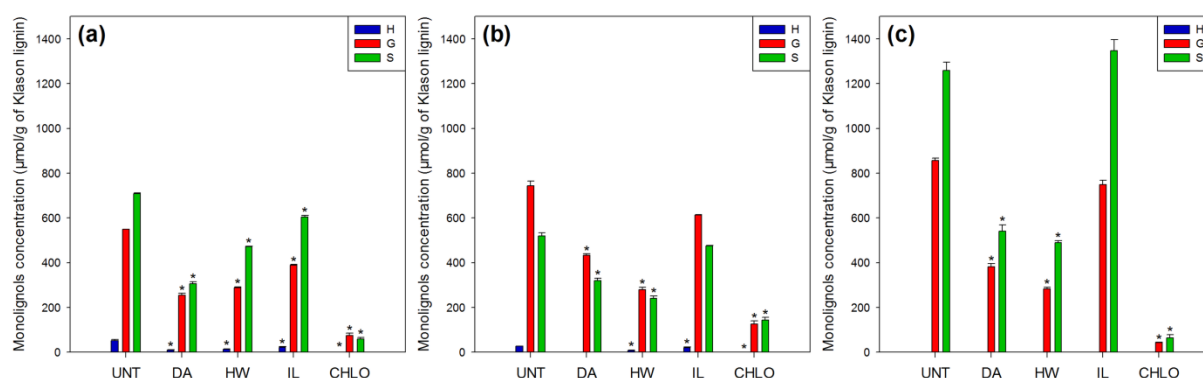
Untreated miscanthus samples were highly recalcitrant to enzymatic hydrolysis as only ca. 3% of the initial glucose content was released after 96 h, which is 10 times less than what was released from untreated wheat straw and poplar samples. However, as the glucose content of all untreated biomass samples was similar (Figure 7), this lower saccharification yield is likely to result from structural features. When comparing the data for all the pretreatments, the higher saccharification yields were obtained for the wheat straw samples, suggesting that wheat straw cell walls can be more easily modified during the pretreatment process. This difference could be due to a lower lignin content (20%) compared to poplar and miscanthus (25%). DA pretreatment leads to a more limited enhancement of the biomass digestibility than HW pretreatment for all samples, whereas the glucose content was more important in DA-pretreated samples (Figure 7). Hemicelluloses removal then seemed to be an important but not essential parameter to increase saccharification yield. The increase in enzymatic



hydrolysis efficiency induced by the IL pretreatment depended on the biomass species. This pretreatment was the least efficient on wheat straw samples (45%) whereas it was the second most efficient pretreatment on miscanthus samples (29%). The most efficient pretreatment was the CHLO-delignification that allowed releasing more than 90 % of the initial glucose content for all biomass species. DeMartini *et al.* also obtained higher glucose yield after CHLO delignification of poplar samples compared to other pretreatments [46]. This outlines the importance of lignin in the saccharification of the plant cell walls.

### Lignin composition

Confocal microscopy images showed that lignin structure and deposition was highly affected by the different pretreatment processes. Lignin was then analysed in more details in order to better understand how it was modified. The proportions of *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) units were measured after lignin thioacidolysis (Figure 8). Thioacidolysis allowed the detection of the monolignols that are linked only through labile aryl ether linkages and that are more likely to be released during the pretreatment processes compared to condensed fractions [47].



**Figure 8.** Monolignols quantification after lignin thioacidolysis of (a) wheat straw, (b) miscanthus, (c) poplar. Monolignols concentrations were assessed in triplicates. Error bars represent standard deviation. Asterisks indicate statistically significant differences between pretreated samples and the corresponding untreated sample.

Untreated poplar contained more labile G and S units than both untreated wheat straw and miscanthus. Contrary to poplar and wheat straw samples, miscanthus released more G than S units. Similar labile monolignols proportions have already been observed after thioacidolysis of wheat straw [48], poplar [49] and miscanthus [19]. Different trends can be observed after each pretreatment, regardless of the biomass species. After DA and HW pretreatments, the

---

amount of the three units decreased whereas the lignin content of these pretreated samples was either unchanged or more important (Figure 7). It is likely that these pretreatments induced a partial condensation of the remaining lignin, as only the labile ether linkages can be disrupted during the thioacidolysis reaction. The monolignols content of the IL-pretreated wheat straw slightly decreased probably because of a small condensation of lignin. No statistically significant differences were observed in miscanthus and poplar samples. For all CHLO-pretreated samples, the measured amount of each type of monolignols was very low as most of the lignin was removed from the plant cell walls (Figure 7). Nevertheless, when comparing these values to the lignin amount calculated using the Klason method, it can be observed that the decrease in monolignols amount was more important than lignin removal, showing that the remaining lignin likely underwent condensation reactions.

### **Lignin structural features**

Complementary information were obtained on lignin structural features using 2D HSQC NMR allowing the characterisation of the whole lignin polymer compared to thioacidolysis. The proportion of labile of  $\beta$ -O-4' linkages which are the prevalent bonds in the lignin polymer were quantified, as well as  $\beta$ -5' phenylcoumaran and  $\beta$ - $\beta$  resinol bonds which are considered as condensed linkages strengthening lignin structure [50] (Table 3).

**Table 3.** Lignin inter-linkages proportion and syringyl to guaiacyl (S/G) ratio determined by 2D HSQC NMR spectroscopy. Linkages proportions are expressed per 100 aryl units. ND: not detectable.

Biomass	Pretreatment	$\beta$ -O-4'	$\beta$ -5'	$\beta$ - $\beta$ '	S/G ratio
Wheat straw	UNT	46.10	4.46	3.81	0.67
	DA	14.85	ND	ND	0.64
	HW	5.94	8.29	ND	1.02
	IL	36.25	3.43	2.19	0.92
	CHLO	ND	ND	ND	ND
Miscanthus	UNT	41.64	6.32	2.91	0.46
	DA	37.06	ND	ND	0.53
	HW	13.77	9.79	ND	0.51
	IL	46.61	6.52	2.93	0.53
	CHLO	ND	ND	ND	ND
Poplar	UNT	54.66	5.92	6.06	1.08
	DA	39.66	5.99	10.76	0.56
	HW	34.98	5.96	8.37	1.46
	IL	59.99	4.75	7.38	1.22
	CHLO	ND	ND	ND	ND

The proportion of  $\beta$ -O-4' ether linkages was less important after both DA and HW pretreatments for all of the three biomass species, with a more important decrease induced by the HW pretreatment especially for wheat straw and miscanthus. This observation makes sense regarding the decrease in monolignols amount measured after thioacidolysis of the different samples as only the  $\beta$ -O-4' labile linkages are disrupted during this reaction [47]. After IL pretreatment, the proportion of  $\beta$ -O-4' linkages was less modified in the wheat straw samples and was even increased for the poplar and miscanthus samples, suggesting that lignin might have undergone some repolymerisation reactions instead of condensation reactions. This reorganisation of the IL-pretreated lignin is consistent with the lignin content results discussed previously as lignin was not removed from the samples (Figure 7) while IL pretreatment is known to solubilise lignin [14]. It is likely that the solubilised lignin was not extracted from the samples due to their complex structure and underwent some reorganisation during the regeneration step. Lower amount of condensed linkages were detected, and in some

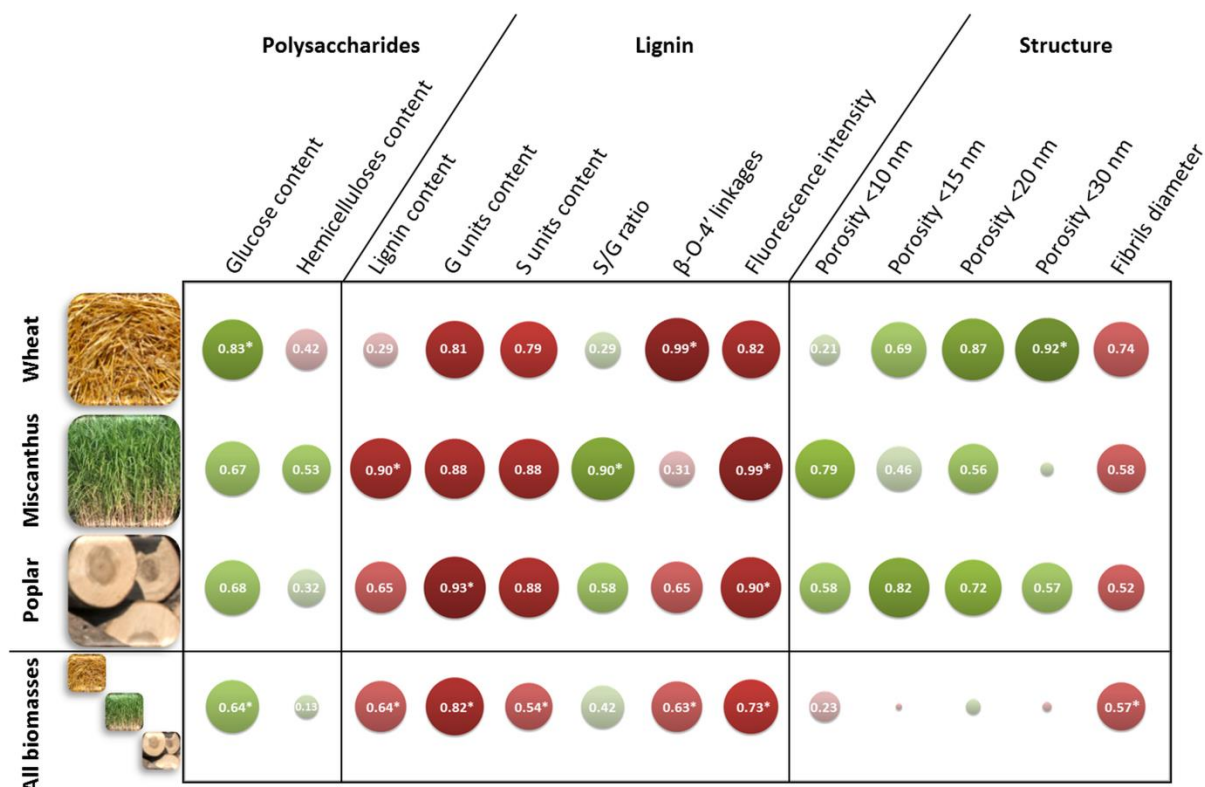
cases, contour intensities did not allow quantification, especially for DA and HW pretreated wheat straw and miscanthus. However, these two biomasses exhibited similar modifications with an increase of the  $\beta$ -5' linkages for the HW pretreated samples, consistent with the previously described results and the observation of lignin droplets on this samples (Figure 4). IL pretreated wheat straw and miscanthus had a similar amount of both  $\beta$ - $\beta'$  and  $\beta$ -5' bonds. All pretreatment induced similar modifications of the condensed linkages for poplar samples with no effect on the  $\beta$ -5' bonds and a slight increase in  $\beta$ - $\beta'$  bonds indicating some condensation of the lignin. For all CHLO-pretreated samples, contour intensities of the different peaks were too low to allow analysing the remaining lignin structure, as expected from the very low amount of lignin remaining in these samples (Figure 7).

Important differences were also observed in syringyl to guaiacyl (S/G) ratios for the different biomass species. The S/G ratio of untreated miscanthus was lower than that of poplar and wheat straw untreated samples. These results are consistent with the lower amount of  $\beta$ -O-4' linkages proportion observed for the untreated miscanthus compared with the two other biomass samples as S units are more prone to establish labile linkages due to the steric hindrance of the methoxy groups on the aryl moieties of the monolignol [51]. Lignin with high S/G ratio is easier to pretreat because of the higher amount of labile linkages that makes lignin more prone to deconstruction [52]. Plants with S-rich lignin are thus considered to be more advantageous for saccharification than those with G-rich lignin [50]. This lower S/G ratio for untreated miscanthus might explain why miscanthus samples released considerably less glucose than the other biomass species (Table 2). S/G ratio was increased after HW and IL pretreatments for wheat straw and poplar samples, indicating a degradation of the G-units. Miscanthus-pretreated samples showed no significant modification of their S/G ratio, suggesting a weaker impact of pretreatments on lignin that might also explain the lesser amount of glucose release from these samples during enzymatic hydrolysis.

### **Correlations between enzymes activity and the samples' characteristics**

Given the large spectra of characterised features for three contrasted biomass species modified following four different pretreatments, correlation coefficients were calculated in order to highlight the plant cell walls' markers impacting the most biomass saccharification. One-to-one correlations were determined between the saccharification yield of the different samples and some of the biomass-related measured characteristics (Figure 9). For lignin composition, only labile G and S units contents were considered as no H units could be

detected after thioacidolysis of the poplar samples, and only small amounts were quantified in wheat straw and miscanthus samples (Figure 8). Regarding lignin linkages, only the  $\beta$ -O-4' bonds were taken into account as the proportions of the condensed  $\beta$ - $\beta$ ' and  $\beta$ -5' bonds could not be determined for every samples (Table 3). For porosity measurements, only the proportion of pores below 10, 15, 20 and 30 nm were considered since these pore sizes are in the same size order as the enzymes involved in hydrolysis



**Figure 9.** Pearson's correlation coefficients between the saccharification yield after 96 h of enzymatic hydrolysis (Table 2) and different plant cell walls' markers. Disks diameter and colour shade display the strength of the correlations. Both positive and negative correlations are presented using the absolute value of the coefficients. Absolute values under 0.1 are not indicated on the corresponding disks. Positive and negative correlations are displayed in green and red respectively. Asterisks indicate statistically significant coefficients with a  $p$ -value below 0.05.

For wheat straw samples, a high positive correlation is observed between saccharification efficiency and glucose content (0.83). Interestingly, strong positive correlation coefficients around 0.7 - 0.9 were also obtained for porosity between 15 and 30 nm even if only the overall porosity below 30 nm was statistically significant ( $p = 0.02$ ). However, as the number

of values considered for correlations were relatively low when considering each biomass separately (5 different conditions), *p*-values were statistically significant only for very strong correlations. Higher values for lower porosities could have been expected, as some fungal enzymes such as the ones used in this study are known to have small radii around 2.0 - 3.5 nm [53, 54]. This low value could be explained regarding the raw data as only the CHLO sample displayed an increase in this specific pore size (Figure 6). Negative correlations were observed with the lignin-related parameters, such as labile G and S units contents (-0.8) and especially the proportion of  $\beta$ -O-4' linkages (-0.99). However, lignin content showed no correlation with saccharification yield. These results show that for wheat straw, most important factors to consider to overcome recalcitrance are lignin  $\beta$ -O-4' linkages content and porosity below 20 - 30 nm, in addition to fluorescence intensity to a lesser extent.

For poplar samples, similar trends were observed, with lignin related parameters being negatively correlated with saccharification yield. The labile G units content displayed a higher and significant coefficient (-0.93), contrary to the  $\beta$ -O-4' linkages content (-0.65). Among porosity features, smaller pores (< 15 nm) showed the best correlation (0.82). The fluorescence intensity of poplar samples showed very high negative correlation with enzymatic hydrolysis efficiency (-0.90).

For miscanthus samples, lignin-related parameters were highly negatively correlated with the saccharification yield, especially the lignin content (-0.90), whose coefficient was much higher than the values discussed previously for the two other biomass species, and the S and G contents. The S/G ratio showed a high positive correlation (0.90), that is not significant because the ratio remained similar after each pretreatment (Table 3). Among the different pore sizes markers, only pores below 10 nm showed a strong positive correlation coefficient. On the contrary, fluorescence intensity displayed a very high negative correlation coefficient of -0.99.

Considering all samples, a good positive correlation was logically observed between the glucose content and the saccharification yield (0.64). The hemicelluloses content coefficient value (0.13) indicated that this parameter could not be related with saccharification efficiency, either in a positive or a negative way, whereas it was described as being detrimental to enzymatic hydrolysis in other studies [46]. This likely means that hemicelluloses organisation and interactions with cellulose has more influence on recalcitrance than its content alone. Markers related to lignin all had relatively strong negative coefficients, which was expected as enzymes are known to unproductively bind on lignin surface [55, 56]. The lowest

coefficient was obtained for the amount of S units released after thioacidolysis (-0.54) while the strongest coefficient was obtained for the amount of G units (-0.82). The importance of lignin is also illustrated through the negative correlations obtained with fibrils diameters (-0.57,  $p = 0.03$ ), as it has been shown that lignin content was related to microfibrils diameter, probably because lignin infiltrates the microfibrils aggregates [40]. The anti-correlation between lignin-related factors and saccharification efficiency is also evidenced by the negative coefficient for the fluorescence intensity (-0.73). This relatively high value that was also obtained when considering only poplar and miscanthus samples means that the evolution of fluorescence properties after pretreatment might be a good indicator of biomass enzymatic digestibility. Moreover, this marker is easier and faster to measure than the other high-correlated marker, namely the G unit content.

Taken together, all the positive and negative correlations determined highlight some important features concerning plant cell walls' recalcitrance, which can reasonably be considered as generic since performed on different biomass species submitted to contrasted pretreatments. It seems reasonable to consider that a low value for the correlations coefficient between glucose yield and glucose content reflects a high recalcitrance of the plant cell wall since, in an ideal case, all the glucose should be release at the end of the saccharification. Miscanthus and poplar samples displayed higher negative correlations with the lignin content or with lignin subunits contents, which showed the highest recalcitrance to enzymatic hydrolysis (Table 2). This is consistent with the higher lignin content of miscanthus and poplar compared to wheat straw (Figure 7). Lignin content is then likely to be involved in the smaller improvement in saccharification efficiency induced by the different pretreatments of poplar and miscanthus, with the exception of CHLO pretreatment which removed lignin from the cell walls (Table 2). Miscanthus saccharification yield also displayed relatively low correlation coefficients with the different pore sizes. These coefficients increased for poplar, and were even higher for wheat straw. Wheat straw samples displayed the lowest porosity among the three biomass species (Figure 6), but the highest saccharification yields were obtained with these samples (Table 2). The increase in porosity and lignin removal are likely to be intertwined as lignin has a well-known pore-filler role [57]. However, our results tend to show that lignin removal has a more important impact on saccharification efficiency than porosity increase. Modifying lignin structures seems essential as the polymer size can vary according to its composition and then cover cellulose fibrils differently. Our results indicate that G units are more detrimental to enzymatic hydrolysis as branched G-rich lignin can give

rise to more resistant physical barrier [58]. Decreasing lignin content would then allow increasing porosity and then improve enzymes diffusion inside the plant cell walls, but the removal of the physical barrier formed by lignin around cellulose needs to be efficiently achieved for enzymes to access their substrate. Similar conclusions were drawn in previous studies focusing on more restricted combination of biomasses and pretreatments. A recent study from Xu *et al.* showed that surface area and pores volumes were well correlated with the enzymatic hydrolysis of rice straw pretreated using cholinium ionic liquid. Principal component analysis allowed them to determine that these parameters were interconnected and negatively related to lignin content [59]. Wyman *et al.* showed using  $\text{SO}_2^-$  catalysed steam exploded spruce samples that reaching a low lignin content in pretreated samples was not as important as increasing cellulose accessibility to enhance saccharification [60]. Rollin *et al.* also demonstrated by studying pretreated switchgrass that cellulose accessibility was the most important factor to focus on in order to effectively release sugars from recalcitrant lignocellulose [61]. These concurring conclusions show that our correlations can be reasonably considered as generic. Lignin is likely to play an important role in governing cellulose accessibility, whether by its content in the plant cell wall or more probably by its structure and organisation around the cellulose fibrils. This importance of lignin might explain the good correlations observed between saccharification efficiency and samples' fluorescence intensity that can thus be considered as a good marker of biomass susceptibility to enzymatic hydrolysis.

## CONCLUSION

Wheat straw, poplar and miscanthus fragments were submitted to contrasted pretreatments in order to generate a set of samples with varying structure and composition. Microscopy techniques, wet chemistry analysis and NMR spectroscopy were used to study factors modified by the pretreatments and that can influence enzymes activity within the plant cell walls. Despite the non-milling of the samples and the high enzyme loading, contrasted behaviours were obtained in saccharification yield but also in all the other analysed features. This allows concluding that the selected conditions were suitable to investigate plant cell walls' recalcitrance.

Correlations were then performed between the 96 h-saccharification yield and the different structural, chemical and spectral characteristics related to each sample, in order to highlight some features that could be considered as markers of the plant cell walls' recalcitrance.



Among chemical markers, lignin composition (in particular S- and G-units content and aryl-ether linkages content) seems at least as important as lignin content to explain biomass recalcitrance. Regarding structural markers, porosity is of course a critical feature to consider, but the pore size range to consider varies depending on the biomass species. This probably reveals that nano-chemical structure and composition of the cell walls, which was not investigated, depends on biomass species, and is likely directly responsible for the different saccharification potential. Evaluation of these markers requires long-time technical analysis and thus cannot be used for rapid predictive determination of saccharification. Rather, fluorescence intensity measurements which showed a strong correlation with saccharification can be carried out rapidly and give a good trend of hydrolysis potential. Actually, fluorescence is a complex parameter mainly due to phenolic molecules in lignin but depending on many features including monolignols content, interlinkages type and relative content, and of course the surrounding biopolymers possibly interacting through covalent and non-covalent bonds. So it is not surprising that due to its versatility, fluorescence can be considered as a good marker of recalcitrance, even if it is not possible to precisely relate some chemical and structural lignin features to fluorescence. Overall, our study proves that structural features, only partially revealed by measurements of porosity and fluorescence, are probably essential to investigate in more details to understand biomass recalcitrance.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank some members of the FARE staff: David Crônier for his help in performing the wet-chemistry characterisation of the different samples and for carrying out the 2D HSQC NMR analysis, François Gaudard for his help in performing the SEM observations and Olivier Delfosse for conducting the catalytic combustion experiments. The authors are grateful to Dr Lloyd Donaldson (SCION, Rotorua, New-Zealand) for his help in acquiring the FE-SEM images. MH PhD thesis was funded by Région Grand Est.

### **REFERENCES**

- [1] Claassen P.A.M., *et al.*, *Utilisation of biomass for the supply of energy carriers*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52 (6), 741-755.

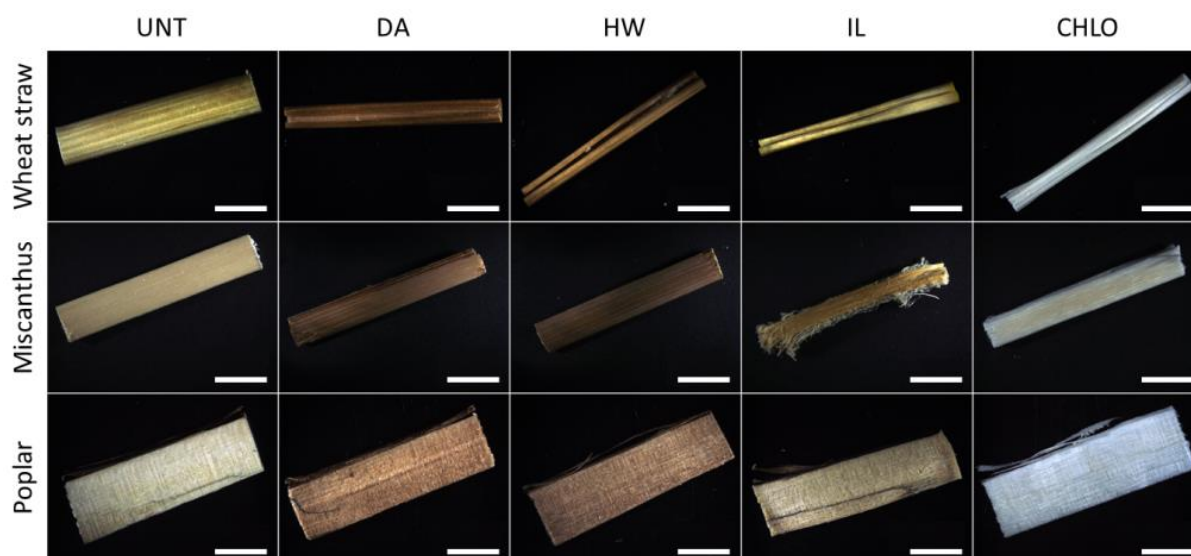
- 
- [2] Menon V., Rao M., *Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept*. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38 (4), 522-550.
- [3] Boerjan W., *et al.*, *Lignin biosynthesis*. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54 (1), 519-546.
- [4] O'Sullivan A.C., *Cellulose: the structure slowly unravels*. Cellulose, 1997, 4 (3), 173-207.
- [5] Zhong R., Ye Z.-H., *Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation*. Plant and Cell Physiology, 2015, 56 (2), 195-214.
- [6] Zhao X., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part II: fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2012, 6 (5), 561-579.
- [7] Brodeur G., *et al.*, *Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review*. Enzyme Research, 2011, 2011, 787532.
- [8] McCann M.C., Carpita N.C., *Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property*. Journal of experimental botany, 2015, 66 (14), 4109-18.
- [9] Zhao X., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2012, 6 (4), 465-482.
- [10] Meng X., Ragauskas A.J., *Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates*. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27, 150-8.
- [11] Blanch H.W., *Bioprocessing for biofuels*. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23 (3), 390-395.
- [12] Silveira M.H., *et al.*, *Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries*. ChemSusChem, 2015, 8 (20), 3366-90.
- [13] Kumar P., *et al.*, *Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009, 48 (8), 3713-3729.
- [14] Brandt A., *et al.*, *Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids*. Green Chemistry, 2013, 15 (3), 550-583.
- [15] Vancov T., *et al.*, *Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels*. Renewable Energy, 2012, 45, 1-6.
-

- 
- [16] Wise L.E., *et al.*, *Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses*. Paper Trade Journal, 1946, 122 (2), 35-43.
- [17] Kumar R., *et al.*, *Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass*. Bioresource Technology, 2013, 130, 372-381.
- [18] Hubbell C.A., Ragauskas A.J., *Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization*. Bioresource Technology, 2010, 101 (19), 7410-7415.
- [19] Belmokhtar N., *et al.*, *Changes in Phenolics Distribution After Chemical Pretreatment and Enzymatic Conversion of Miscanthus × giganteus Internode*. BioEnergy Research, 2013, 6 (2), 506-518.
- [20] Donaldson L., *Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media*. IAWA Journal, 2013, 34 (1), 3-19.
- [21] Berman P., *et al.*, *Laplace Inversion of Low-Resolution NMR Relaxometry Data Using Sparse Representation Methods*. Concepts in Magnetic Resonance. Part A, Bridging Education and Research, 2013, 42 (3), 72-88.
- [22] Saunders M. PDCO: Primal-Dual interior method for Convex Objectives <http://web.stanford.edu/group/SOL/software/pdco/> (January 2017),
- [23] González López C.V., *et al.*, *Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass*. Bioresource Technology, 2010, 101 (19), 7587-7591.
- [24] Auxenfans T., *et al.*, *Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment*. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10 (1), 36.
- [25] Lapierre C., *et al.*, *Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions*. In *Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 1986; Vol. 40, p 113.
- [26] Hedenström M., *et al.*, *Identification of lignin and polysaccharide modifications in populus wood by chemometric analysis of 2D NMR spectra from dissolved cell walls*. Molecular Plant, 2009, 2 (5), 933-942.
- [27] Overend R.P., *et al.*, *Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 1987, 321 (1561), 523-536.
-

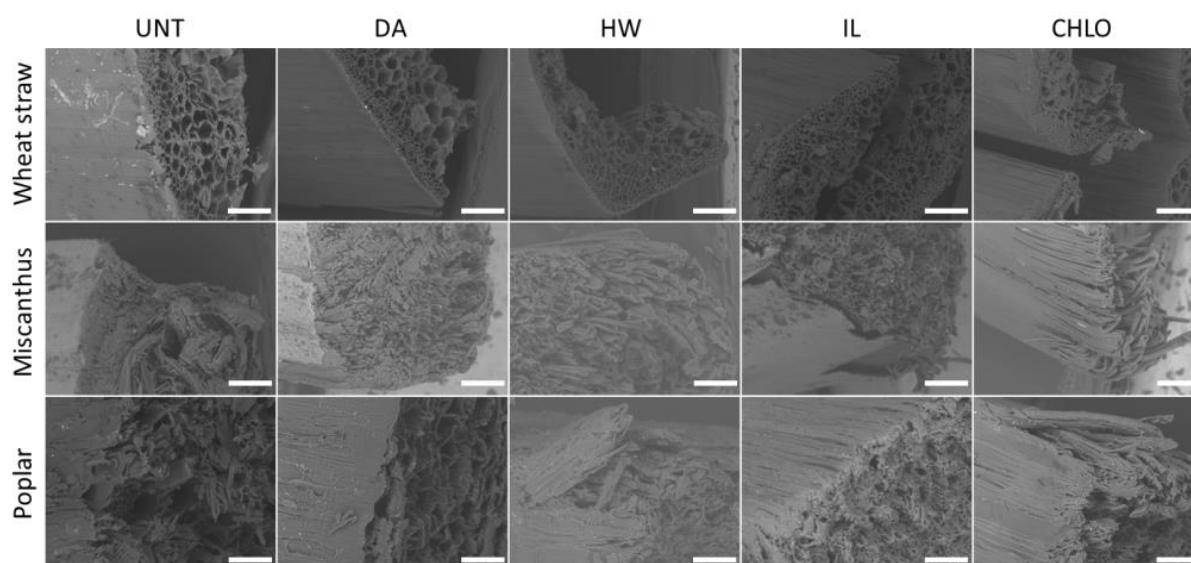
- 
- [28] Bahrani S., *et al.*, *Experimental investigation of ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse with 1,3-dimethylimidazolium dimethyl phosphate*. *Bioresource Technology*, 2015, 185, 411-415.
- [29] Steinbach D., *et al.*, *Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production- A review*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2017, 7 (2), 247-274.
- [30] Paës G., *et al.*, *Exploring accessibility of pretreated poplar cell walls by measuring dynamics of fluorescent probes*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 15.
- [31] Bahcegul E., *et al.*, *Different ionic liquids favor different lignocellulosic biomass particle sizes during pretreatment to function efficiently*. *Green Chemistry*, 2012, 14 (7), 1896-1903.
- [32] Rodrigues A.C., *et al.*, *Celluclast and Cellic® CTec2: saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 79, 70-77.
- [33] Wood I.P., *et al.*, *Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9 (1), 193.
- [34] Narra M., *et al.*, *Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces sp.* for ethanol production*. *Bioresource Technology*, 2015, 179, 331-338.
- [35] Schmidt J., *Electronic spectroscopy of lignins*. In *Lignin and Lignans*, CRC Press: 2010; pp 49-102.
- [36] Donaldson L., *et al.*, *Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution*. *Journal of Structural Biology*, 2010, 169 (1), 106-115.
- [37] Selig M.J., *et al.*, *Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose*. *Biotechnology Progress*, 2007, 23 (6), 1333-1339.
- [38] Ji Z., *et al.*, *Tissue specific response of *Miscanthus × giganteus* to dilute acid pretreatment for enhancing cellulose digestibility*. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 154, 247-256.
-

- 
- [39] Hansen M.A.T., *et al.*, *Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (Triticum aestivum L.) – The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3), 2804-2811.
- [40] Donaldson L., *Cellulose microfibril aggregates and their size variation with cell wall type*. *Wood Science and Technology*, 2007, 41 (5), 443.
- [41] Terashima N., *et al.*, *Nanostructural assembly of cellulose, hemicellulose, and lignin in the middle layer of secondary wall of ginkgo tracheid*. *Journal of Wood Science*, 2009, 55 (6), 409.
- [42] Meng X., *et al.*, *Determination of porosity of lignocellulosic biomass before and after pretreatment by using Simons' stain and NMR techniques*. *Bioresource Technology*, 2013, 144, 467-76.
- [43] Foston M., Ragauskas A.J., *Changes in the structure of the cellulose fiber wall during dilute acid pretreatment in Populus studied by <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H NMR*. *Energy & Fuels*, 2010, 24 (10), 5677-5685.
- [44] Grethlein H.E., *The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates*. *Nature Biotechnology*, 1985, 3 (2), 155-160.
- [45] Tanaka M., *et al.*, *Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32 (5), 698-706.
- [46] DeMartini J.D., *et al.*, *Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass*. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6 (3), 898-909.
- [47] Ralph J., *et al.*, *Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids*. *Phytochemistry Reviews*, 2004, 3 (1), 29-60.
- [48] Rolando C., *et al.*, *Thioacidolysis*. In *Methods in Lignin Chemistry*, Lin S.Y.; Dence C.W., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1992; pp 334-349.
- [49] Yue F., *et al.*, *Syntheses of lignin-derived thioacidolysis monomers and their uses as quantitation standards*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60 (4), 922-928.
- [50] Kishimoto T., *et al.*, *Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (2), 895-901.
-

- 
- [51] Hirasawa T., *et al.*, *Chapter 4 - Production technology for bioenergy crops and trees*. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Academic Press: Boston, 2014; pp 51-106.
- [52] Papa G., *et al.*, *Exploring the effect of different plant lignin content and composition on ionic liquid pretreatment efficiency and enzymatic saccharification of Eucalyptus globulus L. mutants*. *Bioresource Technology*, 2012, *117*, 352-359.
- [53] Jänis J., *et al.*, *Thermostability of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from Trichoderma reesei studied by electrospray ionization Fourier-transform ion cyclotron resonance MS, hydrogen/deuterium-exchange reactions and dynamic light scattering*. *Biochemical Journal*, 2001, *356* (2), 453-460.
- [54] Kirsch C., *et al.*, *Pressure assisted stabilization of biocatalysts at elevated temperatures: characterization by dynamic light scattering*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, *110* (6), 1674-1680.
- [55] Kumar L., *et al.*, *The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility*. *Bioresource Technology*, 2012, *103* (1), 201-208.
- [56] Yu Z., *et al.*, *Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass*. *ChemSusChem*, 2014, *7* (7), 1942-1950.
- [57] Driemeier C., *et al.*, *Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry*. *Industrial Crops and Products*, 2016, *82*, 114-117.
- [58] Li M., *et al.*, *Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance*. *Frontiers in Chemistry*, 2016, *4*, 45.
- [59] Xu J., *et al.*, *Correlation between physicochemical properties and enzymatic digestibility of rice straw pretreated with cholinium ionic liquids*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, *4* (8), 4340-4345.
- [60] Wiman M., *et al.*, *Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce*. *Bioresource Technology*, 2012, *126*, 208-215.
- [61] Rollin J.A., *et al.*, *Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, *108* (1), 22-30.
-

**SUPPLEMENTARY DATA**

**Figure S1.** Morphology of the wheat straw, miscanthus and poplar fragments before and after pretreatments. Scale bars: 5 mm.



**Figure S2.** SEM images of the transverse surface of the different fragments. Samples were imaged with an inclination angle of 45°. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .







## **CHAPITRE 2**

## **RÉSUMÉ ÉTENDU**

Comme l'ont montré les résultats présentés dans le Chapitre 1, la récalcitrance est principalement liée à la lignine et à la porosité inférieure à 30 nm. Pour étudier l'influence de ces facteurs sur la diffusion des enzymes, des expériences de microscopie confocale ont été envisagées pour mesurer la mobilité de sondes fluorescentes au sein des parois de nos échantillons.

Cette approche expérimentale a déjà été mise en place au laboratoire pour mesurer l'accessibilité de dextrans porteurs de fluorescéine ou de rhodamine au sein d'assemblages bio-inspirés formés par l'association de polymères pariétaux, mais aussi au sein des parois d'échantillons de biomasse prétraités. Dans le cadre de notre étude, nous avons voulu analyser la diffusion de sondes PEG, dont il a été démontré qu'elle pouvait se fixer à la lignine et ainsi mimer les interactions non-spécifiques entre les enzymes et la lignine.

De nombreux dextrans et PEG fluorescents sont disponibles commercialement. Toutefois, les informations mises à disposition par les fournisseurs sont souvent incomplètes. Alors que la masse molaire des sondes est toujours renseignée, les données relatives à la taille des sondes sont souvent manquantes. Or, ces informations sont primordiales pour l'étude des phénomènes de diffusion, la taille des molécules permettant d'expliquer précisément les comportements de mobilité et d'accessibilité des molécules étudiées.

Parmi les techniques permettant de mesurer la taille des molécules, la diffusion de lumière permet de déterminer de façon absolue la masse molaire d'une molécule, et certaines informations relatives à sa taille comme son rayon hydrodynamique ( $R_H$ ). Cette détermination est qualifiée d'absolue car au contraire des autres méthodes, la diffusion de lumière ne nécessite pas de comparer les valeurs obtenues avec une gamme de molécules standards de tailles ou masses connues. Le  $R_H$  des sondes, qui correspond au rayon théorique d'une sphère théorique diffusant à la même vitesse que l'espèce étudiée, peut être obtenu par cette méthode et est un bon indicateur de la taille d'une molécule.

L'objectif de cet article est de déterminer les caractéristiques spectrales, de masses molaires et de taille des sondes fluorescentes qui seront ensuite utilisées pour étudier les changements d'accessibilité induits par les prétraitements. Notre analyse s'est portée sur des dextrans et des PEG marqués avec deux fluorophores différents, la fluorescéine et la rhodamine.

Les analyses spectrales ont révélé que les propriétés d'excitation et d'émission des fluorophores variaient légèrement en fonction de la molécule sur lesquelles ils étaient greffés.

Ces changements de propriétés doivent être considérés lors du choix d'une sonde fluorescente afin de pouvoir les utiliser de façon adaptée.

La caractérisation des sondes fluorescentes par diffusion de lumière a été effectuée de deux manières différentes : après élution sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique, et directement sur les solutions non fractionnées comme cela se fait classiquement. Des valeurs de masse molaire conforme aux résultats attendus ont été déterminées par diffusion statique de la lumière. Les mesures de diffusion dynamique de la lumière ont montré que le marquage par l'un ou l'autre des fluorophores n'influaient pas sur le  $R_H$  des sondes. Des disparités ont été observées pour les valeurs de  $R_H$  en fonction de la manière dont les sondes ont été analysées. Les valeurs obtenues après élution des sondes étaient ainsi plus faibles que celles obtenues pour les sondes non fractionnées. Cette différence peut être expliquée par la méthode de calcul du  $R_H$ , basée sur l'équation de la courbe théorique ajustée sur la courbe expérimentale d'autocorrélation des variations de la lumière diffusée mesurées expérimentalement. Cette dernière courbe est obtenue après mesure de la lumière diffusée par toutes les espèces présentes en solution. L'analyse de la lumière diffusée par des solutions de sondes non fractionnées est donc susceptible de prendre en compte des populations autres que la population d'intérêt, ce qui semble probable dans le cas de sondes polydisperses.

Les données expérimentales obtenues après élution des sondes ont servi à modéliser l'évolution du  $R_H$  des différentes sondes en fonction de leur masse moléculaire. L'ensemble des données brutes fournit des indications sur les bonnes pratiques à mettre en place pour caractériser correctement les sondes fluorescentes de type dextrans et PEG, et les méthodes décrites peuvent être appliquées à tout type de sondes fluorescentes. Dans le cas des PEG et des dextrans, les mesures obtenues et les équations déterminées pourront servir à calculer la taille de dextrans ou de PEG de masse molaire connue, et ainsi mieux comprendre leur comportement lors de leur utilisation, pour des expériences de diffusion notamment.

**Article soumis dans PLOS ONE.**

---

## **Light scattering analysis of the hydrodynamic radii of commercial dextran- and PEG-based fluorescent probes**

Mickaël Herbaut, Gabriel Paës

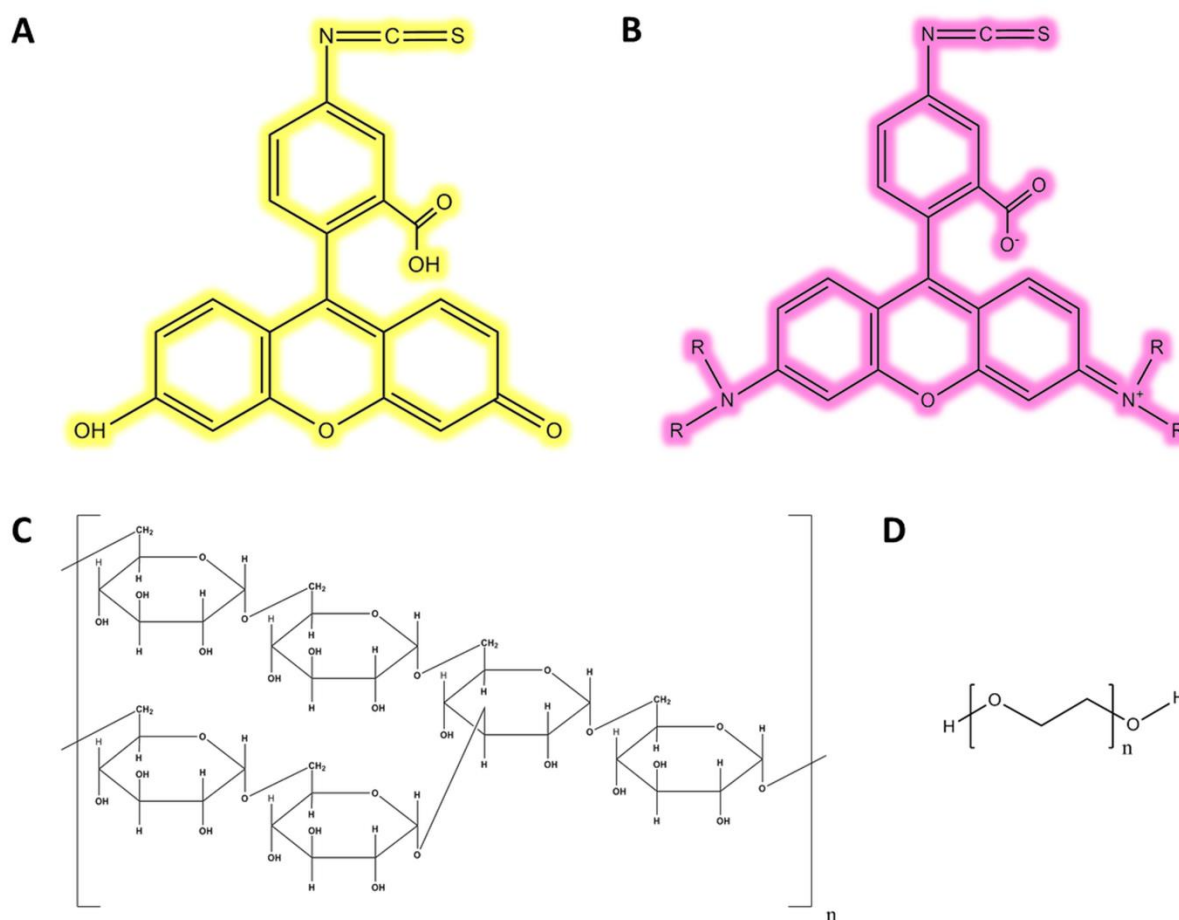
Fractionation of AgroResources and Environment (FARE) laboratory, INRA, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

### **ABSTRACT**

Dextran and polyethylene glycol-based fluorescent probes are used in many different fields to investigate the micro-structure, the diffusion and the interactions properties of biopolymer assemblies. Therefore, the information they can provide are highly relevant require knowledge about the probes' characteristics. In many publications, authors rely only on the supplier's information that might be inaccurate or even missing. In particular, fluorescent probes' molecular weight distribution and hydrodynamic radius which are among the most important characteristics of fluorescent probes are rarely mentioned, leading to some possible misinterpretation of results. Here we present an in-depth characterization of the physical properties of dextran and polyethylene glycol fluorescent probes performed by light-scattering analysis. The data obtained for molecular weight and hydrodynamic radius were compared with suppliers information, outlining the importance to properly characterize the probes before using them. Experimental data were also used to propose a model of probes' size versus probes' molecular weight, providing an easy way to predict important properties of dextran and polyethylene glycol-based fluorescent probes.

## INTRODUCTION

Fluorescent probes (FPs) are gaining more and more importance to study biological processes as they can be used as sensors [1, 2], for monitoring localization [3], interactions [4, 5] or even dynamical processes [6, 7] in many different application fields. Fluorescence can be an intrinsic property of the molecule, but it can also be provided by the chemical grafting of fluorophores such as fluorescein (Figure 1A) and rhodamine (Figure 1B).



**Figure 1.** Chemical structures of (A) fluorescein, (B) rhodamine, (C) dextran and (D) PEG. Fluorophores structures are outlined using their maximum fluorescence colour. In the present study, the R groups of the rhodamine skeleton can refer either to a methyl or an ethyl group to form tetramethylrhodamine or rhodamine B respectively.

Dextrans are biologically-produced homopolysaccharides possessing a linear backbone of glucose subunits linked in  $\alpha$ -(1,6) that can be highly substituted [8] (Figure 1C). Their degree of polymerization, as well as their structure and branching pattern depends on the microbial strains used to produce them. [9]. The possibility to generate dextrans over a very large range

of sizes (from 3 kDa up to 2,000 kDa) [10] as well as their good solubility in many solvents including water, methyl sulphoxide, ethylene glycol or glycerol [10], make these molecules very interesting for the production of FPs. A wide variety of fluorophores can be grafted on the many hydroxyl groups along the polymer. Dextran-based FPs have been used since the 1970's to study biological processes in many research fields [11]. In the biomedical domain, they allowed studying anterograde and retrograde axonal transport [12] as well as hepatocellular tight junctions [13]. They allowed studying diffusion behaviour in carrageenan [14], gelatin [15] and guar gels [16] that are used in both the pharmaceutical and food industries. Relationship between dextran size and diffusion in dairy systems gave insights into their microstructure [17], which is an important parameter to deal with for nutrition [18]. Finally, in the environment area, diffusion of dextran FPs was assessed to understand the behaviour of enzymes in bioinspired models of plant cell walls [19-21] and in plant cell walls [22], and more generally to study diffusion at different scales [23].

Other polymers of interest for the preparation of FPs are polyethylene glycols (PEGs) which are made of chemically-linked ethylene glycol subunits [24] (Figure 1D). The presence of ether groups along the chain gives PEG the original property of being both hydrophilic and lipophilic [25]. PEGs are thus the most used polymers in the field of molecules-coating for drug delivery [26], and are a customary compound in various domains such as cosmetics [27], wound healing [28], or food additives [29], as they can be used to improve both the hydrophobicity and biocompatibility of many molecules by covalent grafting [28]. PEGs can be easily turned into FPs by reacting the terminal hydroxyl groups with a fluorophore. The exact amount of fluorophores grafted to the PEG is then known, and it is theoretically possible to quantify the FPs concentration from solely its fluorescence intensity. Contrary to dextran-based FPs, PEG-based FPs have not been widely used yet. PEGs were grafted on squaraine dye to make it soluble in water and design a synthetic and optically active alternative to the streptavidin-biotin association system [30]. PEGs were also used to increase water solubility and decrease the cytotoxicity of a fluorene derivative probes used to image specifically the lysosomes of cancer cells by two-photon fluorescence microscopy [31]. In the field of environment, PEG-rhodamine of 3.4 kDa was demonstrated to efficiently bind wood fibers, interactions likely occurring between PEG and lignin motifs [32]. So it was used as a probe to investigate Förster Resonance Energy Transfer (FRET) with lignin in pine wood, revealing some local differences in substrate porosity [33].

Overall, dextran- and PEG-probes are used in many different research areas, but the properties related to their size are not always provided in great details by suppliers selling them. Here focused on two critical properties of FPs: their molecular weight (MW) and their size. MW is often determined in a relative fashion using gel permeation chromatography and calibration curves [34], which can give inaccurate results if molecules used for calibration differ from those analysed. That is why we have chosen to characterize dextran- and PEG-probes by using light scattering analysis, which is the only method that can provide absolute MW and information on the size of the probes (hydrodynamic radius, root mean square radius) [35]. In addition, the effect of grafting of both rhodamine and fluorescein on dextran and PEG molecules have been assayed using a spectrofluorimeter allowing characterisation on a large span of wavelengths.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fluorescent probes**

Dextrans grafted with tetramethylrhodamine isothiocyanate with an average MW of 4.4, 20 and 70 kDa, and dextrans labelled with fluorescein isothiocyanate with an average MW of 4, 10, 40, 70 and 250 kDa were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Dextrans grafted with rhodamine B isothiocyanate with an average MW of 40 kDa was obtained from TdB Consultancy (Uppsala, Sweden). Methoxypolyethylene glycol molecules with an average MW of 5, 10 and 20 kDa and labelled with tetramethylrhodamine were purchased from CreativePEGWorks (Chapel Hill, USA). Methoxypolyethylene glycol molecules with an average MW of 40 kDa grafted with either rhodamine B and fluorescein isothiocyanate were obtained from Interchim (Montluçon, France). Methoxypolyethylene glycol molecules with an average MW of 10 kDa labelled with fluorescein isothiocyanate were purchased from Nanocs (Boston, USA).

The following code will be used throughout this study to identify the probes: each name is composed of the two letters corresponding to the initials of the polymer constituting the probe to the grafted fluorophore respectively. A number designs the expected molecular weight of the probe. For instance, 10 kDa fluorescein-labelled dextrans and 40 kDa rhodamine-labelled PEGs will be named DF10 and PR40 respectively.

### **Spectrofluorimetry**

Spectral analyses were carried out on FPs solutions with a concentration of 0.1% (w/v) in water, after filtration of the probes solutions (PTFE membrane, 0.45  $\mu\text{m}$ ). Fluorescence properties of the FPs were measured using a JASCO FP8300 spectrofluorimeter coupled with a Peltier thermostated single cell holder ETC-815 (JASCO Co., Tokyo, Japan) set at 25°C. 3D fluorescence contour maps were acquired with excitation wavelengths ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) spanning from 250 nm to 600 nm, with a wavelength increment of 1 nm, and emission wavelengths ( $\lambda_{\text{em}}$ ) comprised between  $\lambda_{\text{ex}} + 10$  nm and 650 nm, with a data interval of 0.2 nm. Sensitivity modulated by the photomultiplier voltage was set to 450 V for all FPs. Data were analysed using the SpectraManager software (JASCO Co., Tokyo, Japan).

### **Size Exclusion Chromatography (SEC) coupled with a Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS) detector**

The SEC-MALLS measurements were performed using a system equipped with a DU 4007 degasser (UNIFLOWS Co. Tokyo, Japan), a WATERS 717 Plus Autosampler, a WATERS 515 HPLC pump, a WATERS Column Heater Module, a SHODEX SB-805 HQ column (8.0 x 300 mm, exclusion limit: 4,000 kDa), a SHODEX SB 803 HQ (8.0 x 300 mm, exclusion limit: 100 kDa), a SHODEX SB-802.5 HQ column (8.0 x 300 mm, exclusion limit: 10 kDa), a WATERS 2996 PhotoDiode Array detector, a DAWN Heleos II MALLS Detector with a wavelength of 785.6 nm (Wyatt Technology Co., Santa Barbara, USA), and a WATERS 2414 Differential Refractometer. MALLS experiments were performed on FP solutions at a concentration of 2 mg/mL in 50 mM NaNO<sub>3</sub> + 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> buffer. A volume of 150  $\mu\text{L}$  of the FPs solutions was injected into the SEC columns, using an aqueous mobile phase containing 50 mM NaNO<sub>3</sub> + 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> at a flow rate of 1 mL/min. Data were analysed using the ASTRA 6.1 software (Wyatt Technology Co., Santa Barbara, USA). Refractive index increment (dn/dc) values of 0.134 and 0.147 were used for the analysis of PEG and dextran FPs, respectively. These values were provided by Wyatt Technology. MW and dispersity results are expressed as measured value  $\pm$  uncertainty.

### **Dynamic Light Scattering (DLS)**

Hydrodynamic radius measurements of FP solutions at 2 mg/mL in 50 mM NaNO<sub>3</sub> + 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> buffer were carried out using a DynaPro NanoStar Dynamic Light Scattering

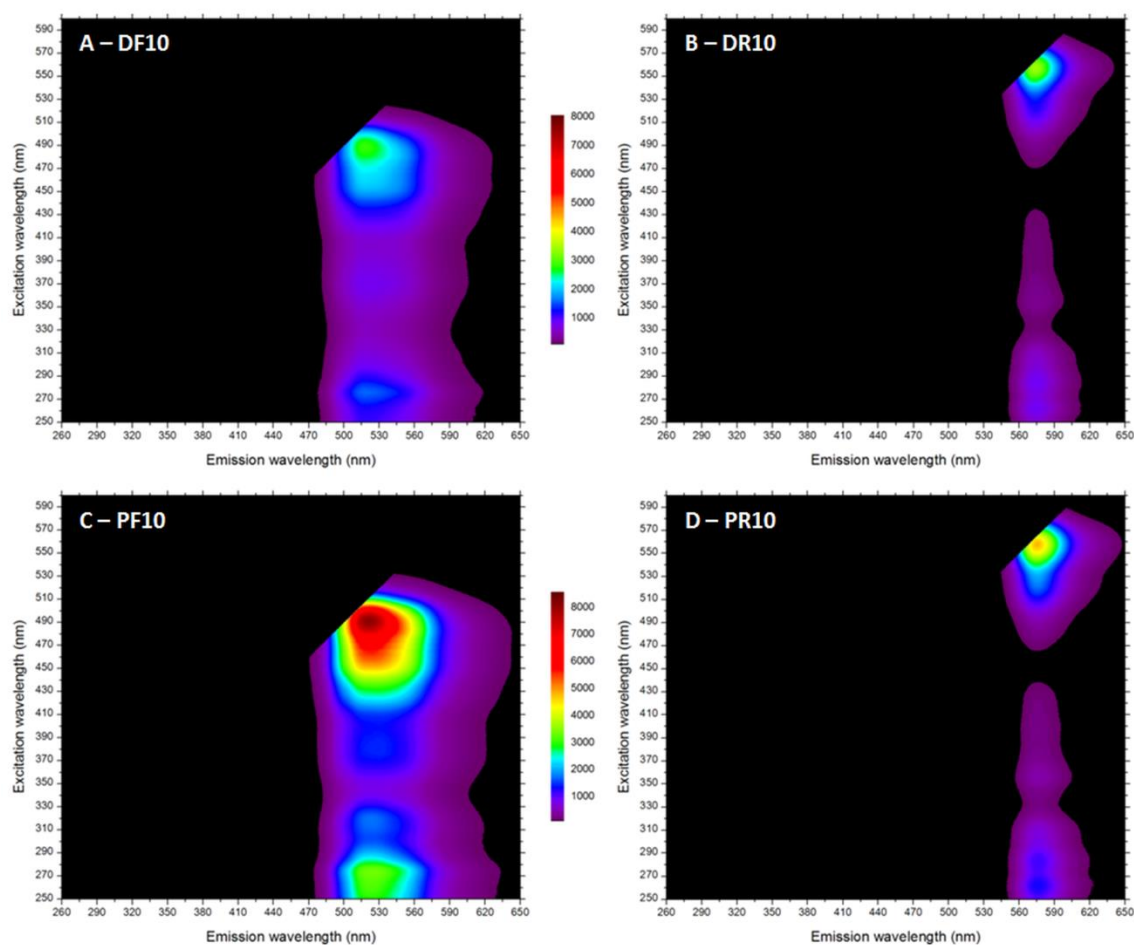


detector (Wyatt Technology Co., Santa Barbara, USA) with an infrared laser wavelength of 785.6 nm. Measurements were performed on-line after elution of the filtered probes solution on the SEC columns, or in batch mode on probes solutions submitted to no other fractionation after the filtration step. DLS data were analyzed using the DYNAMICS 7.1 software (Wyatt Technology Co., Santa Barbara, California).  $dn/dc$  values of 0.134 and 0.147 were used for the analysis of PEG and dextran FPs, respectively. On-line measurements are expressed as measured value  $\pm$  uncertainty.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Characterization of fluorescence properties**

The fluorescence properties of the 10 kDa FPs were assessed by spectrofluorimetry in order to determine whether grafting on either dextran or PEG had an influence on both fluorescein and rhodamine light emission. 3D fluorescence contour maps were taken displaying fluorescence emission intensity over a wide range of excitation wavelength spanning from 250 nm to 600 nm (Figure 2).



**Figure 2.** 3D fluorescence contour map of (A) DF10, (B) DR10, (C) PF10 and (D) PR10 probes. Fluorescence intensity scales are identical for fluorescein-based probes on the one side, and for the rhodamine-based probes on the other side.

Both fluorescein probes displayed a similar fluorescence profile (Fig 2A and 2C). The main absorption peak covered an extended range of wavelengths with a maximal absorption at 492 nm and a smaller absorption peak around 460 nm. The corresponding fluorescence emission covered a 100 nm-wide wavelengths range with a maximum emission at 517 nm and 522 nm for the DF10 and PF10 probes respectively (Table 1). Absorption profiles showed a secondary absorption peak around 280 nm. These observations are in agreement with previous studies of the fluorescence properties of fluorescein alone [36]. Rhodamine probes displayed similar spectral properties (Fig 2B and 2D), with a maximum excitation wavelength around 560 nm, but with a narrower emission wavelengths range of about 60 nm. This maximum absorption peak partially covered a less intense excitation maximum around 520 nm. Emission

maxima were found to be 569 nm and 576 nm for the DR10 and PR10 probes respectively (Table 1). As for fluorescein FPs, rhodamine FPs absorption profiles showed a secondary absorption peak around 280 nm.

**Table 1.** Analysed spectral properties of 10 kDa dextran and PEG fluorescent probes. Maximum excitation and emission wavelengths and corresponding fluorescent intensity were measured with probes solutions at 0.01% (w/v) using identical spectral acquisition parameters.

Probe	$\lambda_{\text{ex}}$ max (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ max (nm)	Fluorescence intensity
DF10	492	517	2805
PF10	492	522	8057
DR10	559	569	1327
PR10	558	576	1678

Emission maxima for PEG probes were 5 nm higher than dextran probes for both fluorophores, showing that grafting might influence fluorescein and dextran light emission. An interesting observation was that fluorescence emission was detected for each probe for almost every excitation wavelength used (Fig 2), with fluorescein emission being more intense than rhodamine's. This shows that fluorescein and rhodamine-grafted probes can be used over a wide range of excitation wavelengths. However, possible overlapping of FPs emission must be taken into account, in particular if two or more probes are used.

### **Characterization of molecular weight and size**

The choice of a FP is often driven by the need to work with a probe molecule of a specific size. These FPs are selected according to their MW, with the assumption that the higher the MW, the higher the size. However, and more specifically for diffusion experiments, the MW is not the most important parameter to consider. Rather, the hydrodynamic radius  $R_H$  (the radius of a theoretical sphere that would diffuse at the same rate as the considered molecule) is a more appropriate parameter to regard as it is related to the geometrical properties of the molecule. Light scattering analysis was used to assess the physical properties of the different dextran- and PEG FPs. Static light scattering allowed to determine the MW, as well as the

dispersity of the probes, whereas dynamic light scattering (DLS) allowed the measurement of the probes'  $R_H$ . DLS experiments were performed on-line, after elution of the samples on the SEC column, and also in batch mode on unfractionated probes solutions. This allowed comparing  $R_H$  values considering the population of interest alone on the one hand, and all diffusing particles in solution on the other hand. Data obtained for all probes are displayed in Table 2.

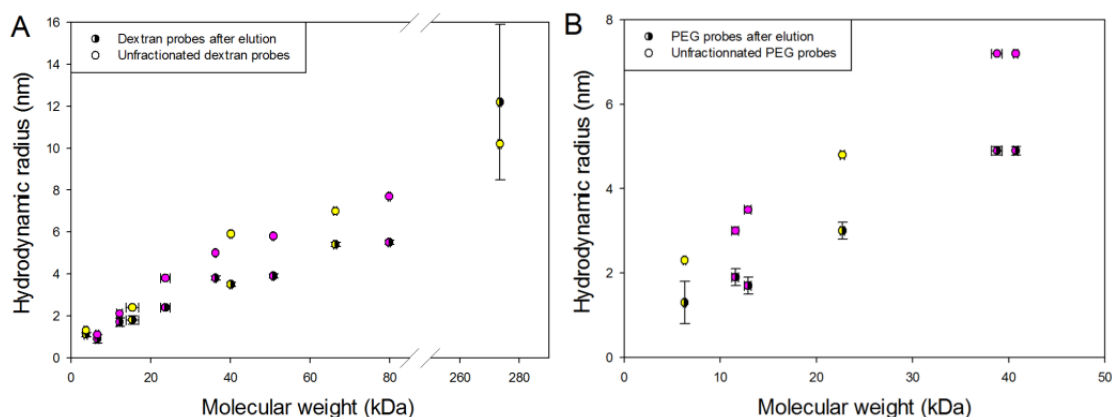
**Table 2.** Analysed physical properties of PEG and dextran FPs. MW and  $R_H$  data provided by suppliers are indicated when available for comparison with experimental data. NA: Not Available.

Probe	Supplier's data		Experimental measurements			
	MW (kDa)	$R_H$ (nm)	MW (kDa)	On-line $R_H$ (nm)	Batch $R_H$ (nm)	Dispersity
DR4.4	3.80	NA	$6.59 \pm 0.35$	$0.9 \pm 0.2$	1.1	$1.28 \pm 0.09$
DR10	10.50	2.3	$12.18 \pm 0.74$	$1.7 \pm 0.2$	2.1	$1.30 \pm 0.10$
DR20	21.32	3.3	$23.65 \pm 1.20$	$2.4 \pm 0.1$	3.8	$1.18 \pm 0.07$
DR40	40.24	4.5	$36.20 \pm 0.22$	$3.8 \pm 0.1$	5.0	$1.27 \pm 0.02$
DR70	75.00	6.0	$50.75 \pm 0.20$	$3.9 \pm 0.1$	5.8	$1.34 \pm 0.01$
DR65-85	79.00	NA	$79.88 \pm 0.25$	$5.5 \pm 0.1$	7.7	$1.41 \pm 0.01$
DF4	3.88	1.4	$3.73 \pm 0.40$	$1.1 \pm 0.1$	1.3	$1.24 \pm 0.19$
DF10	NA	2.3	$15.34 \pm 1.58$	$1.8 \pm 0.2$	2.4	$1.34 \pm 0.17$
DF40	43.00	4.5	$40.12 \pm 0.24$	$3.5 \pm 0.1$	5.9	$1.39 \pm 0.02$
DF70	69.30	6.0	$66.36 \pm 0.42$	$5.4 \pm 0.1$	7.0	$1.33 \pm 0.02$
DF250	250.00	NA	$273.46 \pm 0.55$	$12.2 \pm 3.7$	10.2	$1.48 \pm 0.01$
PR5	5.21	NA	$6.28 \pm 0.14$	$1.3 \pm 0.5$	2.3	$1.02 \pm 0.03$
PR10	10.30	NA	$12.88 \pm 0.36$	$1.7 \pm 0.2$	3.5	$1.09 \pm 0.04$
PR20	20.52	NA	$22.70 \pm 0.24$	$3 \pm 0.2$	4.8	$1.02 \pm 0.02$
PR40	NA	NA	$40.73 \pm 0.20$	$4.7 \pm 0.1$	6.9	$1.05 \pm 0.01$
PF10	NA	NA	$11.56 \pm 0.36$	$1.9 \pm 0.2$	3.0	$1.05 \pm 0.04$
PF40	NA	NA	$38.77 \pm 0.56$	$4.9 \pm 0.1$	7.2	$1.06 \pm 0.02$

The MW of each dextran probe was most of the time close to the supplier's value. Some exceptions could be pointed out, with the case of the DR70 probe, whose MW was  $50.8 \pm 0.2$  kDa whereas supplier's information gives a value of 75 kDa. Light scattering signal for this probe showed a single narrow peak centred on the calculated value, which means that the observed difference cannot be imputable to other smaller molecules as there is only one population of probes in solution. The dispersity of all the probes solutions was also calculated from static light scattering signal, giving an overview of their homogeneity. Dispersity values were comprised between  $1.18 \pm 0.07$  (DR20) and  $1.48 \pm 0.01$  (DF250). This means that the dextran FPs cannot be considered as homogeneous populations of molecules with the same MW, as the threshold of polydispersity is considered to be 1.15. This polydispersity is consistent with the fact that dextrans are biological products which are chemically or enzymatically treated to reach a specific size [37].

The same measurements were performed for the PEG probes. MW values were very similar to the expected values, with the higher uncertainties being around 2.5 kDa for the PR10 and PR20 probes. Dispersity measurements were all below the polydispersity threshold of 1.15, the higher value being  $1.09 \pm 0.04$  obtained for the PR10 probe. PEG probes can thus be qualified as homogeneous or monodisperse. This difference with dextran probes is due to the fact that PEG molecules result from the chemical polymerization of ethylene glycol moieties [24] allowing an easier control of the size of the final molecule.

DLS measurements were used on-line after elution on the SEC column to assess the hydrodynamic radius of the FPs. Results for both measurements are summarized in Table 3. Dextran probes displayed higher  $R_H$  values as the MW increases (Figure 3A). The smallest probes were the DR4.4 and the DF4 probes with  $R_H$  values of  $0.9 \pm 0.4$  nm and  $1.1 \pm 0.3$  nm respectively and the biggest probe was the DF250 probe with a measured  $R_H$  of  $12.2 \pm 3.7$  nm. For each probe, the conjugated fluorophore seemed to have no impact on the measured size.



**Figure 3.** Hydrodynamic radius of the fluorescent probes as a function of their molecular weight. Fluorescein and rhodamine probes are displayed in yellow and pink, respectively. MW values were measured after elution of the probes on the SEC column.  $R_H$  values measured on-line (after elution) are shown using half-filled circles while  $R_H$  values measured in batch mode (unfractionated) are shown using full circles.

A similar behaviour was observed for the PEG probes. An increase in the measured  $R_H$  was observed as the MW augmented for all probes (Figure 3B), with the smaller probe being the PR5 probe with a measured  $R_H$  of  $1.3 \pm 0.5$  nm while the biggest probe being the PF40 with a  $R_H$  value of  $4.9 \pm 0.1$  nm. The grafted fluorophore seems to have no impact on the measured  $R_H$  value, as it was observed for the dextran probes.

Hydrodynamic radius measurements seemed consistent as the  $R_H$  increases with the MW for both types of probes. However, the measured values were always lower than those provided by the suppliers when available. For the bigger probes, differences could be up to 2.5 nm ( $3.5 \pm 0.1$  vs 5.9 nm for the DR40 probe for instance). In order to understand the origin of such a difference, DLS measurements on each probe were performed in batch mode, so that the FP solutions were not fractionated by SEC before analysis. The size of the probes was calculated by taking into account all the light diffusing populations in solution, as it is classically done when solutions are considered to contain one homogenous population. On the whole, measured  $R_H$  values increased as the probe's MW became higher (Figure 3), with values going from 1.3 nm for the DF4 probe to 8.8 nm for the DF250 probe. This last value seemed low compared with all the other measurements. This can be explained by the fact that the light scattering signal of the fractionated DF250 probe showed several populations in solution (Figure S1), and it is likely that this heterogeneity is responsible for this underestimation of the probe's  $R_H$ . The relation between the increases in MW and  $R_H$  was observed for unfractionated PEG probes as well (Figure 3), with values going from 2.3 nm for

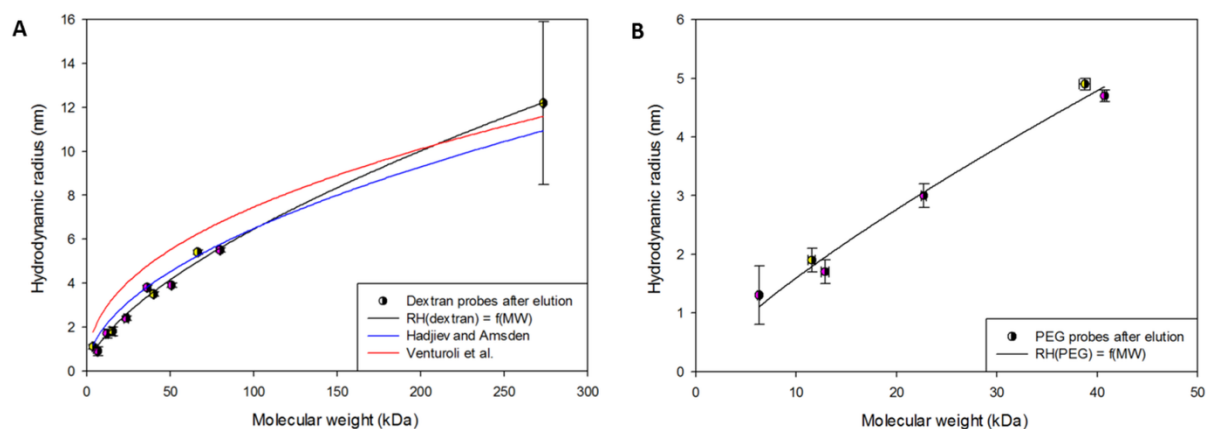
the PR5 probe to 7.2 nm for the PF40 probe. The conjugated fluorophores seemed to have no impact on the size of the FPs.

The  $R_H$  values obtained with the batch measurements were higher than those obtained on-line for all probes. Moreover, batch measurements gave values closer to the supplier's data. These differences can be attributed to the  $R_H$  calculation process. The curve allowing  $R_H$  determination is obtained after measurements of the fluctuations in the amount of light scattered by all the molecules in solution over time. This curve is then mathematically fitted to an autocorrelation function that allows the determination of the  $R_H$  of all molecules, providing that they differ by more than 3 to 5-fold in size. As unfractionated dextran and PEG FPs solutions contain molecules spanning on a variable size range, the calculated  $R_H$  in batch measurements can then be incorrectly estimated. For all the probes, the  $R_H$  values of the unfractionated samples seemed overestimated compared to those obtained on-line, with differences of more than 2 nm for the largest probes such as the PF40 (7.2 nm in batch mode vs  $4.9 \pm 0.1$  nm on-line) and the DR65-85 (7.7 nm in batch mode vs  $5.5 \pm 0.1$  nm on-line). The only probe showing a lower value for the batch measurement is the DF250 probe, which displayed multiple coeluting peaks after SEC elution.

However, even if  $R_H$  values were dependent on the treatment of DLS data and on the fractionation of the sample, both technics showed that PEG FPs displayed higher  $R_H$  values than dextran FPs of identical MW. This is consistent with the known spatial arrangement of these molecules (Figure 1): PEG molecules tend to coordinate the surrounding water molecules thanks to the presence of the many oxygen atoms along the polymer chain, thus increasing their size [38], while dextran molecules, having branched motifs, adopt a random coil conformation in water [39].

### **CORRELATION BETWEEN MW AND $R_H$**

Light scattering results showed that there is a relationship between the MW and the  $R_H$  of both dextran and PEG probes (Figure 3). Experimental data were correlated together, by fitting MW measurements with the  $R_H$  obtained after SEC analysis, because in this latter case, only the population of interest is analysed. Data from all probes were selected regardless of the conjugated fluorophores, as the presence of fluorescein or rhodamine impacted neither the MW nor the  $R_H$ . The mathematical model selected for fitting data was a two-parameter power function, as this fitting curve had previously been used in other studies proposing similar correlations on dextran molecules [40, 41]. Correlation curves obtained are shown in Figure 4.



**Figure 4.** Modelling of the probes' hydrodynamic radius as a function of their molecular weight. For dextran probes, MW and  $R_H$  are compared with equations calculated using values from the literature adapted to match with the units used in this study.

For dextran FPs, the mathematical fitting gave the following Eq. 1 with a very high correlation coefficient value of 0.99.

$$R_H(\text{Dextran}) = 0.3474 \times \text{MW}^{0.6347} \quad (\text{Eq. 1})$$

( $R_H$  is expressed in nm and MW in kDa).

This equation was compared to two other models found in literature based on measurements made on non-fluorescent [40] and fluorescein-labelled dextran molecules [41]. As shown in Figure 4, our model fits well with the one calculated by Hadjiev and Amsden for all the probes up to 80 kDa [41]. For higher MW values, the two plots start to diverge, but the calculated  $R_H$  values remain very similar. Venturoli *et al.* [40] model gives slightly higher  $R_H$  values for MW up to 80 kDa before the two plots start to converge. It is likely that the overestimation of the calculated  $R_H$  in Venturoli *et al.* [40] model is due to the measurements method used to determine both MW and  $R_H$ . Their equation was calculated from data obtained by Oliver *et al.* [42] who determined  $R_H$  values by carrying out DLS experiments in batch mode, a method that can provide higher measured values for dextran solutions, as evidenced by our results (Table 2). Eq. 1 thus shows consistency with literature data, and is applicable to both fluorescein and rhodamine-grafted dextran. It is likely that this model is also adapted to dextran FPs carrying other fluorophores, provided that the conjugated fluorophores have characteristics similar to the one used in this study.



To our knowledge, no equation has been proposed to estimate the  $R_H$  of a PEG FPs from its MW. The mathematical fitting, also based on a two-parameter power function, gave the following Eq. 2 with a high correlation coefficient value of 0.99:

$$R_{H(\text{PEG})} = 0.2574 \times \text{MW}^{0.7904} \text{ (Eq. 2)}$$

( $R_H$  is expressed in nm and MW in kDa)

Comparison of Eq. 1 and 2 shows that the power parameter is 0.7904 for PEG model whereas it is 0.6347 for dextran, indicating that, as observed, PEG probes'  $R_H$  increases much more rapidly than dextran probes'. Overall, considering both dextran and PEG FPs, a very accurate estimation of their  $R_H$  can be obtained from the MW, and vice-versa, by using the two proposed equations.

## CONCLUSIONS

Spectral and physical properties were assessed for dextran and PEG fluorescent probes of different sizes, conjugated with either fluorescein or rhodamine. The spectral properties of the 10 kDa probes showed that, in our condition of pH and concentration, the grafting on either dextran or PEG slightly modifies the fluorescence properties of both fluorescein and rhodamine. For both fluorophores, it was observed that the maximum emission wavelength of the PEG probes was approximately 5 nm higher than those of dextran probes. This underlines the importance of characterising precisely the spectral properties of any FPs before use.

Physical properties of the fluorescent probes were also studied, and both the MW and the  $R_H$  of the probes were measured using light scattering techniques. It was observed for both dextran and PEG probes that the hydrodynamic radius logically increases as the MW of the probes gets more important. However, this evolution is different for the two probes families since PEG probes'  $R_H$  increased more rapidly than those of dextran's. This can be explained by both the chemical properties and the spatial conformation of the molecules, and shows that the structure of a fluorescent probe is a very important parameter to take into account to assay its size, which is a critical criterion when studying molecular diffusion processes. Furthermore, we showed that  $R_H$  values could be inaccurately estimated depending on the measurements conditions. Supplier's data are close to the ones we have obtained performing DLS measurements on unfractionated samples, but they are likely overestimated due to the presence of other molecules that also scatter the light and so influence the final calculation.

This could be avoided by performing the measurements on the population of interest alone after elution on a SEC column. Using the empirical values obtained after elution of the probes, equations are proposed to determine the hydrodynamic radius of a dextran or PEG fluorescent probe based on its MW. To our knowledge, this is the first time such an equation is proposed for PEG molecules. These equations will provide scientists from different research fields a useful guideline to select the most appropriate dextran or PEG fluorescent probes.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

David Crônier is acknowledged for his help in performing SEC-MALLS experiments and analysing results. Authors would also like to thank Thierry Azoulay (Wyatt, France) for fruitful discussion on light scattering data interpretation. PhD thesis of MH was funded by Région Grand Est.

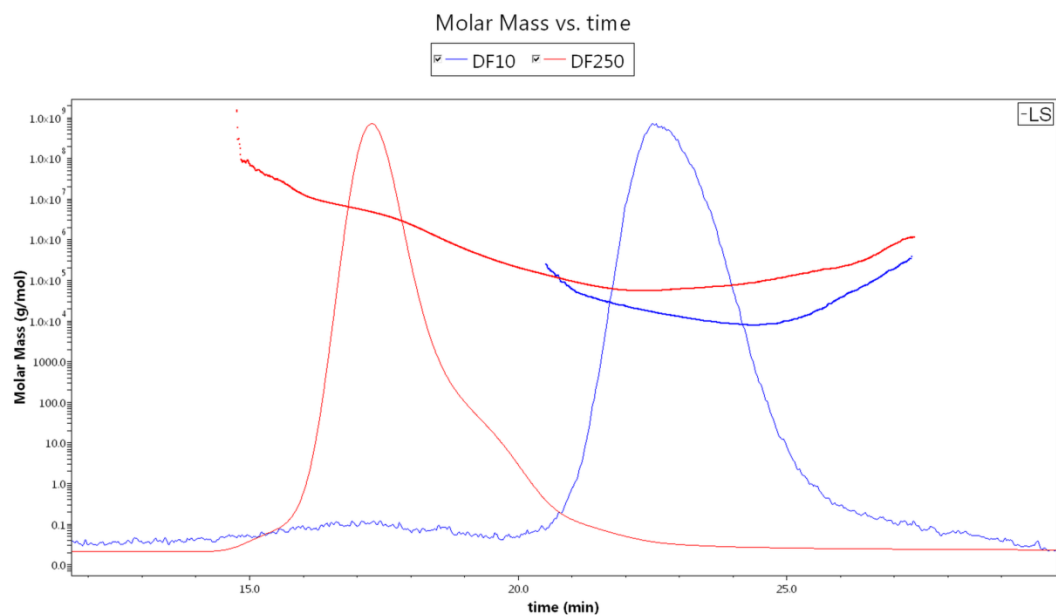
### **REFERENCES**

- [1] Marchetti A., *et al.*, *A measure of endosomal pH by flow cytometry in Dictyostelium*. BMC Research Notes, 2009, 2 (1), 7.
- [2] Haidekker M.A., Theodorakis E.A., *Molecular rotors - fluorescent biosensors for viscosity and flow*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2007, 5 (11), 1669-1678.
- [3] Tsien R.Y., *The green fluorescent protein*. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67, 509-544.
- [4] Piston D.W., Kremers G.J., *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends in Biochemical Sciences, 2007, 32 (9), 407-414.
- [5] Pietraszewska-Bogiel A., Gadella T.W.J., *FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology*. Journal of Microscopy, 2011, 241 (2), 111-118.
- [6] Axelrod D., *et al.*, *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. Biophysical Journal, 1976, 16 (9), 1055-1069.
- [7] Sprague B.L., McNally J.G., *FRAP analysis of binding: proper and fitting*. Trends in Cell Biology, 2005, 15 (2), 84-91.
- [8] Seymour F.R., *et al.*, *Determination of the structure of dextran by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Carbohydrate Research, 1976, 51 (2), 179-194.

- 
- [9] Naessens M., *et al.*, *Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2005, 80 (8), 845-860.
- [10] de Belder A.N., *Dextran*. Amherstham Biosciences, 2003.
- [11] Arfors K.-E., Hint H., *Studies of the microcirculation using fluorescent dextrans*. Microvascular Research, 1971, 3 (4), 340.
- [12] Schmued L., *et al.*, *In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine-dextran-amine, Fluoro-Ruby, within the CNS*. Brain research, 1990, 526 (1), 127-34.
- [13] Porat-Shliom N., *et al.*, *Liver kinase B1 regulates hepatocellular tight junction distribution and function in vivo*. Hepatology, 2016, 64 (4), 1317-1329.
- [14] Hagman J., *et al.*, *Probe diffusion in  $\kappa$ -carrageenan gels determined by fluorescence recovery after photobleaching*. Food Hydrocolloids, 2012, 29 (1), 106-115.
- [15] Hagman J., *et al.*, *Effect of gelatin gelation kinetics on probe diffusion determined by FRAP and rheology*. Biomacromolecules, 2010, 11 (12), 3359-3366.
- [16] Burke M.D., *et al.*, *Diffusion of macromolecules in polymer solutions and gels: a laser scanning confocal microscopy study*. Macromolecules, 2000, 33 (20), 7500-7507.
- [17] Silva J.V.C., *et al.*, *Diffusion behavior of dextrans in dairy systems of different microstructures*. Food Research International, 2015, 71, 1-8.
- [18] Shelat K.J., *et al.*, *Diffusion and viscosity in arabinoxylan solutions: Implications for nutrition*. Carbohydrate Polymers, 2010, 82 (1), 46-53.
- [19] Paës G., Chabbert B., *Characterization of arabinoxylan / cellulose nanocrystals gels to investigate fluorescent probes mobility in bio-inspired models of plant secondary cell wall*. Biomacromolecules, 2012, 13, 206-214.
- [20] Paes G., *et al.*, *Modeling progression of fluorescent probes in bioinspired lignocellulosic assemblies*. Biomacromolecules, 2013, 14 (7), 2196-2205.
- [21] Lopez-Sanchez P., *et al.*, *Diffusion of macromolecules in self-assembled cellulose/hemicellulose hydrogels*. Soft Matter, 2015, 11 (20), 4002-4010.
- [22] Paës G., *et al.*, *Exploring accessibility of pretreated poplar cell walls by measuring dynamics of fluorescent probes*. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10 (1).
- [23] Sandrin D., *et al.*, *Diffusion of macromolecules in a polymer hydrogel: from microscopic to macroscopic scales*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016, 18 (18), 12860-12876.
-

- 
- [24] Herzberger J., *et al.*, *Polymerization of ethylene oxide, propylene oxide, and other alkylene oxides: synthesis, novel polymer architectures, and bioconjugation*. Chemical Reviews, 2016, 116 (4), 2170-2243.
- [25] Dinç C.Ö., *et al.*, *Solubility profiles of poly(ethylene glycol)/solvent systems. II. comparison of thermodynamic parameters from viscosity measurements*. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 117 (2), 1100-1119.
- [26] Knop K., *et al.*, *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 49 (36), 6288-6308.
- [27] Fruijtier-Pöloth C., *Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products*. Toxicology, 2005, 214 (1–2), 1-38.
- [28] Hutanu D., *Recent applications of polyethylene glycols (PEGs) and PEG derivatives*. Modern Chemistry & Applications, 2014, 02 (02).
- [29] FAO/WHO, *Evaluation of certain food additives. Twenty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. World Health Organization Technical Report Series, 1980, (648).
- [30] Peck E.M., *et al.*, *Rapid macrocycle threading by a fluorescent dye-polymer conjugate in water with nanomolar affinity*. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137 (27), 8668-8671.
- [31] Wang X., *et al.*, *High-fidelity hydrophilic probe for two-photon fluorescence lysosomal imaging*. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132 (35), 12237-12239.
- [32] Vaidya A.A., *et al.*, *Strength of adsorption of polyethylene glycol on pretreated Pinus radiata wood and consequences for enzymatic saccharification*. Biomass & Bioenergy, 2014, 70, 339-346.
- [33] Donaldson L.A., *et al.*, *Nanoscale interactions of polyethylene glycol with thermo-mechanically pre-treated Pinus radiata biofuel substrate*. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111 (4), 719-725.
- [34] Doucet G.J., *et al.*, *Matrix fluorescence photobleaching recovery for polymer molecular weight distributions and other applications*. Macromolecules, 2006, 39 (26), 9446-9455.

- 
- [35] Morris G.A., *et al.*, *On hydrodynamic methods for the analysis of the sizes and shapes of polysaccharides in dilute solution: A short review*. Food Hydrocolloids, 2014, 42, 318-334.
- [36] Sjöback R., *et al.*, *Absorption and fluorescence properties of fluorescein*. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1995, 51 (6), L7-L21.
- [37] Pu Y., *et al.*, *Molecular weight kinetics and chain scission models for dextran polymers during ultrasonic degradation*. Carbohydrate Polymers, 2017, 156, 71-76.
- [38] Pasut G., *et al.*, *Polyethylene glycols: An effective strategy for limiting liver ischemia reperfusion injury*. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22 (28), 6501-6508.
- [39] Antoniou E., *et al.*, *Solvent effects on polysaccharide conformation*. Carbohydrate Polymers, 2010, 79 (2), 380-390.
- [40] Venturoli D., Rippe B., *Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005, 288 (4), F605-F613.
- [41] Hadjiev N.A., Amsden B.G., *An assessment of the ability of the obstruction-scaling model to estimate solute diffusion coefficients in hydrogels*. Journal of Controlled Release, 2015, 199, 10-16.
- [42] Oliver J.D., *et al.*, *Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with Ficoll*. Journal of the American Society of Nephrology, 1992, 3 (2), 214-28.

**SUPPORTING INFORMATION**

**Figure S1. Light scattering profiles of the DF10 and DF250 probes.** Light scattering signal was normalised for both probes, which explains why the baseline of the DF10 probe appears noisier than the baseline of DF250 probe. Bold lines represent the MW calculated from the light scattering signal during elution.



# **CHAPITRE 3**

## **RÉSUMÉ ÉTENDU**

L'étude des relations entre les facteurs caractéristiques de la biomasse et sa susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique a montré l'influence de la structure et de la composition de la lignine, ainsi que celle de la nanoporosité sur l'activité des enzymes au sein des parois. Ces facteurs sont également susceptibles d'impacter la mobilité de ces enzymes dans la matrice pariétale : une porosité trop faible constitue un obstacle à la diffusion des enzymes à travers certaines structures, alors que la lignine influe sur l'accessibilité chimique des enzymes en les fixant de manière non-spécifique et non-productive.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'évolution de la diffusion de sondes fluorescentes au sein de la paroi d'échantillons de peuplier soumis aux prétraitements hydrothermique et au liquide ionique, au cours de la saccharification.

Les études de mobilité des sondes fluorescentes ont été réalisées avec trois sondes PEG-rhodamine dont le  $R_H$  est de 1,3 nm, 1,7 nm et 3,0 nm. Le choix de ces sondes a été effectué en se basant sur des données de la littérature rapportant des mesures de  $R_H$  effectuées sur des enzymes lignocellulolytiques. Nous avons sélectionné les sondes en se basant sur les valeurs de  $R_H$  obtenues pour les solutions de sondes non fractionnées, car les données recueillies sur les enzymes ont été obtenues dans les mêmes conditions. Toutefois, nous avons ensuite utilisé les valeurs de  $R_H$  obtenues par analyse après élution pour s'affranchir du biais observé dans le chapitre 2.

Parmi toutes les combinaisons de biomasse et de prétraitement disponibles, le choix de d'étudier ces échantillons en particulier a été effectué au regard des différences de rendement de saccharification observées dans le Chapitre 1. Les taux de glucose libéré après 96 h d'hydrolyse pour les échantillons de peuplier prétraités étaient situés entre ceux de la paille de blé et du miscanthus, et donc plus susceptibles d'être représentatifs de l'ensemble des biomasses. Les échantillons étudiés ici présentaient toutefois des différences intéressantes en termes de composition et de structure.

Les cinétiques de saccharification des différents échantillons ont montré une libération de glucose plus rapide et plus importante pour les échantillons prétraités. Les cinétiques de ces échantillons présentent toutefois des différences importantes après deux heures induisant des écarts importants dans les rendements après prétraitement hydrothermique (60%) et au liquide ionique (40%) par rapport aux échantillons non traités (30%).

L'évolution de la composition chimique au cours de la saccharification a montré un enrichissement progressif en lignine des échantillons non traités et prétraités au liquide



ionique au fur et à mesure que la cellulose est dégradée. Pour les échantillons prétraités de manière hydrothermique, la teneur en lignine diminue fortement après 15h, ce qui explique probablement le maintien d'un plus haut taux de libération du glucose pendant l'hydrolyse.

L'étude de la mobilité des sondes fluorescentes, et plus spécifiquement de leur fraction mobile au sein des parois, a montré un impact important du prétraitement et de la taille des sondes, et une influence beaucoup plus modérée du degré de dégradation enzymatique. Ces effets ont été confirmés statistiquement par la réalisation d'un plan d'expériences factoriel, suggérant un effet plus important du prétraitement sur la structure et l'organisation des parois.

L'effet moindre du temps de saccharification sur la diffusion des sondes pourrait être relié à une modification de la structure des fractions pariétales résiduelles. La lignine, dont la quantité relative augmente au fur et à mesure que les polysaccharides sont dégradés, pourrait ainsi subir une modification de sa conformation spatiale sous l'effet de l'élimination des polysaccharides adjacents, lui permettant ainsi de s'étaler et de combler l'espace libéré. Cela pourrait causer un nouvel encombrement stérique empêchant les sondes de diffuser plus librement, voire modifier l'affinité des sondes pour la lignine.

La porosité des échantillons a été étudiée uniquement avant et après prétraitement. Les prétraitements induisent tous les deux une diminution de la proportion de pores avec un diamètre inférieure à 5 nm, et une augmentation de toutes les autres gammes de pores étudiées, de manière beaucoup plus importante dans le cas du prétraitement hydrothermique.

L'étude des corrélations entre le rendement de saccharification, la porosité des échantillons et la fraction mobile de chacune des trois sondes a révélé l'influence majeure des gammes de pores dont le diamètre est inférieur à 20 nm. Le rendement de saccharification présente également de fortes corrélations avec la fraction mobile des sondes de  $R_H$  2,3 nm et 3,5 nm. Pour ces sondes, des corrélations statistiquement significatives sont observées avec les pores dont le diamètre est 5 fois supérieur à celui des sondes.

L'ensemble de ces données montre que les pores dont le diamètre se situe entre 5 et 20 nm ont la plus grande influence sur la saccharification, puisqu'ils permettent une meilleure diffusion des enzymes. Toutefois, la mobilité des enzymes n'est pas impactée uniquement par leur capacité à diffuser dans des pores de taille suffisamment grande, mais également par leur interaction avec la lignine. En effet, le fait que la fraction mobile des sondes ne corrèle significativement qu'avec les gammes de pores au moins 5 fois supérieures laissent penser qu'en-deçà de cette taille de pores, les interactions des enzymes avec la lignine provoquent un encombrement des pores pour les autres enzymes qui ne peuvent donc plus diffuser.

---

## **Analysis of poplar porosity and accessibility reveals nanopores govern saccharification**

Mickaël Herbaut, Aya Zoghalmi, Gabriel Paës

Fractionation of AgroResources and Environment (FARE) laboratory, INRA, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

Key-words: biomass, pretreatment, saccharification, polyethylene glycol rhodamine, FRAP, accessibility, porosity

### **ABSTRACT**

Improving lignocellulolytic enzymes diffusion and accessibility to their substrate in the plant cell walls is recognized as a critical issue for optimising saccharification. Although many biomass features are considered as detrimental to saccharification, enzymes dynamics within the cell walls remains poorly understood. To address this issue, poplar fragments were submitted to hot water and ionic liquid pretreatments selected for their contrasted effects on both lignocellulose structure and composition. In addition to chemical composition and porosity analyses, the diffusion of polyethylene glycol probes of different sizes was measured at three different time points during the saccharification. Probes' diffusion was mainly affected by their size and the initial pretreatments and only slightly evolved during saccharification, meaning that the removal of polysaccharides does not allow a better diffusion that might be hindered by changes in lignin conformation, whose relative amount increased over time. Altogether, architecture of poplar cell wall evolved much less drastically than its chemical composition. Importantly, an increase in porosity induced an increase in probes' diffusion and a strong correlation was obtained when porosity was at least 5 times the size of the probes. Consequently, measuring accessibility of 1.3-1.7 nm probes by FRAP was found to be a good estimate of poplar digestibility together with the measurement of porosity on the range 5-20 nm. This has to be related to other biomass features such as lignin content and composition that could prevent probes' diffusion through non-specific interactions.

## **INTRODUCTION**

Lignocellulosic biomass such as dedicated crops or agricultural and wood residues is one of the most abundant yet underutilised bioresource in the world and offers substantial possibilities to overcome our reliance on fossil carbon resources [1-3]. Cellulose, hemicelluloses and lignin contained in the plant cell walls can be depolymerised to produce a large range of compounds such as biofuels, fibres, plastics or chemicals that are currently industrially produced through petrochemical processes [4, 5]. However, both composition and structural layout of the plant cell walls hamper lignocellulolytic enzymes progression and activity, making biomass recalcitrant to enzymatic hydrolysis [6]. Pretreatments are thus mandatory steps prior to saccharification in order to disorganise the plant cell wall structure, to improve enzymes access and activity to their substrate thus optimising the conversion of lignocellulose [5, 7].

Several compositional and structural plant cell walls' features are recognised as factors impacting saccharification independently of biomass species and pretreatment [6]. Lignin content, composition and structure strongly limit biomass deconstruction both by restricting the access to the polysaccharide and by non-productively binding enzymes [8]. Cellulose accessible surface is also an important parameter as it governs enzymes binding to its substrate [9, 10]. Global porosity influences enzymes diffusion inside the plant cell wall and is possibly directly correlated to biomass initial digestibility [11].

Different techniques can be used to assess lignocellulose accessibility through porosity measurements such as solute exclusion [12], Simon's stain method [9, 13], nitrogen adsorption [14, 15], low field nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [16, 17] or electron tomography [18]. However, these techniques only give an overview of structural changes that could potentially affect enzymes diffusion and binding to their substrate, and do not directly assess enzymes dynamics that could be impacted by other features such as interactions with lignin. The use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) techniques can allow measuring enzymes behaviour inside the plant cell walls by direct observations of fluorescently-labelled enzymes or fluorescent probes. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) technique was recently used to assess the diffusion behaviour of dextrans [19] and labelled-cellulases [20] in plant cell wall bioinspired assemblies. Mobility of *Bacillus subtilis* xylanases on wheat flour arabinoxylan [21] and fluorescent probes inside pretreated poplar samples [22] were also investigated directly using CLSM techniques.

In this study, we have used CLSM to assess the dynamic behaviour of rhodamine-labelled polyethylene glycol in untreated and pretreated poplar fragments, to explore lignocellulose accessibility. The effects of the different pretreatments on both biomass porosity and enzymatic hydrolysis were measured. Hydrolysed poplar fragments were collected at different time point during the saccharification so that their composition and accessibility measured by FRAP were assayed over time. The influence of the pretreatments, the probes' size and the porosity was calculated in order to determine which parameter influences enzymes dynamics during the saccharification.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant materials**

Poplar (*Populus nigra x deltoides*) was cultivated on experimental plots in Estrées-Mons (France) and harvested 2 years after planting. Fragments 2 × 0.6 × 0.2 cm in size were cut from branches using a razor blade. Ramification regions were put aside in order to avoid tension wood.

### **Pretreatments**

#### **Hot water pretreatment**

Hot water (HW) pretreatment was performed on biomass fragments using deionized water at a ratio of 1:30 (500 mg of biomass for 15 mL of deionized water). Pretreatments were performed using mineralisation bombs equipped with Teflon cups (Parr). Samples were kept at 180°C for 60 minutes in an oil bath. The fragments were then cooled down in ice and thoroughly washed in deionised water and 50% ethanol.

#### **Ionic liquid pretreatment**

Ionic liquid (IL) pretreatment was performed on biomass fragments using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate with a biomass loading of 6% (w/v). Pretreatments were carried out using mineralisation bombs equipped with Teflon cups (Parr). Samples were kept at 130°C for 40 minutes in an oil bath. The fragments were then cooled down in ice, regenerated in deionised water at 4°C, filtered using 20 volumes of deionized water and thoroughly washed in deionised water and 50% ethanol in order to remove any ionic liquid.

### **Enzymatic hydrolysis**

Saccharification experiments were performed using the Cellic® CTec 2 cocktail kindly provided by Novozymes (Denmark) in a 0.1 M citrate buffer at pH 4.8 containing 0.02% sodium azide with a biomass loading of 2% (w/v) and an enzyme loading of 90 FPU/g of biomass. Experiments were stopped after different saccharification durations (0 h, 15 h and 96 h) and fragments were recovered from the reaction medium and thoroughly washed with deionised water for further analysis. The glucose released in the reaction medium during the hydrolysis was measured by anionic exchange chromatography as previously described<sup>1</sup>.

### **Polysaccharides analysis**

The overall fragments' sugar content was assessed by acid hydrolysis as described previously [23]. Samples collected after 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis were milled to a granulometry of 80 µm and then submitted to a two-step H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hydrolysis: 125 µL of a 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution were added to 10 mg of biomass samples for 2 h at room temperature under stirring, then acid was diluted to 1 M for another 2 h-incubation at 100°C. Hydrolysed monomeric sugars were quantified by HPAEC-PAD<sup>1</sup>.

### **Klason lignin quantification**

The acid insoluble lignin content of the samples collected after 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis was gravimetrically quantified by the Klason method as previously described [24].

### **Nitrogen content determination**

Fragments collected at 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis were milled to a granulometry of 80 µm before being oven-dried overnight at 80°C, and 5 to 7 mg were weighted in tin capsule. Capsules were analysed using a EURO EA elemental analyser (Eurovector, Milan, Italy) equipped with a thermal conductivity detector. The samples were fully oxidized and nitrogen was converted into N<sub>2</sub> and quantified using the Eager 200

---

<sup>1</sup> Herbaut *et al.*, Multimodal analysis of pretreated biomass highlights generic markers of biomass recalcitrance (2017).

software (Carlo Erba, Italy). Protein amount in the plant cell walls was then calculated by applying a nitrogen-to-protein conversion factor of  $\times 6.25$  [25].

### **Porosity measurements**

Fragments' porosity was assessed by low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxation measurements. 1 cm-long biomass fragments were soaked in water for 96 h prior to LF-NMR analysis using a Minispec mq20 spectrometer (Bruker) as described previously<sup>1</sup>.

### **Fluorescent probes mobility measurements**

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) was used to assess fluorescent probes mobility by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Experiments were performed using a Leica TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with a 63  $\times$  oil-immersion objective and 488 nm and 552 nm laser lines in a controlled-temperature room ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). 60  $\mu\text{m}$ -thick sections of the different samples were cut from polyethylene-glycol embedded fragments, thoroughly washed and incubated overnight in 0.01% fluorescent probes solutions. Sections were then mounted in the probe solutions between slide and cover slip sealed with nail polish for microscopic analysis. Acousto-Optical Tunable Filters (AOTF) were set to collect fluorescence emission from 562 to 650 nm. Images with a size of  $128 \times 256$  pixels were acquired using a  $\times 4.5$  zoom factor with a scan frequency of 1 400 Hz. A circular region of interest (ROI1) with a diameter of 3  $\mu\text{m}$  was selected for bleaching. This ROI1 was located in the xylem of the poplar sections and centred on the secondary wall of early wood cells. The fluorescence intensity in ROI1 was corrected with measurements performed in three control ROIs located nearby, and normalized to get a value of 1 before bleaching and of 0 immediately after bleaching according to (Eq. 1) where  $I_t$  is the normalized fluorescence intensity of ROI1 at time  $t$ ,  $I_0$  is the normalized intensity of ROI1 immediately after bleaching and  $I_{pre}$  is the normalized intensity of ROI1 before the bleaching step.

$$R(t) = \frac{I_t - I_0}{I_{pre} - I_0} \text{ (Eq.1)}$$

Ten scans were taken every 51 ms with the 552 nm laser line set to a power of 1% before the samples was bleached. Then 20 short pulses were applied to ROI1 every 51 ms with both 488 nm and 552 nm laser lines set to 100% power. The total duration of the bleaching step

(1 s) was short enough to consider that recovery during bleaching was negligible [26]. Fluorescence recovery was measured with the 552 nm laser line set to a 1% power by taking 200 images with a 51 ms time delay, then 300 images with a 2 s time delay for a total recovery measurement of approximately 10 minutes. FRAP experiments were repeated 8 times on each samples, at different positions, and an average recovery curve was calculated for probes measurement analyses. As the diffusion was considered to occur mainly in the XY plane, a double exponential equation with four parameters  $a$ ,  $b$ ,  $c$  and  $d$  (Eq.2) was used to model the averaged curve with a calculated coefficient of determination  $R^2$  of the fitness that was always above 0.99 (SigmaPlot 12.0, Systat Software, Chicago, IL, United States).

$$R(t) = a(1 - e^{-bt}) + c(1 - e^{-dt}) \text{ (Eq. 2)}$$

The mobile fraction of the probe MF is equal to the plateau value obtained when fluorescent recovery remains unchanged. In mathematical term, MF corresponds to the fluorescence recovery when  $t \rightarrow \infty$ , so it could be calculated as a simplification of Eq. 2 (Eq.3 ).

$$\text{MF} = a + c \text{ (Eq. 3)}$$

### **Data and statistical analysis**

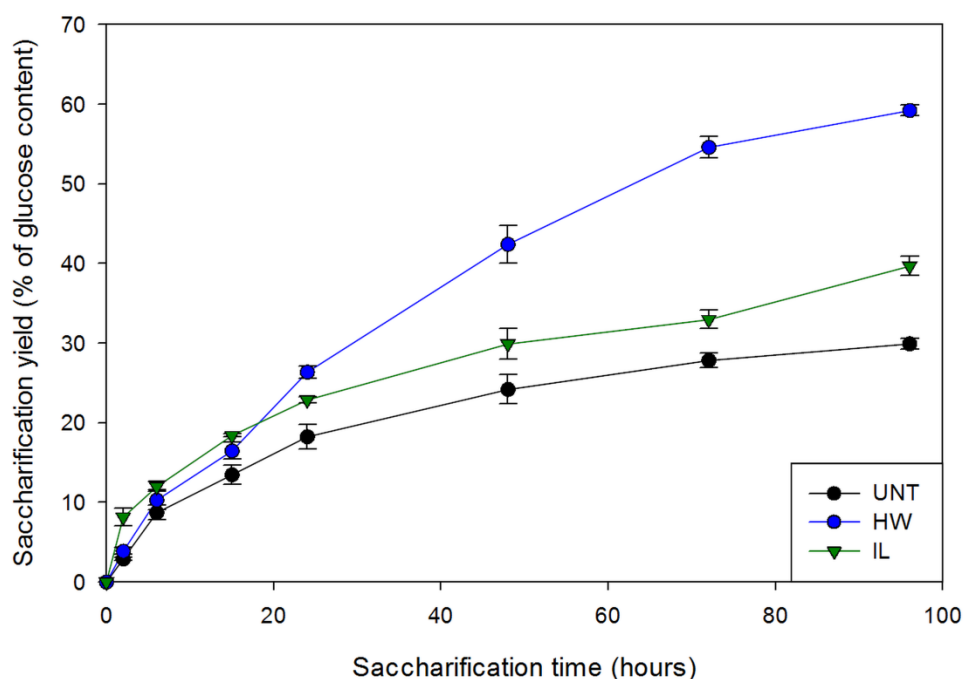
Saccharification and wet chemistry experiments were carried out in triplicates and the results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. MFs are expressed as mean  $\pm$  standard deviation calculated from the average of 8 single recovery curves. An analysis of variance (ANOVA) was realised on the experimental values followed by a Tukey test with a significance level of probability set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using SigmaPlot 12.

Full factorial experiments were performed using the Design-Expert 8.0 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA). MFs experimental data (mean  $\pm$  standard deviation) were computed with three principal factors (pretreatments, probes size and saccharification time) and all possible single and interaction  $F$ -values, which are ratios of the variations between the samples means and variations within the samples, were calculated, as well as their relative  $p$ -values, according to a previous study [19].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of pretreatments on saccharification

HW and IL pretreatments were selected due to their contrasted effects on plant cell walls' structure and composition. HW pretreatment induces a partial removal of both hemicelluloses and lignin with the remaining lignin undergoing depolymerisation and condensation reaction [27], whereas IL can solubilize lignocellulose, partially removing lignin and making cellulose more amorphous and easier to hydrolyse [28, 29]. These contrasted effects were evidenced by the different sample weight losses of 32% and 9% after HW and IL pretreatments respectively. Figure 1 displays the kinetic profiles of glucose release over the 96 h enzymatic hydrolysis of both untreated and pretreated poplar samples. Glucose was expressed as a percentage of the initial glucose content of the samples that had been previously determined<sup>1</sup>. The initial glucose content of the samples was 43%, 52% and 46% of dry matter for the untreated, HW- and IL-pretreated poplar samples respectively.



**Figure 1.** Kinetic release of glucose during enzymatic hydrolysis of the different poplar samples. Error bars indicate standard deviations. UNT: untreated, HW: Hot Water, IL: Ionic Liquid.

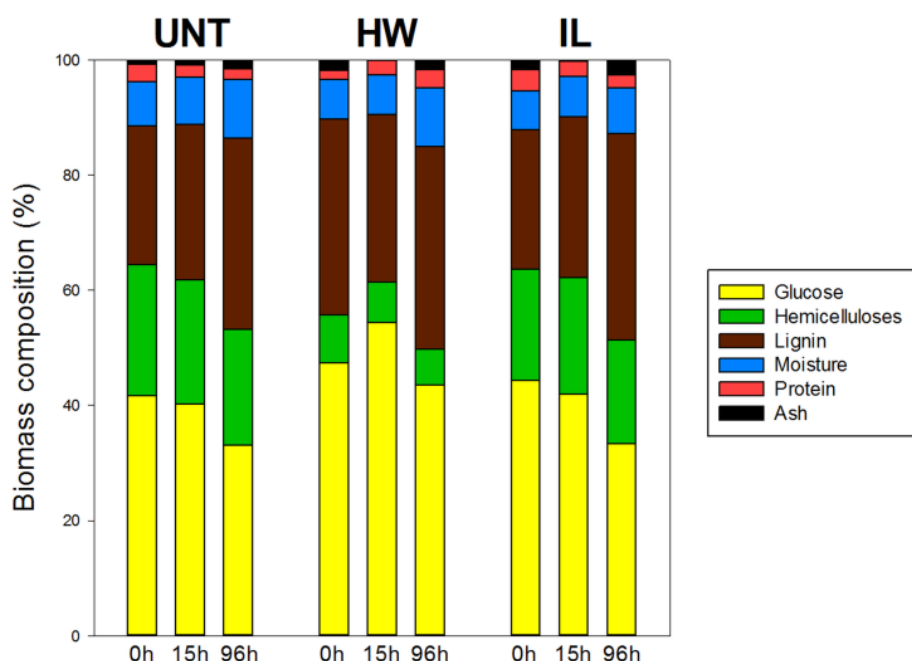
Untreated samples showed an increase in glucose release over time progressively slowing down after 6 h. The plateau of the curve was almost reached after 72 h of enzymatic



hydrolysis with a final yield of 30% of the initial glucose content. Both HW and IL pretreatment allowed an improvement of the saccharification, but to different extents. Kinetics of HW-pretreated and untreated samples were similar for the first 6 h, but glucose release rate only slowed down after 72 h for the HW-pretreated sample, resulting in a final yield of 60% of the initial glucose content. For IL-pretreated samples, the glucose release during the first 2 h of reaction was around 2.5 times more important than what was observed with the two other samples. The reaction then slowed down and followed a trend similar than that of untreated samples. The final saccharification yield was 40% of the initial glucose content for IL-pretreated samples.

### Evolution of the chemical composition during the saccharification

The overall chemical composition of the untreated and pretreated samples was assessed at different time points during the saccharification (Figure 2). In addition to the initial ( $t = 0$  h) and final time points ( $t = 96$  h), an intermediary time point at 15 h was selected as half of the glucose yield of the untreated samples was reached after 15 h (Figure 1). The differences in glucose release between the untreated and the two pretreated samples also started to become more important at 15 h (Figure 1).



**Figure 2.** Dynamical assessment of the chemical composition of the different samples during saccharification. Contents are expressed as a percentage of dry matter. UNT: untreated, HW: Hot Water, IL: Ionic Liquid.

Both pretreatments induced an increase in glucose content from ca. 41% in untreated samples to 47% ( $p < 0.001$ ) and 44% ( $p = 0.002$ ) in the HW- and IL-pretreated samples respectively. As the effect of these pretreatments on the composition of poplar samples were already analysed previously<sup>1</sup>, it will not be discussed here in more details.

For the untreated samples, the relative glucose and hemicelluloses content remained similar during the first 15 h whereas the lignin content slightly increased (from 24% to 27%). As half of the final amount of glucose was produced during the first 15 h of hydrolysis (Figure 1), it is likely that cellulose and hemicelluloses were degraded in the same proportion as the Cellic ® CTec 2 cocktail also contains some hemicellulases. After 96 h of saccharification, a decrease in the cellulose content was observed (from 41% to 33%) and a smaller reduction of the hemicelluloses content was also quantified. On the contrary, the lignin content kept going up to 33%. The increase in relative lignin content revealed that lignin was probably not or little affected by the enzymatic hydrolysis.

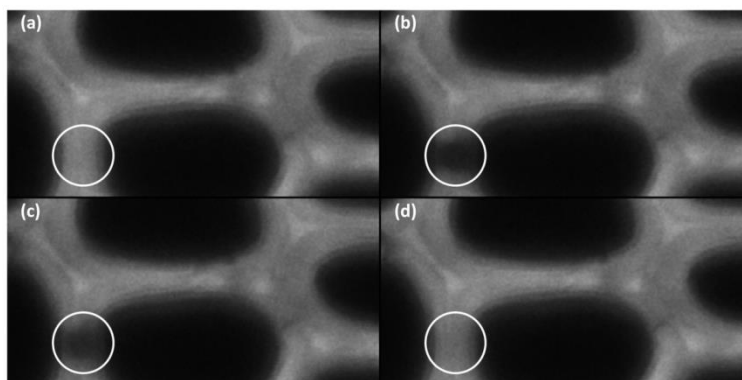
Similar observations could be made for the IL-pretreated samples, with the glucose content significantly decreasing only after 15 h (from 44% to 33%) while hemicelluloses content remained unchanged. Interestingly, the lignin content remained similar during the first 15 h of reaction ( $p = 0.072$ ), whereas more glucose was released from the samples (Figure 1). This removal of lignin during the first 15 h of saccharification could be a consequence of some modifications of the lignin features. Previous analyses showed that the S/G ratio of poplar samples increased after IL-pretreatment while the G-units content decreased<sup>1</sup>. A relatively higher proportion of S-units that are more likely to establish labile  $\beta$ -O-4' linkages due to the steric hindrance of the methoxy groups on the aryl moieties [30] could make lignin more prone to partial degradation under the mild conditions of enzymatic hydrolysis.

HW-pretreated samples showed some differences in the evolution of their composition. The observed glucose content decrease after 96 h of hydrolysis (from 47% to 43%) was less important than that of IL-pretreated samples (from 44% to 33%). Unexpectedly, glucose content was even increased during the first 15 h (from 47% to 54%,  $p = 0.001$ ), because of the reduction of the lignin content during the first 15 h of reaction, from 34% to 30% ( $p = 0.026$ ). Indeed, the HW pretreatment caused a partial condensation of the lignin, which was partially aggregated to form small droplets that could be observed by electron microscopy<sup>1</sup>. It is likely that this reorganized lignin was removed from the samples as the cell walls' polysaccharides, especially the cellulose, were hydrolysed, causing a decrease of the lignin content and an apparent increase in glucose content. This decrease in lignin content during the first 15 h

might be the reason why the hydrolysis kinetics of the HW-pretreated samples retained a faster rate than those of untreated and IL-pretreated samples (Figure 1). After 15 h of reaction, the evolution of the chemical composition became similar to what was previously described, with a decrease in glucose content and an increase in relative lignin content (from 30% to 35%,  $p = 0.018$ ).

### **Evolution of the accessibility during the saccharification**

In order to better understand how pretreatments impacted the saccharification efficiency, FRAP experiments were performed to study the mobility of PEG-rhodamine probes of different sizes within ROIs centred on the secondary cell walls of early wood cells which are the major constituents of fibres in wood [31](Figure 3).



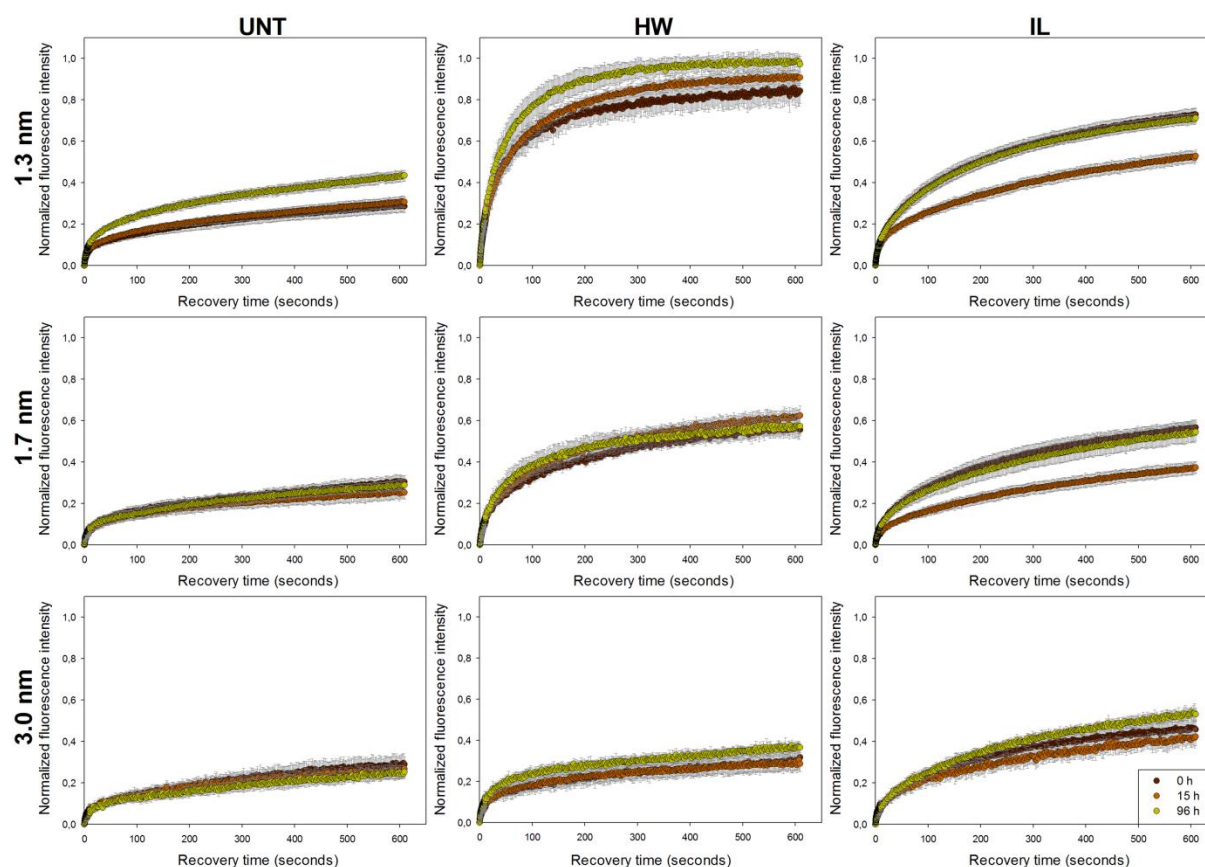
**Figure 3.** Visualisation of the course of a FRAP experiments. These images displayed the recovery of fluorescence of the 1.3 nm PEG-rhodamine probe within a ROI (white corcles) in an IL-pretreated poplar section. (a) before bleaching, (b) immediately after bleaching, (c) 10 seconds after bleaching, (d) 10 minutes after bleaching.

PEG-rhodamine probes were selected as they were demonstrated to bind lignin through hydrophobic interactions thus preventing unproductive binding of enzymes. PEG thus allows an increase of the glucose yield when it is added to a saccharification reaction [32, 33]. Also, PEG interactions with lignin derived from secondary walls samples obtained after steam explosion pretreatment have been quantified using CLSM [34]. PEG-rhodamine probes thus mimic the interactions of proteins with lignin while inducing no chemical modification due to the absence of catalytic activity, making them ideal probes to assess enzymes dynamics in cell walls. Three rhodamine-PEG probes were selected, with different hydrodynamic radii ( $R_H$ ) as

determined by dynamic light scattering (DLS)<sup>2</sup>. DLS was used to assess the size of some important lignocellulolytic enzymes. An endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Talaromyces emersonii* was found to have a  $R_H$  of ca. 2 nm [35], while the endo-1,4- $\beta$ -xylanase II and the cellobiohydrolase I, the most abundant enzymes produced by *T. reesei* [36], displayed  $R_H$  values of 3.5 nm [37] and  $4.2 \pm 0.5$  nm [38] respectively. Nevertheless, these values were measured using unfractionated enzymes solutions, which were shown to induce some overestimation of the  $R_H$  values as they were calculated from the light scattered by all diffusing species in solution. This could be avoided by a prior elution on a size-exclusion chromatography column, allowing measuring only the population of interest, as observed in a previous study<sup>2</sup>. We then selected PEG probes with  $R_H$  values (2.3, 3.5 and 4.8 nm as determined by DLS on the unfractionated solutions) covering the range size of the previously cited enzymes. However, we decided to take into account the  $R_H$  values measured for this probes after elution on a SEC column, which were 1.3, 1.7 and 3.0 nm respectively. Those values were consistent with the  $R_H$  value of 2.5 nm measured after elution of a endoglucanase from *Pichia pastoris* [20], but also with the nominal diameter of 5.1 nm which is generally admitted to be representative of the diameter of cellulase [39]. Accessibility of the three PEG-rhodamine probes was measured by FRAP in the untreated and pretreated samples at the three previously selected saccharification time-points (0 h, 15 h and 96 h) (Figure 4).

---

<sup>2</sup> Herbaut *et al.*, A guide to dextran- and PEG-based fluorescent probes (2017).

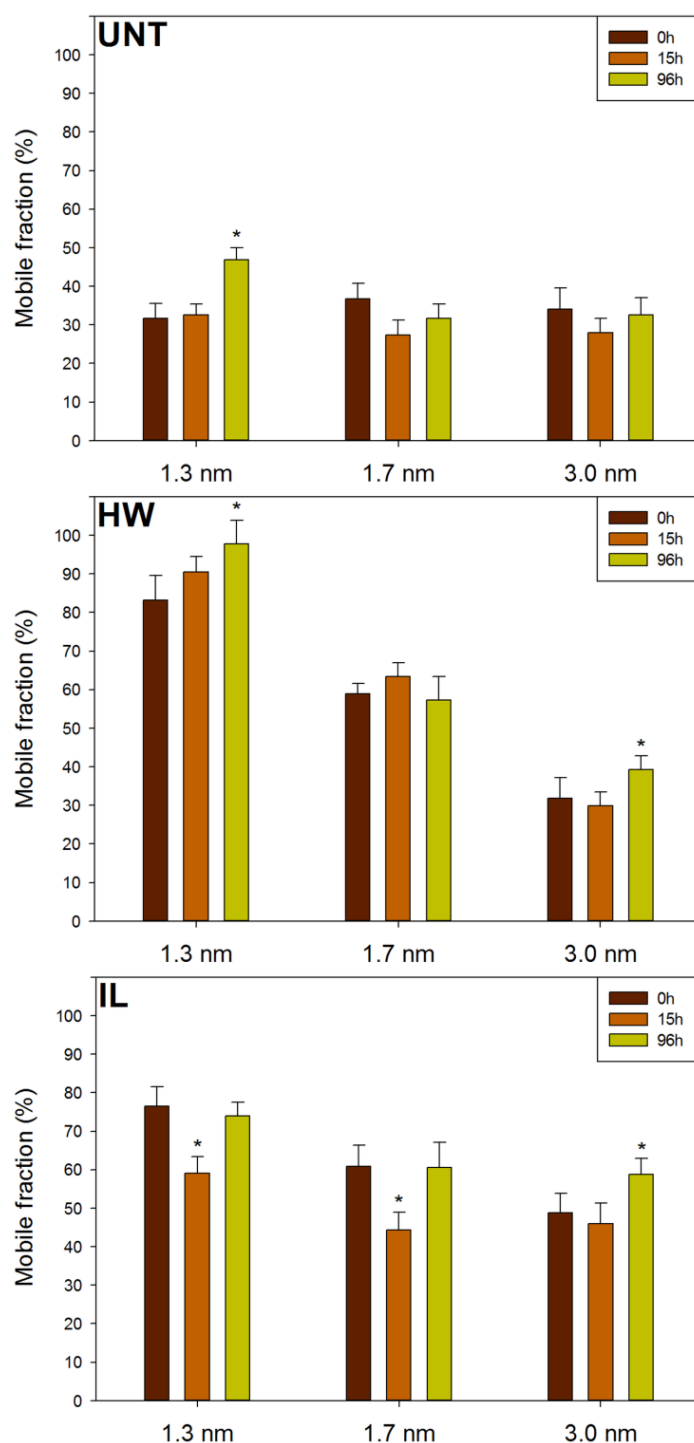


**Figure 4.** Fluorescence recovery curves of the different PEG-rhodamine probes measured on the untreated and pretreated samples after 0 h (brown), 15 h (orange) and 96 h (green) of enzymatic hydrolysis. Error bars represent the standard deviation between 8 recovery replicates. UNT: untreated, HW: Hot Water, IL: Ionic Liquid.

The recovery curves of the probes were very similar in all untreated samples, with the only exception of the 1.3 nm probes whose recovery was more important after 96 h of hydrolysis. In comparison, both HW and IL pretreatments induced an enhancement of fluorescence recovery for all probes. The final rate of recovery of the 3.0 nm probes in the HW-pretreated samples was similar to that of untreated samples, but fluorescence increased more quickly in the early phase of the recovery. Overall, fluorescence increase was more rapid in HW-pretreated samples, suggesting a faster diffusion of the probes. Probes' size also seemed to have an influence on fluorescence recovery for pretreated samples: the smaller the probe, the higher the recovery, with variations essentially depending on pretreatment. Effect of saccharification time was not essential and could only be deciphered for the 1.3 nm probe. It is noteworthy to mention that none of the recovery curves perfectly reached a plateau except the curves related to the diffusion of the 1.3 nm probes in the HW-pretreated samples. Equilibrium between bleached and non-bleached fluorescent probes was not reached yet after

10 minutes. Indeed, a two-phase diffusion was observed for all probes, with a fast initial recovery followed by a slowed down increase in fluorescence probably caused by interaction with lignin.

In order to evaluate quantitatively these differences, the experimental recovery curves were mathematically fitted to quantify the mobile fraction (MF) of the probes which is a measurement of the proportion of probes that can move freely inside the sample (Figure 5).



**Figure 5.** Mobile fractions of the different PEG-rhodamine probes measured in untreated and pretreated samples after 0 h, 15 h and 96 h of enzymatic hydrolysis. Error bars represent the standard deviations of the mobile fraction calculated from the averaged recovery curve. Asterisks indicate statistically significant differences between the MF of a probe at a considered saccharification time-point with its corresponding MF at 0 h. UNT: untreated, HW: Hot Water, IL: Ionic Liquid.

Both HW and IL pretreatments induced an increase in MF of the different probes, but with different trends. While the MF of the 1.3 nm probe was more important after HW pretreatment than after IL pretreatment, both pretreatments allowed a similar increase in the MF of the 1.7 nm probe. Only the IL pretreatment allowed a significant MF increase ( $p < 0.001$ ) of the 3.0 nm probes. Probes' size seemed to have no influence on the MF in untreated samples as the MFs of the three probes were similar. After pretreatments, a decrease in MF could be observed as the probes' size increased, going from 83% for the 1.3 nm probes to 32% for the 3.0 nm probe in the HW-pretreated samples and from 77% for the 1.3 nm probe to 49% for the 3.0 nm probe in the IL-pretreated samples.

The evolution of MF was also assessed during the saccharification for the different samples. In untreated samples, all probes displayed a similar MF at the different times of hydrolysis, with the exception of the 1.3 nm probes whose MF increased from 32% at 0 h and 15 h of saccharification to 47% after 96 h. A similar behaviour was observed for this probe in the HW-pretreated samples, although MF was much higher. Even if MF seemed to increase during saccharification for the 1.3 nm probe, only the 0 h and 96 h samples displayed a statistically small but still significant difference ( $p = 0.042$ ). A similar behaviour was observed for the 3.0 nm probes whereas no significant evolution of the MF was measured for the 1.7 nm probes. Diffusion of the probes in the IL-pretreated samples showed different trends. Surprisingly, the MFs of the 1.3 nm and 1.7 nm probes were lower at 15 h compared to their respective measured values at 0 h and 96 h. The MF of the 3.0 nm probes remained similar during the first 15 h then increased from 46% to 59% after 96 h of hydrolysis. These results showed the moderate influence of the saccharification time on accessibility, with positive evolutions being observed only for some specific cases between 15 h and 96 h, and not between 0 h and 15 h. However, 30% and 50% of the final glucose concentration was already reached after 15 h of hydrolysis for the HW-pretreated and untreated samples, respectively (Figure 1). This emphasizes that enzymatically-catalysed degradation of plant cell walls' polysaccharides induced small changes in probes accessibility. Pihlajaniemi *et al.* recently observed that porosity was not modified during the saccharification of pretreated wheat straw [40]. A possible explanation would be that the remaining lignin underwent some structural modifications during saccharification. The hydrolysis of cellulose and hemicelluloses could make room for lignin to expand, thus partially filling the gap left by the degraded polysaccharides and impeding probes from diffusing more easily.



The evolution of the MFs showed that diffusion in poplar cell walls was impacted by the modifications in composition and structure induced by the pretreatments, the size of the probes but much less by saccharification time. In order to quantify the relative importance of each factor on the diffusion of the probes, a full factorial experiment was designed in which MF was considered as a response which depends on three different factors, namely the pretreatment (factor A), the probes size (B) and the saccharification time (C). Influence of factors considered alone and in interaction were assessed (Table 1).

**Table 1.** ANOVA analysis of the effect of pretreatment, probes size, saccharification time and their interaction on probes MF.

Factors	<i>p</i> -values	<i>F</i> -value
A – Pretreatment	< 0.0001	303.02
B – Probes' size	< 0.0001	237.41
C – Time	< 0.0001	23.83
AB	< 0.0001	76.15
AC	0.0001	6.94
BC	0.0099	3.69
ABC	0.0027	3.48

The *p*-values calculated for each factor or their interactions were all below 0.05, indicating that each factor considered separately and each interaction of factors had a significant influence on the diffusion of the probes.

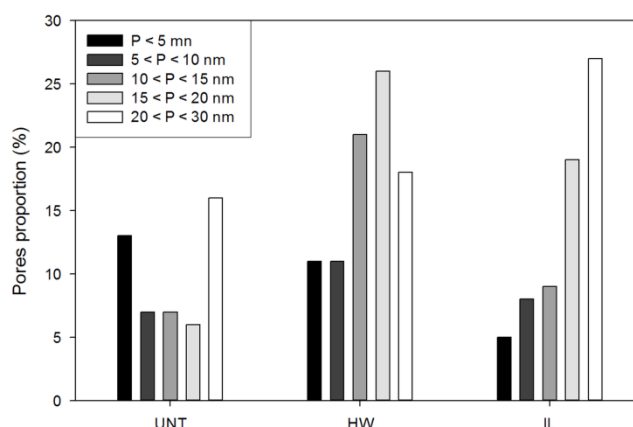
*F*-values indicate the contribution of the related factor to the MF: the higher the *F*-value, the stronger the influence of the related factor. As expected, pretreatment had the most important impact, followed by the probes size with an *F*-value 10 times higher than that of saccharification time. Considering factors interactions, only the combined influence of pretreatment and probes' size presented a relatively high *F*-value, which makes sense since these factors have an important influence when considered alone. Overall, modifications induced by the HW and IL pretreatments on both composition and structure of the poplar cell walls were the main factors responsible for changes in probes mobility. The size of the probes was also important, as it can influence the penetration into some pores depending on their diameter. The lower impact of saccharification time means that the removal of the polysaccharides during enzymatic hydrolysis resulted in minor modifications of the samples'

composition (Figure 2) and structure compared to the effect of pretreatment. A recent study showed an increase in cellulose accessible surface area of dilute acid pretreated-poplar during the first 8 h of reaction then decreasing back to the initial value after 20 h of reaction [41]. As cellulose accessible surface partially results from an increase in porosity of the samples, an increase in porosity during saccharification could have been expected. However, the fact that probes diffusion did not evolve after 15 h of reaction tends to show that porosity was not or only slightly improved during enzymatic hydrolysis.

### **Porosity changes induced by the pretreatments**

In order to better understand the changes of probes mobility observed previously, the porosity of the samples was also investigated since it is likely to influence enzymes diffusion in the plant cell walls [42]. As enzymatic hydrolysis was found to have a low impact on mobility compared to pretreatment, only the porosity of untreated and pretreated samples before saccharification was analysed. NMR analysis of the relaxation time of water absorbed within the samples was used to determine samples' porosity. In comparison to other techniques such as nitrogen adsorption or mercury porosimetry, samples did not require any drying step that might be responsible for a collapsing of the pores [13]. Rather, samples were soaked in water so that the environment is close to that of enzymatic hydrolysis.

Although the overall porosity of the samples was measured, only pores with a diameter below 30 nm were taken into account (Figure 6), as these are the most likely to influence enzymes mobility into the plant cell walls based on enzymes sizes.



**Figure 6.** Distribution of pores size ranges in the untreated and pretreated samples. Pores proportions are expressed as a percentage of the total porosity of the samples, so that the sum of the proportions is below 100% since only pores below 30 nm are considered. UNT: untreated, HW: Hot Water, IL: Ionic Liquid.

Untreated samples displayed a relatively high proportion of pores with a diameter below 5 nm (13%). The pores ranges comprised between 5 and 20 nm had lower proportion around 6-7% while pores in the range 20-30 nm were the most important representing 16% of the total porosity. Altogether, these pores ranges accounted for 49% of the overall porosity of untreated samples.

Porosity below 30 nm increased after both pretreatment, reaching 87% and 68% for the HW-pretreated and IL-pretreated samples respectively. This rise was not due to the pores with a diameter below 5 nm, whose proportion was the only one to decrease among all the measured ranges (11% and 5% for the HW-pretreated and IL-pretreated samples, respectively). In HW-pretreated samples, all other pore size ranges increased, most notably the pores in the range 10-15 nm (3-fold) and 15-20 nm (4.3-fold). In IL-pretreated samples, the increase in the proportion of pores with a diameter comprised between 5 and 15 nm was less important (proportion of 14% and 17% for the untreated and IL-pretreated samples respectively). As with the HW-pretreated samples, the highest augmentation was observed for the pores in the range 15-20 nm with an increase by 3.2 times compared to the untreated samples. The most important range measured was the 20-30 nm pores which represented 27% of the overall porosity.

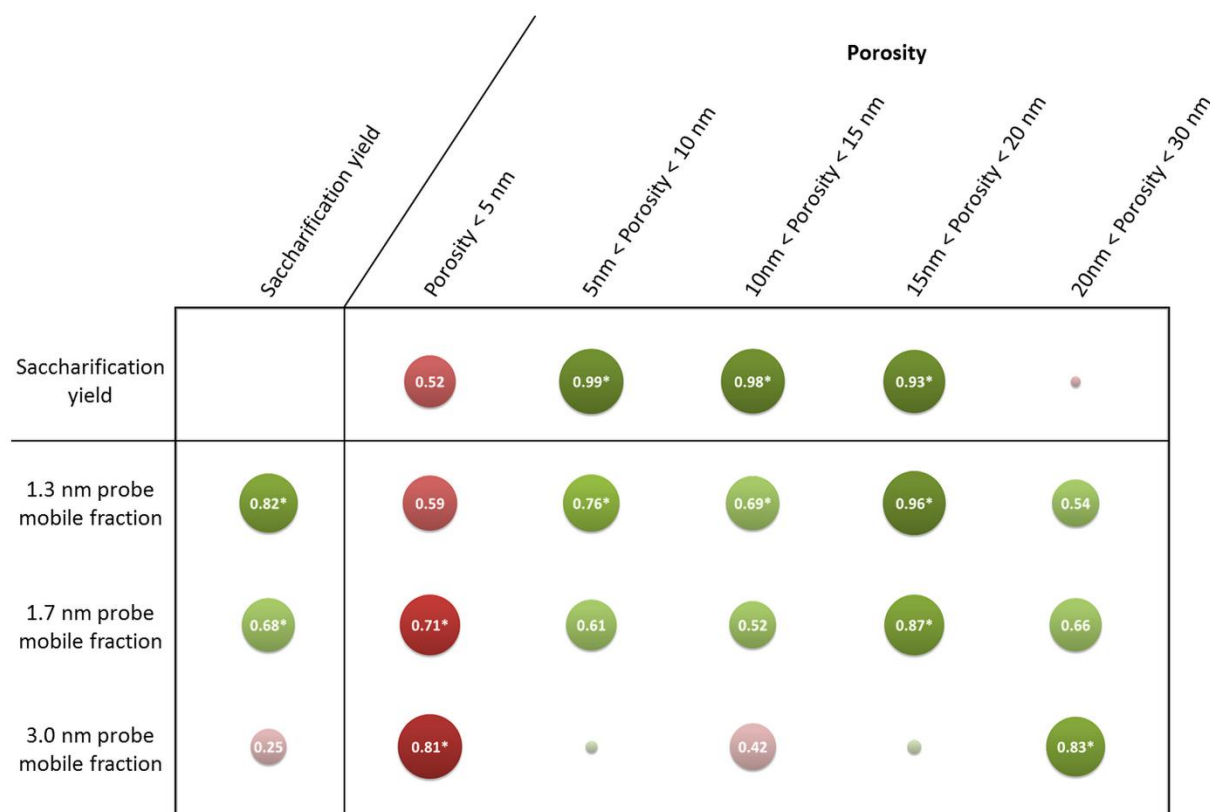
The increase in porosity observed after both pretreatment is likely to be at least partially responsible for the increase in glucose release during the saccharification of the pretreated samples. Indeed, saccharification and global porosity followed the same order regarding pretreatment: HW > IL > UNT. More precisely, the most important increase in pores was related to the range 10-20 nm for both pretreatments, indicating their major influence for an effective diffusion of lignocellulolytic enzymes. These results are in agreement with the assumption that a pore diameter of 5-10 nm is too small to allow significant diffusion of enzymes [39]. Recently, Hinkle *et al.* showed using electron tomography that the increase in saccharification efficiency induced by steam-explosion pretreatment of corn stover resulted from an increase in porosity and thus in accessible surface area for enzymes below a threshold of roughly 5-10 nm radius [18]. An increase in the proportion of nano-pores with a diameter in the range 10-100 nm formed between microfibrils during dilute acid and HW pretreatment was considered as the most fundamental barrier to overcome to allow an efficient enzymatic hydrolysis [43]. Larger pores with diameters over 20 nm might be non-essential for an effective saccharification as their proportion was more important in IL-pretreated samples than in HW-pretreated samples.

### **Influence of lignin on accessibility**

The MF of PEG-rhodamine probes within the plant cell walls can be impacted by both cell wall porosity and interaction with accessible lignin. Considering these features, only porosity was largely shifted by pretreatments (Figure 6), lignin content was only moderately affected (Figure 2). However, porosity alone could not explain the increased accessibility of the probes: for example, after pretreatment, the MF of the 3.0 nm probe in the IL-pretreated samples was the highest, whereas porosity of the HW-pretreated samples was more important. In addition, the diffusion of this probe was the fastest in the HW-pretreated samples at the beginning of the recovery compared to the other samples, as the fluorescence increased more rapidly (Figure 4). The fact that recovery was then slowed down could be related not to lignin content, but to lignin composition. NMR and thioacidolysis reaction both showed that lignin underwent condensation reaction after HW-pretreatment, whereas it was only slightly modified after IL-pretreatment<sup>1</sup>. This condensation might be responsible for the less important diffusion of the biggest probes in the secondary part of the recovery compared to that in IL-pretreated samples, as recent studies showed that enzymes are more prone to bind lignin that has undergone condensation reactions [44, 45]. Interactions of cellulases with lignin are thought to occur mainly through hydrophobic interactions as well as hydrogen bonding, depending on the characteristics of the enzymes [46]. FRAP experiments could then be designed to better understand the dynamic behaviour of isolated enzymes in plant cell walls, and more especially their interaction with both cellulose and lignin. Overall, the evolution of the probe accessibility during saccharification is likely not related to changes in lignin content but rather to lignin structural and chemical modifications.

### **Correlations between saccharification and accessibility**

The results obtained on untreated and pretreated samples showed that probes mobility was related to samples porosity measured before saccharification, and also to the final sample saccharification yield. Pearson's correlations coefficients were calculated in order to investigate in details the previously made assumptions (Figure 7).



**Figure 7.** Pearson’s correlations coefficients between saccharification yields, probes MF and samples’ porosity. Disks diameter and colour shades display the strength of the correlations. Both positive and negative correlations are presented using the absolute value of the coefficients. Absolute values under 0.1 are not indicated on the corresponding disks. Positive and negative correlations are displayed in green and red, respectively. Asterisks indicate statistically significant coefficients with a  $p$ -value below 0.05.

An evolution of the correlations with porosity was observed according to the probes’ size. The best correlations were observed for the 1.3 nm and 1.7 nm probes with the ranges 15-20 nm, and with the range 20-30 nm for the 3.0 nm probe. The fact that probes diffuse better in larger pores as their sizes increase makes sense. Interestingly, the best correlations were not observed with the porosity range corresponding to probes’ diameter. For porosity to allow a significant enhancement of PEG probes diffusion, it seems that pores diameter had to be around 5 times the diameter (or 10 times the  $R_H$ ) of the probes. This might be explained by the interactions of PEG with lignin, meaning that probes are likely to fill in the pores as they get bound to the lignin, hampering the diffusion of other probes if the initial pore diameter was too small.

Saccharification yield displayed strong significant correlations with the MFs of the 1.3 nm and 1.7 nm probes, with coefficients values of 0.82 and 0.68, respectively. No statistically significant correlation was observed between the final glucose yield and MF of the 3.0 nm probe as its diffusion was more important in IL-pretreated samples compared to HW-pretreated samples (Figure 5), whereas the latter sample was the most efficiently hydrolysed (Figure 1). The fact that saccharification yield could not be related to the diffusion of all probes showed that enzymatic hydrolysis does not depend solely on enzymes diffusion. Actually, saccharification efficiency has been shown to be highly dependent on cellulose accessibility [47]. Increase in pore volumes always leads to an increase in accessible surface area [6]. However, for a considered volume, a higher proportion of small pores as observed in the HW-pretreated samples results in more surface than larger pores as the one observed after IL-pretreatment. Jeoh *et al.* demonstrated using fluorescence microscopy techniques that improving porosity may have little or no impact on biomass digestibility unless cellulose is made more accessible to enzymes [48]. For enzymes diffusion and mobility to be correlated, a compromise in pores diameter increase must be obtained, as pores have to be large enough to let enzymes go through, but not too large so that accessible surface area remains adequate.

## **CONCLUSION**

The FRAP technique was combined to porosity measurements and wet chemistry analysis in order to understand how biomass features impact both enzymes dynamics and activity within the plant cell walls. Pretreatments caused an important augmentation of biomass porosity, whereas chemical composition was less altered, especially after IL-pretreatment. Probes diffusion was mainly influenced by the changes in the structure and chemical composition of the samples caused by pretreatments and also by their size to a minor extent.

Saccharification induced slight changes in accessibility only after 96 h of reaction in a few cases, which means that polysaccharides hydrolysis did not result in important modifications of the cell walls' structure, even if more than half the initial cellulose content was removed in the HW-pretreated samples. This means that the cell wall network is very strong and does not collapse even when a significant amount of sugar is released. Lignin, whose relative content is increased during the saccharification, possibly undergoes some changes in its spatial conformation impeding probes diffusion by filling the gap left by the degraded polysaccharides.

Porosity measurements allowed a better estimation of the impact of cell wall architecture on enzymes diffusion. Better porosity allowed a better diffusion of the probes, as shown by the increase in MFs. However, the best correlations observed between probes mobility and porosity ranges were obtained for pores with a diameter at least 5 times the diameter of the probes. Consequently, pores need to be large enough to allow probes diffusing efficiently without obstructing the passage due to non-specific adsorption on lignin. Pores in the range 5-20 nm have been shown to govern saccharification, as their proportion was strongly correlated with saccharification yield, while bigger pores had a detrimental effect. Measuring this pore range in initial biomass samples can thus be envisioned as a predictor of saccharification. Overall, in order to improve saccharification, an increase in pore size is necessary to allow a better accessibility while limiting interaction with lignin but it has to be moderate to maintain a sufficient accessible surface area. The influence of interactions with lignin could be further studied by applying more sophisticated recovery model to fit the FRAP recovery curves that would give more information on both the diffusion and bonding kinetics. Those equations would require a better understanding on the nature and distribution of the binding site in the bleach area [49]. In conclusion, the FRAP technique provided useful information on probes diffusion, allowing a better understanding of how porosity and chemical composition impacted enzymes diffusion, but also activity within poplar cell wall.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank David Crônier and Olivier Delfosse for their help in performing the chemical characterisation of the samples. Xavier Falourd and Loïc Foucat from the Biopolymers-Structural Biology (BiBS) platform (BIA laboratory, Nantes, France) are acknowledged for conducting the low-field NMR measurements. Funding of MH PhD was provided by Région Grand Est.

### **REFERENCES**

- [1] Kim S., Dale B.E., *Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues*. Biomass and Bioenergy, 2004, 26 (4), 361-375.
- [2] Karp A., Shield I., *Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge*. New Phytologist, 2008, 179 (1), 15-32.

- 
- [3] Bentsen N.S., *et al.*, *Agricultural residue production and potentials for energy and materials services*. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2014, 40, 59-73.
- [4] Naik S.N., *et al.*, *Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14 (2), 578-597.
- [5] Chundawat S.P., *et al.*, *Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals*. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2, 121-45.
- [6] Zhao X., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6 (4), 465-482.
- [7] Silveira M.H., *et al.*, *Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries*. *ChemSusChem*, 2015, 8 (20), 3366-90.
- [8] Li M., *et al.*, *Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance*. *Frontiers in Chemistry*, 2016, 4, 45.
- [9] Arantes V., Sessler J.N., *Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates*. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4 (1), 3.
- [10] Rollin J.A., *et al.*, *Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108 (1), 22-30.
- [11] Grethlein H.E., *The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates*. *Nature Biotechnology*, 1985, 3 (2), 155-160.
- [12] Carpita N., *et al.*, *Determination of the pore size of cell walls of living plant cells*. *Science*, 1979, 205 (4411), 1144-1147.
- [13] Meng X., *et al.*, *Determination of porosity of lignocellulosic biomass before and after pretreatment by using Simons' Stain and NMR techniques*. *Bioresource Technology*, 2013, 144, 467-476.
- [14] Hou X.-D., *et al.*, *Significantly enhancing enzymatic hydrolysis of rice straw after pretreatment using renewable ionic liquid-water mixtures*. *Bioresource Technology*, 2013, 136, 469-474.
-



- 
- [15] Li C., *et al.*, *Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (13), 6928-6936.
- [16] Zhang C., *et al.*, *Hierarchical porous structures in cellulose: NMR relaxometry approach*. *Polymer*, 2016, 98, 237-243.
- [17] Rondeau-Mouro C., *et al.*, *Assessment of cell wall porosity in Arabidopsis thaliana by NMR spectroscopy*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 42 (2), 83-92.
- [18] Hinkle J.D., *et al.*, *Biomass accessibility analysis using electron tomography*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8 (1), 212.
- [19] Paes G., *et al.*, *Modeling progression of fluorescent probes in bioinspired lignocellulosic assemblies*. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (7), 2196-2205.
- [20] Fong M., *et al.*, *Investigation of the binding properties of a multi-modular GH45 cellulase using bioinspired model assemblies*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9 (1), 12.
- [21] Cuyvers S., *et al.*, *Both substrate hydrolysis and secondary substrate binding determine xylanase mobility as assessed by FRAP*. *The journal of physical chemistry. B*, 2011, 115 (16), 4810-7.
- [22] Paës G., *et al.*, *Exploring accessibility of pretreated poplar cell walls by measuring dynamics of fluorescent probes*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 15.
- [23] Belmokhtar N., *et al.*, *Changes in Phenolics Distribution After Chemical Pretreatment and Enzymatic Conversion of Miscanthus × giganteus Internode*. *BioEnergy Research*, 2013, 6 (2), 506-518.
- [24] Auxenfans T., *et al.*, *Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 36.
- [25] González López C.V., *et al.*, *Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (19), 7587-7591.
- [26] Meyvis T.K.L., *et al.*, *Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research*. *Pharmaceutical Research*, 1999, 16 (8), 1153-1162.
-

- 
- [27] Zhuang X., *et al.*, *Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products*. *Bioresource Technology*, 2016, *199*, 68-75.
- [28] Vancov T., *et al.*, *Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels*. *Renewable Energy*, 2012, *45*, 1-6.
- [29] Brandt A., *et al.*, *Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids*. *Green Chemistry*, 2013, *15* (3), 550-583.
- [30] Hirasawa T., *et al.*, *Chapter 4 - Production technology for bioenergy crops and trees*. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Academic Press: Boston, 2014; pp 51-106.
- [31] Zhong R., Ye Z.-H., *Secondary cell walls*. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd: 2001.
- [32] Börjesson J., *et al.*, *Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, *40* (4), 754-762.
- [33] Börjesson J., *et al.*, *Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, *41* (1), 186-195.
- [34] Donaldson L.A., *et al.*, *Nanoscale interactions of polyethylene glycol with thermo-mechanically pre-treated pinus radiata biofuel substrate*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, *111* (4), 719-725.
- [35] Kirsch C., *et al.*, *Pressure assisted stabilization of biocatalysts at elevated temperatures: characterization by dynamic light scattering*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, *110* (6), 1674-1680.
- [36] Schuster A., Schmoll M., *Biology and biotechnology of Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, *87* (3), 787-799.
- [37] Jänis J., *et al.*, *Thermostability of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from Trichoderma reesei studied by electrospray ionization Fourier-transform ion cyclotron resonance MS, hydrogen/deuterium-exchange reactions and dynamic light scattering*. *Biochemical Journal*, 2001, *356* (2), 453-460.
- [38] Hall M., *et al.*, *The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase Cel7A from Trichoderma reesei is also a thermostabilizing domain*. *Journal of Biotechnology*, 2011, *155* (4), 370-376.
-

- 
- [39] Meng X., Ragauskas A.J., *Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27, 150-8.
- [40] Pihlajaniemi V., *et al.*, *Rate-constraining changes in surface properties, porosity and hydrolysis kinetics of lignocellulose in the course of enzymatic saccharification*. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9 (1), 18.
- [41] Meng X., *et al.*, *Physicochemical structural changes of poplar and switchgrass during biomass pretreatment and enzymatic hydrolysis*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4 (9), 4563-4572.
- [42] Tanaka M., *et al.*, *Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32 (5), 698-706.
- [43] Meng X., *et al.*, *Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus*. *Green Chemistry*, 2015, 17 (8), 4239-4246.
- [44] Yu Z., *et al.*, *Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass*. *ChemSusChem*, 2014, 7 (7), 1942-1950.
- [45] Ko J.K., *et al.*, *Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112 (2), 252-262.
- [46] Liu H., *et al.*, *Toward a fundamental understanding of cellulase-lignin interactions in the whole slurry enzymatic saccharification process*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2016, 10 (5), 648-663.
- [47] Wiman M., *et al.*, *Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce*. *Bioresource Technology*, 2012, 126, 208-215.
- [48] Jeoh T., *et al.*, *Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98 (1), 112-122.
- [49] Sprague B.L., McNally J.G., *FRAP analysis of binding: proper and fitting*. *Trends in Cell Biology*, 2005, 15 (2), 84-91.





# **CHAPITRE 4**

## **RÉSUMÉ ÉTENDU**

La lignine joue un rôle important dans le phénomène de récalcitrance à l'hydrolyse, comme l'ont prouvé les résultats des chapitres 1 et 3. En plus de former une barrière physique autour des polysaccharides, elle fixe de manière non-productive les enzymes, créant un encombrement stérique des pores dont la taille est théoriquement suffisamment importante pour laisser les enzymes diffuser, comme l'ont révélé les résultats du chapitre 3.

L'objectif de cet article est de décrire l'accessibilité de substrats lignocellulosiques par des techniques de microscopie de fluorescence permettant de quantifier les interactions entre la lignine et des sondes fluorescentes. Pour ce faire, le transfert non radiatif d'énergie entre une molécule donneuse, ici la lignine, et une molécule accepteuse, la rhodamine portée par les sondes PEG, en étroite proximité a été étudié par mesure du transfert d'énergie de résonance de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) par application de la technique de photoblanchiment de l'accepteur. Des mesures de temps de vie de fluorescence ont également été effectuées sur les différents échantillons, afin de mieux caractériser l'état de la lignine.

Les résultats décrits dans ce chapitre ont été obtenus sur des échantillons de peuplier un angiosperme à bois dur, et de pin, un gymnosperme à bois tendre. Ces deux biomasses ont été soumises à des prétraitements hydrothermique et au chlorite de sodium.

L'analyse de la composition chimique des échantillons a montré, pour chacune des biomasses, une diminution de la teneur en hémicelluloses après le prétraitement hydrothermique (xylanes pour le peuplier et mannanes pour le pin), et une élimination importante de la lignine causée par le prétraitement au chlorite de sodium. La quantité de monolignols libérés après thioacidolyse des échantillons prétraités indiquent une diminution importante de la proportion de lignine labile après prétraitement, en accord avec les tendances observées pour la paille de blé et le miscanthus dans le chapitre 1.

L'hydrolyse enzymatique des échantillons a révélé l'effet contrasté des prétraitements en fonction des biomasses. Alors que la délignification au chlorite de sodium permet une nouvelle fois de libérer la quasi-totalité du glucose initial, le prétraitement hydrothermique a permis d'améliorer uniquement le rendement de saccharification du peuplier, alors que celui du pin est resté similaire à la valeur obtenue avant prétraitement (~ 35%).

L'étude des propriétés de fluorescence des parois, mesurées avec des longueurs d'onde d'excitation de 355 nm et d'émission de 452 nm, a révélé une diminution de l'intensité de fluorescence pour les deux biomasses après le prétraitement au chlorite de sodium. Cette diminution est beaucoup plus modérée pour le peuplier après le prétraitement

hydrothermique, et augmente dans le cas du pin. Ces évolutions sont en adéquation avec la corrélation établie entre l'intensité de fluorescence et le rendement de saccharification dans le chapitre 1.

Les prétraitements induisent une augmentation du temps de vie de fluorescence, qui est plus important après le prétraitement au chlorite de sodium qu'après le prétraitement hydrothermique. Les valeurs mesurées montrent une corrélation importante avec le rendement de saccharification d'une part, mais aussi une corrélation négative importante avec la teneur en lignine, ce qui suggère que le temps de vie de fluorescence pourrait également être un marqueur de la digestibilité enzymatique.

Bien qu'il soit difficile d'attribuer la variation du temps de vie de fluorescence à une modification précise de l'organisation de la lignine, il est généralement admis que les structures condensées augmentent le temps de vie de fluorescence. La corrélation entre le temps de vie et le rendement d'hydrolyse semble donc cohérente au regard de la corrélation négative établie dans le chapitre 1 entre la proportion de liaisons  $\beta$ -O-4' et le rendement de saccharification.

Les observations microscopiques des échantillons après incubation dans les solutions de PEG-rhodamine de différentes tailles ont montré une accessibilité variable des sondes en fonction des biomasses. L'interaction entre les sondes et la lignine dépend de la taille des sondes, ce qui suggère que l'efficacité d'interaction des sondes avec la lignine est en partie liée à l'accessibilité structurale au sein des parois, et donc à la porosité, ce qui concorde avec l'hypothèse établie dans le chapitre 3. De manière générale, l'efficacité de FRET augmente après prétraitement (à l'exception du peuplier prétraité de manière hydrothermique), ce qui montre des interactions plus efficaces entre les sondes et la lignine résiduelle.

Les corrélations établies entre l'efficacité de FRET et la taille des sondes sont positives, mais les coefficients sont plus importants pour les sondes de petites tailles, qui peuvent diffuser de manière beaucoup plus efficace. Cela souligne, une nouvelle fois, l'effet conjugué de la lignine et de la porosité des échantillons sur la diffusion des sondes au sein des parois, et sur la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique de manière générale.

---

## Combined fluorescence approaches to assess cell wall accessibility in softwood and hardwood pretreated biomass

Brigitte Chabbert<sup>1</sup>, Mickaël Herbaut<sup>1</sup>, Alankar Vaidya<sup>2</sup>, Anouck Habrant<sup>1</sup>,

Christine Terryn<sup>3</sup>, Gabriel Paës<sup>1</sup>, Lloyd Donaldson<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FARE Laboratory, INRA, Université de Reims-Champagne Ardenne, 51100 Reims, France

<sup>2</sup>Scion, Private Bag 3020, Rotorua 3046, New Zealand

<sup>3</sup>PICT platform, University of Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France

### **ABSTRACT**

Woody biomass from representative softwood (pine) and hardwood (poplar) pretreated with hot water extraction or chlorite delignification was characterized using fluorescence spectroscopy and fluorescence lifetime spectroscopy. Both pretreatments altered the fluorescence intensity and lifetime of lignin that was shown to be chemically impacted by both pretreatments. This modification was also studied through measurements of the fluorescence lifetime of the lignin which were increased after pretreatment for both biomass species. Lifetimes displayed strong correlations with both the saccharification yield and the lignin content, suggesting that they can be considered as effective indicators of biomass digestibility. The impact of lignin on biomass hydrolysis was further studied by measuring the interaction of lignin with different polyethylene glycol-rhodamine probes mimicking the non-productive binding of enzymes on lignin. FRET efficiency was found to be dependent on the probes molecular weight, emphasizing the role of structural accessibility on the interaction between probes and lignin. However, the decrease in interactions observed in hot water-pretreated poplar proved that chemical modifications must be considered as well to understand the diffusion and interaction of PEG probes within the plant cell wall.



## **INTRODUCTION**

There is an increasing interest in the use of plant biomass for the production of sustainable liquid fuels and chemicals to replace fossil carbon, due to declining supply and to mitigate increasing atmospheric CO<sub>2</sub> [1]. Plant cell wall biomass consists of a framework of cellulose surrounded by a matrix of complex polymers including hemicelluloses and lignin. These polymers are interconnected by non-covalent and covalent linkages resulting in a complex structural and chemical network [2]. Polymers interconnections result in the formation of physical and chemical barriers limiting cellulase enzyme penetration and progression [3], eventually leading to decreased enzyme activity [4, 5]. Both the crystallinity of cellulose and its restricted accessibility, due to its embedding inside the cell wall matrix of hemicelluloses and lignin limit enzyme activity [6]. In addition to being a structural obstacle, lignin can give rise to non-productive enzyme binding, so it is considered as the main factor responsible for lignocellulose recalcitrance [7, 8]. The conversion of cell wall biomass to sugar for fermentation to ethanol thus requires chemical or physical pretreatments to both disrupt the plant cell walls and increase porosity in order to make the cellulose accessible to cellulolytic enzymes while minimizing the formation of inhibitory by-products [9].

A wide variety of pretreatments have been proposed and each has advantages and limitations [10, 11]. Some pretreatments improve the accessibility of cellulose by removing matrix components such as lignin (delignification associated with pulping) and hemicelluloses (hot water pretreatment, steam-explosion, or acid pretreatments). Removal of lignin alone is usually insufficient to optimize sugar yield because hemicelluloses are covalently linked with lignin and/or closely interact with the surface of elementary cellulose thus forming a physical and chemical barrier limiting the enzymatic accessibility and cellulose conversion yields [6, 12-14]. Improvement of cellulose conversion is related to the severity and the type of pretreatment and depends on the biomass species due to variation in the content and composition of lignin and hemicelluloses [4, 11, 15]. For instance, hardwoods and softwoods differ in terms of lignin composition (mixed syringyl-guaiacyl vs guaiacyl) and hemicelluloses composition (xylan vs mannan) [16, 17]. These differences contribute to the effectiveness of biomass pretreatment with xylans being readily extractable by hot water while mannans require more intensive pretreatment [18, 19]. Syringyl rich hardwood lignins are more easily chemically degraded than guaiacyl type softwood lignin due to a lower degree of condensation, a less complex structure, smaller polymer size, and higher content of  $\beta$ -ethers [16, 20, 21].

Besides chemical and structural characterisation, microscopy has been an effective tool for the study of biomass pretreatment at multiscale levels [22]. Light microscopy and microspectrometry combining UV, infrared, and Raman analyses have provided critical information related to the chemical cell-wall changes caused by both pretreatments and enzyme hydrolysis [11, 23-25]. Among microscopy approaches, confocal fluorescence microscopy is one of the most widely used to visualise biomass deconstruction gaining key insights into the cell wall and lignin changes induced by pretreatment [11]. For example, Colletta *et al.* have used confocal fluorescence spectroscopy and fluorescence lifetime microscopy (FLIM) to characterise lignin modification and removal following acid and alkali pretreatments in sugar cane bagasse and eucalyptus fibres [26]. Confocal microscopy is also a fast method to get a spatial and temporal visualisation of fluorescently labelled enzymes and to characterise enzyme substrate interactions within biomass [6, 27-30]. Confocal fluorescence microscopy could also allow addressing changes in the cell wall and cellulose porosity while determining the distribution and mobility of many fluorescent probes that vary in molecular weight or affinity towards cell wall polymers [3, 28, 31-33].

Few studies have compared the effect of pretreatment of different biomass species on the accessibility to lignin that is the main barrier to lignocellulose bioconversion. Using steam-exploded wood and rhodamine labelled polyethylene glycol (PEG) probes, Donaldson *et al.* have shown that labelled PEG penetrates the secondary cell wall fraction but is excluded from the highly lignified middle lamella [34]. The fluorescent PEGs can be localised by direct imaging of the rhodamine dye and their strength of interaction with lignin can be evaluated by measuring the Förster (or Fluorescence) Resonance Energy Transfer (FRET) between rhodamine and lignin, at the molecular level. We propose to use a set of fluorescence microscopy techniques to study on poplar (hardwood) and pine (softwood) the effects of two different pretreatments (chlorite delignification and hot water extraction) on lignin accessibility using rhodamine labelled PEGs of various sizes as probes. Chlorite delignification reduces lignin content while hot water extraction mainly reduces hemicelluloses content, both pretreatments inducing alteration of the residual lignin structure [25, 33, 35], thus allowing a comparison of hardwood and softwood biomass regarding lignin accessibility. In particular, interactions of probes with lignin will be assayed by FRET measurements, while fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) will give access to lignin modifications. Using such complementary microscopy techniques provides additional

information on the distribution of lignin and its accessibility which cannot be obtained by porosity measurements.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample preparation**

Small wood blocks (3 – 4 mm width × 2 cm long) were isolated from the basal region of 3-year-old short rotation poplar coppice (Inra Orléans, France) and from pine wood (Rotorua, New Zealand) which were subsequently dried at 40°C for 2 days. Pretreatments were performed as previously described [33]. Hot water pretreatment was performed for 1 h at 170°C using mineralisation reactors equipped with Teflon tubes (Parr). Sodium chlorite-acetic acid delignification pretreatment [36] was performed on 1 g poplar samples using acetic acid and sodium chlorite at 70°C for 1 h, the reaction was repeated 5 times. Untreated control samples were also obtained after water washing at 4°C (1 h). After pretreatment, samples were washed several times with deionised water until the pH of water was about 6.0. Then samples were dried at 40°C in an air forced oven for 2 days. One sample fraction was ground to 200 µm-size prior to chemical analysis and enzymatic saccharification, and the other fraction was sectioned with a sledge microtome at a thickness of 30 µm for confocal fluorescence microscopy.

### **Chemical analysis and enzymatic saccharification**

The sugar monomer composition was determined using a two-step sulfuric acid hydrolysis [37] followed by high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC-PAD) with 2-deoxy-D-ribose as internal standard [33]. Lignin content was quantified using a spectrophotometric method after acetyl bromide dissolution of the lignocelluloses [38] and determination of the monomer composition of the alkyl aryl ether lignin structures was achieved by thioacidolysis [39] as previously described [24].

Enzymatic saccharification was performed on the ground samples (2% w/v) using a commercial cellulase preparation, Cellic ® CTec2 kindly provided by Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark), in 10 mL sodium citrate buffer (0.1 M; pH 5.0) for 48 h at 50°C and 200 rpm using an enzyme loading of 40 FPU/g-glucan. The reaction mixtures were pre-incubated for 1h at 50°C and 200 rpm and then enzymatic hydrolysis was initiated by addition of the cellulase solution and stopped after 72h by heating 15 min at 90°C. Control

experiments without enzyme were also carried out. The amount of glucose released was determined using high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC-PAD). Conversion yields were expressed as a percentage of initial glucose amount [40].

### **Confocal fluorescence microscopy**

Samples of untreated control and pretreated pine and poplar wood were sectioned with a sledge microtome at a thickness of 30  $\mu\text{m}$ . Sections were used for fluorescence spectroscopy, fluorescence lifetime microscopy (FLIM), and Förster Resonance Energy Transfer (FRET) measurements.

Fluorescence imaging was performed with a Leica SP5 II confocal microscope at 1024  $\times$  1024 pixel resolution using a 63 $\times$  glycerol immersion lens. Fluorescence spectroscopy was performed with excitation at 365 nm and emission at 400 – 700 nm, at 5 nm intervals with a slit width of 10 nm.

For FRET analysis, sections from wood samples were imaged without treatment to act as controls for lignin fluorescence. Sections were treated with 1.6  $\mu\text{M}$  solutions of rhodamine labelled PEGs (NANOCS, New York, USA) in water at 1, 3.4, 10 and 40 kDa for 1 h at room temperature (22°C) in the dark, followed by washing in distilled water (5 mins twice). All sections were mounted in 50% glycerol in phosphate buffer at pH 7. The fluorescence spectrum of rhodamine-B (BDH) was measured with the confocal microscope using a 1.6  $\mu\text{M}$  solution in distilled water. Hydrodynamic radius ( $R_H$ ) of the fluorescent probes were determined by dynamic light scattering (DLS) [33].

FRET measurements were performed using the acceptor photobleaching technique, using sequential excitation at 488 nm for the donor (lignin in wood samples) and 561 nm for the acceptor (rhodamine in PEG probes) with emission at 500 - 570 and 570 - 700 nm, respectively. Bleaching of rhodamine label for FRET measurements was performed with 100% laser power at 561 nm for 50 scans. FRET measurements were performed at 512  $\times$  512 pixel resolution but some additional FRET imaging was done at 1024  $\times$  1024 for presentation purposes. FRET calculations were performed using Leica LAS AF software. Images of FRET efficiency on a 0 - 100% scale were calculated using Digital Optics V++ software. FRET measurements were repeated on 10 fields of view for each probe/treatment combination. FRET efficiency was also measured on sections with no probe treatment and in areas outside the region where photobleaching was performed to act as additional controls.

FLIM measurements were performed on the untreated control and pretreated pine and poplar wood mounted in 50% glycerol in 10 mM phosphate buffer at pH 7 [41] using a Zeiss LSM710 multiphoton microscope equipped with a Becker and Hickl lifetime spectrometer. Decay spectra were acquired with a biphoton excitation at 750 nm and emission between 420 and 722 nm. Data were analysed using a multi-exponential decay model with 2 components. Measurements of average fluorescence lifetime were made on 5 fields of view for each species/pretreatment combination.

## **RESULTS**

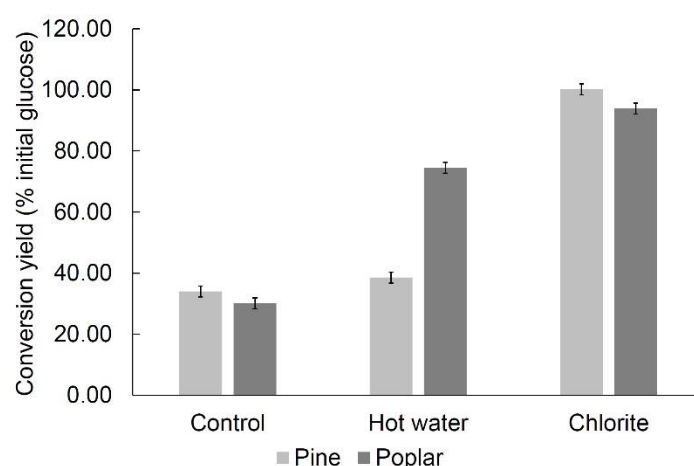
### **Chemical composition and enzymatic saccharification**

Chemical analysis shows differences in polysaccharide and lignin compositions between pine and poplar (Table 1). Similar pretreatment effects are observed for the two biomass species: hydrothermal pretreatment removes mainly hemicelluloses (mannan and xylan content in pine and poplar, respectively) and pectins (lower content of arabinose, galactose and galacturonic acid), whereas chlorite removes lignin. Pretreated samples contain higher proportion of glucan compared to control biomass. Lignin content increased after hot water pretreatment as a consequence of hemicelluloses removal. Nevertheless the residual lignin displays structural alterations as a lower proportion of lignin monomers was obtained by thioacidolysis for both pine and poplar, indicating a reduction in labile ether  $\beta$ -O-4' linkages. This modification is even more pronounced after large removal of lignin by chlorite pretreatment.

**Table 1.** Chemical composition of untreated and pretreated pine and poplar samples. Lignin and sugar data are expressed as percent of dry matter and  $\beta$ -O-4' lignin are expressed as percent of lignin. Glc (glucose), Xyl (xylose), Man (mannose), other sugars refer to the total content of minor monosaccharides (arabinose, galactose, uronic acids)

	Total lignin (% dry matter)	$\beta$ -O-4 lignin (% lignin)	Total Sugar (% dry matter)	Glc	Xyl	Man	Other sugars
<b>Pine</b>							
Control	27.3 $\pm$ 2.7	30.6 $\pm$ 1.0	58.8 $\pm$ 2.1	41.9 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 0.1	10.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1
Hot water	34.3 $\pm$ 1.7	20.6 $\pm$ 1.1	58.3 $\pm$ 0.2	48.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0
Chlorite	7.2 $\pm$ 0.3	< 1.00	7.70 $\pm$ 3.2	49.4 $\pm$ 2.6	4.1 $\pm$ 0.2	10.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.0
<b>Poplar</b>							
Control	25.6 $\pm$ 0.2	39.7 $\pm$ 0.9	53.2 $\pm$ 4.3	35.7 $\pm$ 2.9	13.0 $\pm$ 1.1	2.0 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.0
Hot water	32.55 $\pm$ 1.10	25.5 $\pm$ 3.7	51.2 $\pm$ 1.1	39.5 $\pm$ 0.8	9.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0
Chlorite	6.9 $\pm$ 0.73	3.0 $\pm$ 0.4	66.5 $\pm$ 1.2	44.8 $\pm$ 0.9	16.4 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0

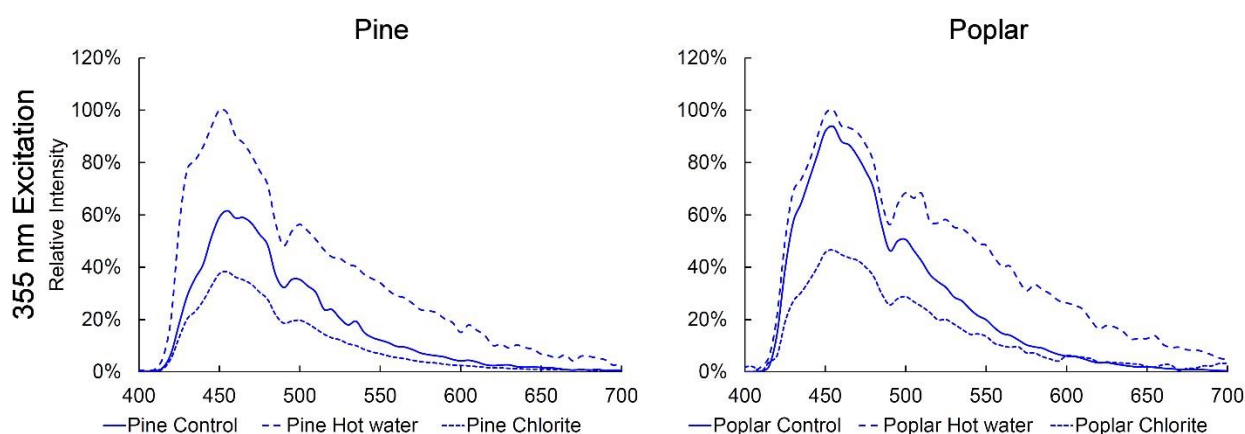
Enzymatic hydrolysis of poplar and pine controls gave similar glucan conversion yields of 32% (Figure 1). Chlorite pretreatment greatly enhanced conversion yields with a 3-fold increase in comparison to controls (close to 100%). Hot water pretreatment was less efficient on pine (40%) with only a slight increase compared to the control sample, while poplar showed a 2-fold increase in conversion (ca. 80%).



**Figure 1.** Enzymatic conversion yield (% initial glucose) for pine and poplar. Error bars show standard deviation.

### **Fluorescence spectroscopy**

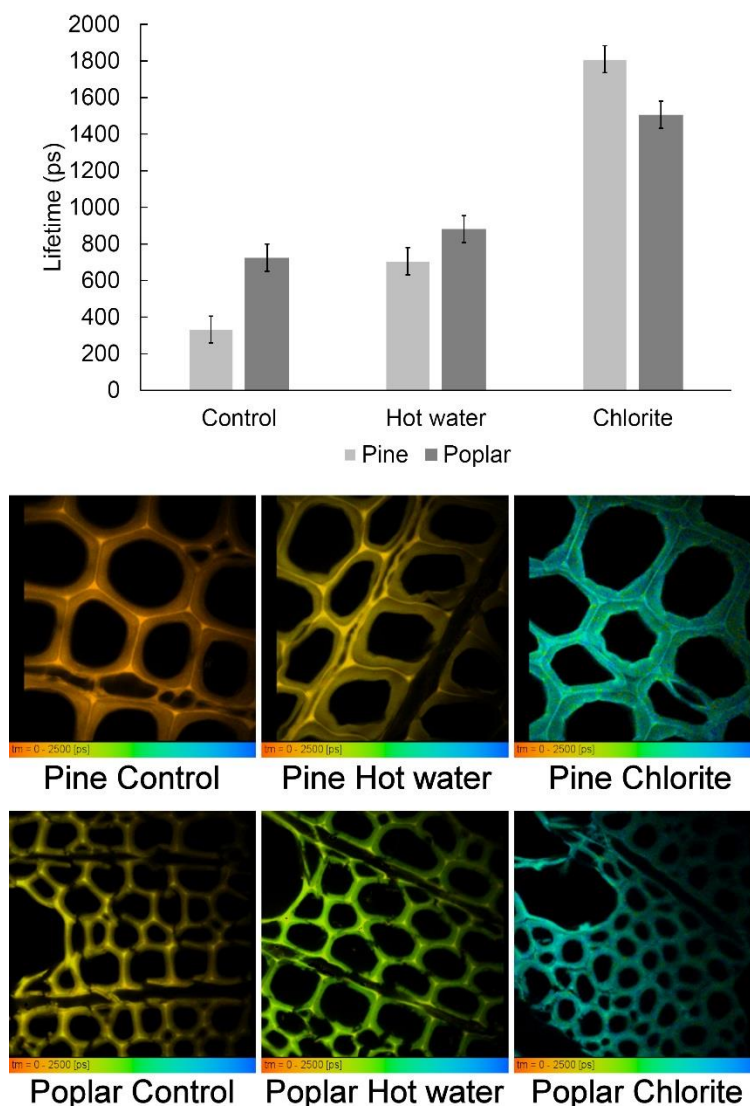
When using an excitation wavelength of 365 nm, maximum fluorescence emission of control samples was identical at 452 nm for poplar and pine. After chlorite pretreatment, a more pronounced decrease was observed for pine than for poplar. For hot water pretreated samples, fluorescence increased for pine while it was stable for poplar (Figure 2). Overall, pretreatments do not induce modification of the maximum emission wavelength as compared to control.



**Figure 2.** Fluorescence spectra for control and pretreated pine and poplar samples at 355 nm excitation wavelength showing the relative intensity.

### **Fluorescence lifetime measurement**

Contrary to fluorescence emission, fluorescence lifetime of poplar was twice higher than that of pine (Figure 3). For hot water pretreated samples, it increased significantly for pine but was unchanged for poplar. Chlorite-pretreated samples had the most increased fluorescence lifetime: 6-fold for pine and 2-fold for poplar in comparison to control samples, respectively. These observations suggest that the lifetime is strongly influenced by lignin removal. Lifetime variations can be clearly visualised in the corresponding lifetime color-coded images of samples cell wall (Figure 3).



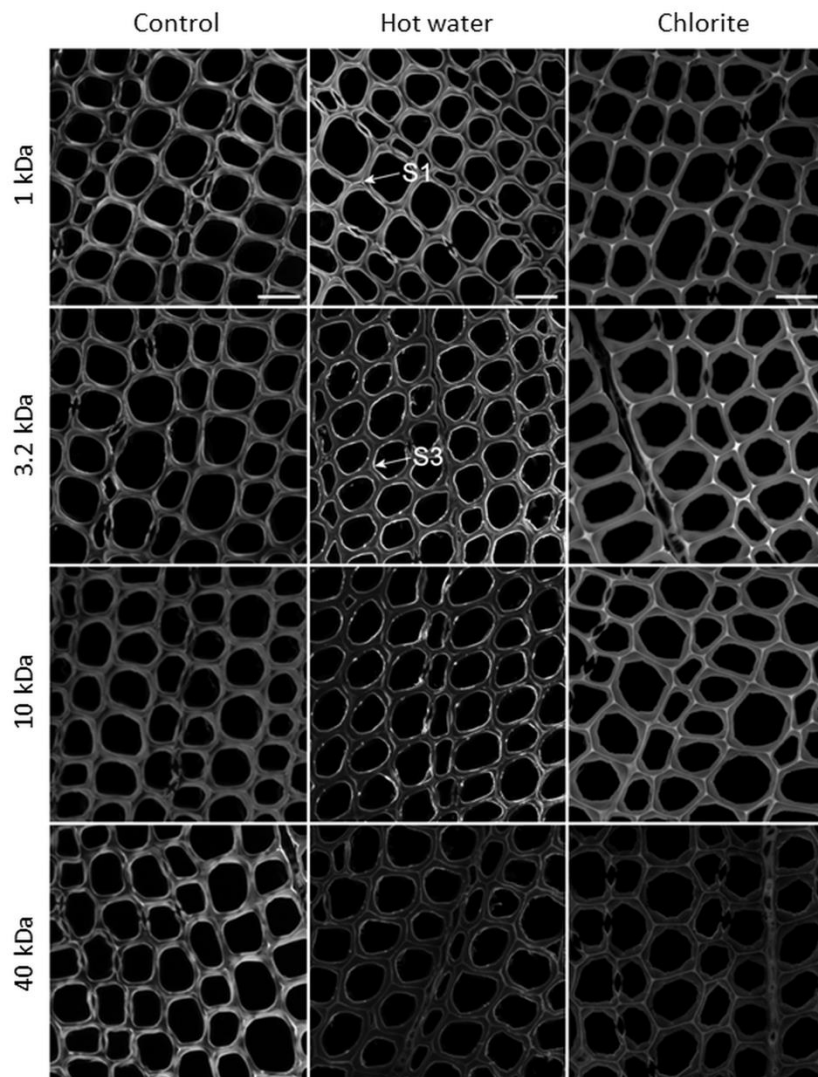
**Figure 3.** Fluorescence lifetime measurements (a) and corresponding lifetime images (b) for control and pretreated pine and poplar. Error bars show the 95% confidence interval. Scale bars = 30 μm

### PEG probes distribution

Distribution of the PEG probes in wood sections was visualised by fluorescence imaging of the rhodamine at 561 nm excitation. For the untreated pine (Figure 4), PEG probes are localised in the secondary cell wall and are excluded from the middle lamella. The distribution is similar for both 1 kDa-PEG and 3.4 kDa-PEG probes but is less well defined for the two larger probes 10 kDa-PEG and 40 kDa-PEG with much less penetration into the cell wall. The localisation of PEG is very similar in the hot water pretreated pine sample. Distribution in the chlorite-pretreated sample is very different since fluorescence is very

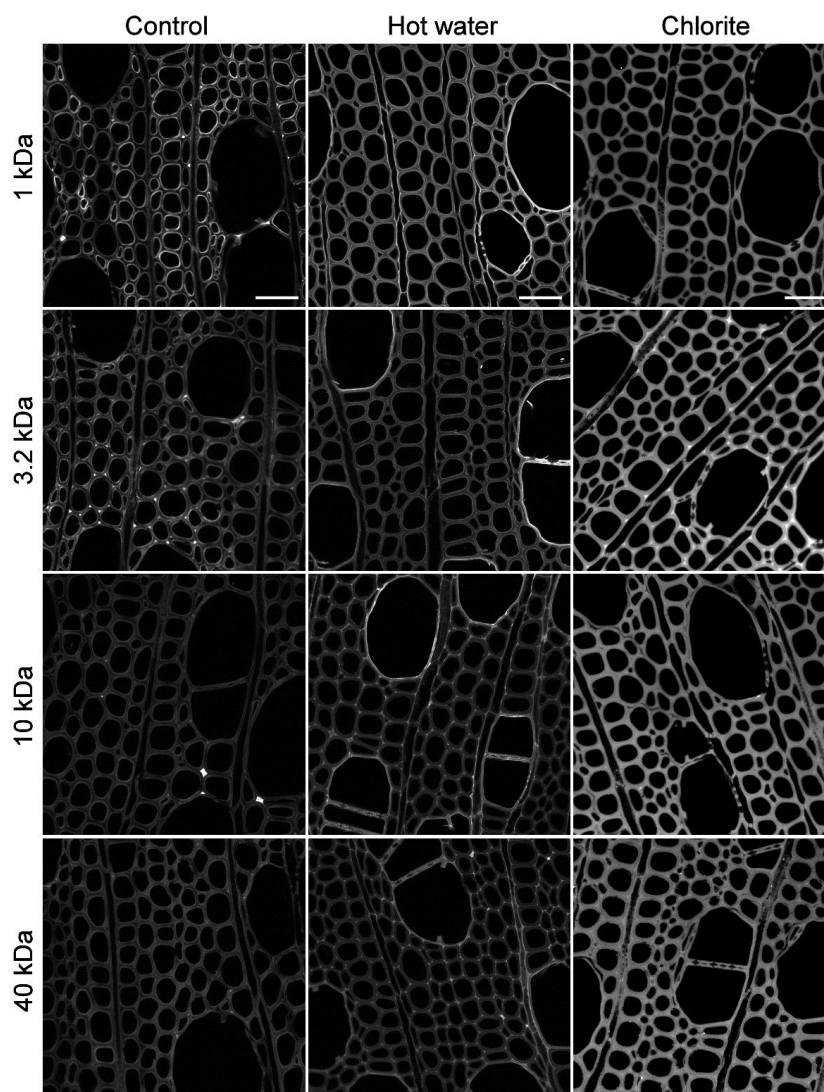


intense in cell corners and middle lamella and appears to be uniform, with a penetration of the probes that declines slightly for 10 kDa-PEG and more steeply for 40 kDa-PEG (Figure 4).



**Figure 4.** PEG probes distribution in pine control, hot water and chlorite-pretreated pine samples. Scale bars = 40  $\mu\text{m}$ .

For poplar samples (Figure 5), results for control are similar to untreated pine with more uniform distribution of small probes than large ones. For the hot water pretreatment, all 4 probes show a greater affinity for vessel cell walls compared to fibres. Also, the distribution of PEG probes is more uniform in the cell wall with localisation in both secondary cell wall and middle lamella. For the chlorite pretreatment, high fluorescence intensity in comparison to control sample indicates a better penetration of all probes which show similar distribution whatever their size is.



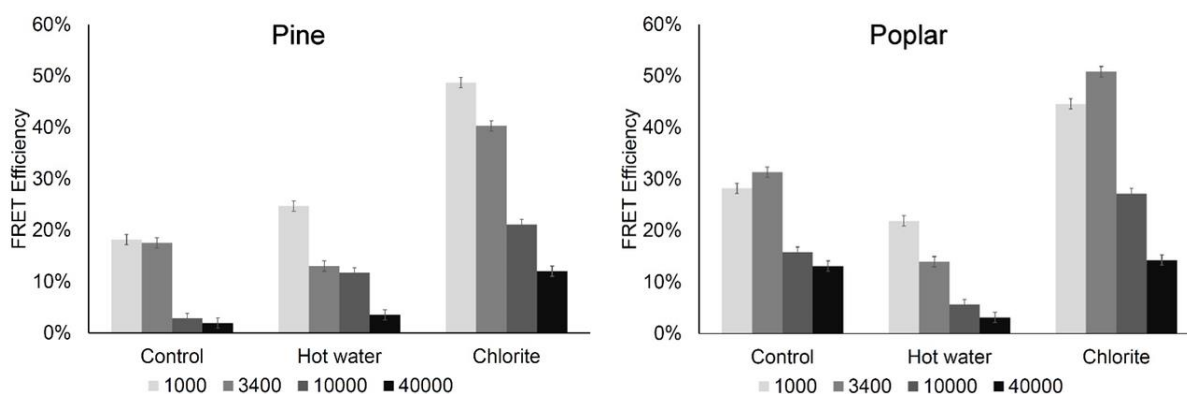
**Figure 5.** PEG probes distribution in poplar control, hot water, and chlorite-pretreated poplar samples. Scale bars = 40  $\mu\text{m}$ .

### **FRET efficiency**

PEG probes were then used to measure efficiency of FRET which is assumed to occur between lignin (donor) and rhodamine (acceptor) [34]. Control samples indicate there is essentially no detectable FRET in cell walls incubated only with water (data not shown). Also, cell walls incubated with probes but not subjected to photobleaching do not show any FRET (data not shown). Although we used equimolar concentrations of PEG probes, it was apparent that the different probes had different amounts of rhodamine label as shown by their apparent colour (supplementary information 1). To test if this variation in probe labelling would have a large or small effect on the amount of FRET we determined the FRET

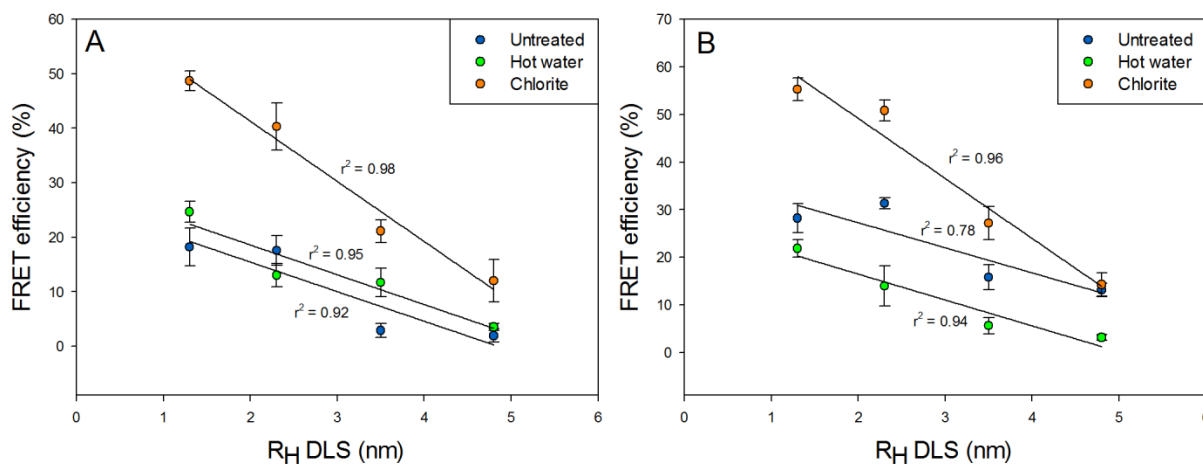
efficiency on a dilution series of the 1 kDa probe ranging from 2.5  $\mu\text{M}$  to 0.5  $\mu\text{M}$ . FRET measurements of pine sections treated with each of the 5 dilutions as described above showed a very small increase in FRET over a 0.5 – 2.5  $\mu\text{M}$  concentration range (14% - 18%)

For standardly prepared and photobleached samples, FRET efficiency generally declines with increasing molecular weight of the probe in both wood species (Figure 6). Control untreated poplar shows higher FRET efficiency (30 - 10%) than pine (20 - 2%) regardless of the probe size. For the hot water pretreatment, FRET efficiency in comparison to control is increased in pine for all probes (with the exception of 3.4 kDa-PEG), whereas surprisingly it is decreased in poplar, indicating that the impact of pretreatment on FRET is dependent on wood species. Finally, for the chlorite pretreatment, FRET efficiency is greatly increased in both species for all probes in comparison to control; only the 40 kDa-PEG probe FRET efficiency in poplar is unchanged, suggesting that the largest probe is still excluded to a significant extent.



**Figure 6.** FRET efficiency measurements for the control and pretreated pine and poplar. Error bars show the 95% confidence interval.

These results can be further presented considering FRET values and their hydrodynamic radii ( $R_H$ ), which is representative of their size as diffusing molecules. Indeed the increasing molecular weight (from 1 to 40 kDa) of the PEG probes corresponds to  $R_H$  from 1.3 to 4.8 nm. Thus considering poplar or pine wood samples, the FRET efficiency shows a high negative correlation with the probe size (Figure 7). Chlorite pretreatment allows a sharper increase of FRET efficiency with decreasing size of the probe (Figure 7) as compared to control and hot water pretreatment which have similar behaviour.



**Figure 7.** Effect of probe size on FRET efficiency measurements for the control and pretreated pine (A) and poplar (B).

## DISCUSSION

### Pretreatments induce chemical and spectral changes with enhanced saccharification of wood biomass

Pretreatments allowing removal of hemicelluloses and lignin from lignocellulosic biomass are known to increase enzymatic conversion of cellulose [10, 11]. Accordingly, hot water pretreatment mainly induced reduction in xylan and pectins in poplar samples as previously reported [14, 33, 42] thereby allowing higher glucose conversion yield. However this pretreatment did not induce higher enzymatic conversion of pine, suggesting that mannan removal after pretreatment in pine does not improve saccharification, contrary to xylan removal in poplar. Chemical analysis indicates that xylan albeit in weaker proportion than mannan, did not decrease in hot water-pretreated pine. One may hypothesise that higher recalcitrance of hot water pretreated pine could arise from increased complexity of lignin carbohydrate bonds involving different hemicelluloses in comparison to hardwood LCC that mostly involve xylan hemicelluloses [43].

Chlorite delignification of pine and poplar reached the same extent (ca. 75%) and would mainly explain the high conversion yield (ca. 100%). Thus, removal of lignin increases cellulose accessibility more effectively than removal of hemicelluloses, in accordance with their relative content, higher for lignin than for hemicelluloses.

Both fluorescence spectroscopy and fluorescence lifetime imaging have already been used to study lignin distribution during delignification pretreatments in bagasse fibres [26]. It was found that acid pretreatment narrowed the fluorescence spectrum while alkali pretreatment

broadened the spectrum and increased lifetime with typical values between 1 - 3 ns. Our results indicate that in agreement with lignin removal, chlorite pretreatment results in a decrease in fluorescence intensity. Increased fluorescence is observed after hot water pretreatment of pine in agreement with a previous study reporting a slight increase in lignin fluorescence by moderate temperature treatment of softwood [32]. Hemicelluloses in native wood are closely associated with lignin and could cause quenching of lignin fluorescence so that their partial removal or disassociation might result in an increase in quantum yield [44, 45]. This trend would be less pronounced in hot water pretreated poplar that showed similar fluorescence to untreated sample. Interaction between hemicelluloses and lignin can vary with the lignin type as mixed syringyl-guaiacyl unit (poplar) versus guaiacyl type in pine [43], the latter showing greater UV absorption than do syringyl-guaiacyl lignin [46]

Strong variations of the fluorescence lifetime are observed: low values (0.3 - 0.7 ns) for untreated samples, intermediate values (0.7 - 0.8 ns) for hot water pretreated samples and high values (1.5 - 1.8 ns) for chlorite-pretreated samples, these latter being similar to those of Coletta *et al.* [26]. Interestingly, large fluorescence lifetime differences between untreated poplar and pine disappear when samples become pretreated, whereas induced chemical modifications do not focus on the same polymers. Fluorescence lifetime is independent of fluorescence intensity and fluorophore concentration [47]. Fluorescence in plant cell wall mainly originates from lignin, which is composed of monolignols so that lignin can be seen as a complex fluorescent molecule made of fluorophores varying in their type and interlinkages. Since lifetime is sensitive to fluorophore structure, composition and presence of quenching agents, any changes of these characteristics lead to changes in lifetime. Regarding their composition, poplar contains much more syringyl lignin than pine, in which guaiacyl lignin is the main lignin. Moreover, poplar is known to have unusual lignin groups (*p*-hydroxybenzoate) [48]. So only based on the type and content of monolignols, it seems difficult to explain the difference in lifetime of untreated samples.

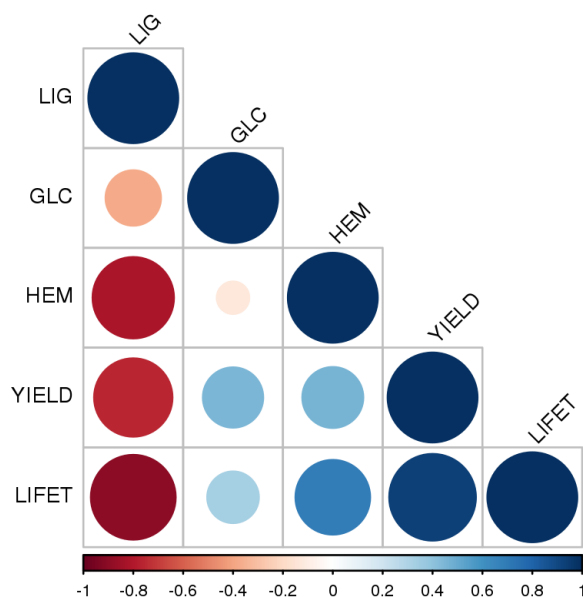
Changes in lignin structure and hemicelluloses composition/content between normal and compression wood of pine were associated with decreased lifetime [41]. In compression wood, lignin has increased conjugated structures, higher hemicelluloses content and modified hemicelluloses composition. Changes in lifetime have also been associated with different lignin structures in poplar wood cell walls [49]. Loosely packed lignin with a long lifetime (4 ns) was associated with secondary walls while dense lignin with a short lifetime (0.5 - 1.0 ns) was distributed throughout all wall layers. Dilute acid pretreatments were found to

shorten lignin lifetimes by extracting long lifetime low density lignins from the secondary wall. Using model compounds the abundance of cellulose as an additive to the lignin model compound was found to increase lifetime with increasing carboxymethyl cellulose content.

Thus it seems reasonable to attribute increased lifetimes of pretreated samples to the removal of hemicelluloses as a consequence of hot water pretreatment and depolymerisation of lignin as observed for chlorite-pretreated samples. The fact that chlorite-pretreated samples, despite a very low lignin content, display a long lifetime, highlights the influence of chemical structure on lifetime. Inter-linkages after chlorite-pretreatment must be largely altered, favouring the creation of dense conjugation in the remaining lignin-like network.

Overall, modifications of fluorescence lifetime reflect changes in lignin chemical composition and organisation in addition to interactions with other polymers in particular with hemicelluloses. But as a multifactorial characteristic, it does not seem possible to relate it precisely to a specific feature and lifetime must be seen as a general indicator of the lignin state.

Given that we have measured several chemical and spectral properties of the biomass samples, we have investigated the possible relationships between these factors and the saccharification yield by calculating correlation coefficients considering all samples (pine and poplar, untreated and pretreated) (Figure 8). Interestingly, the highest positive correlation coefficient is obtained between lifetime and saccharification yield (0.93), whereas the strongest negative correlation is between lifetime and lignin content (0.89), the latter being also negatively correlated with saccharification (0.75) and hemicelluloses content (0.82). Thus lifetime seems to be a dual indicator of both the lignin content, reflecting a combination of the lignin structural features as previously hypothesised, and of the saccharification yield, independent of biomass species and pretreatment type.



**Figure 8.** Correlation between factors characterising pine and poplar samples: YIELD (saccharification yield), LIG (lignin content), HEM (hemicelluloses content as sum of xylose+ mannose), GLC (glucan content), LIFET (lifetime as ps). Both colour and circle size indicate a strong correlation (blue: positive; red: negative).

### **Probe distribution and FRET measurements**

Rhodamine labelled PEGs have previously been demonstrated to bind lignin in steam-exploded pine [34]. Here, the increasing PEG probes penetration following pretreatment inversely correlated with probes molecular weight seems in agreement with their ability to reflect the accessibility of lignin in the cell wall. As a consequence, probes distribution underlines some differences in chemical features at the nanoscale. For example more uniform distribution of probes in poplar than in pine probably comes from condensed lignin structures, absence of syringyl lignin and main occurrence of mannan hemicelluloses in pine. High concentration of probes in the middle lamella of chlorite-pretreated samples is due to very accessible residual lignin favouring the accumulation of the probes, whereas they cannot access in the untreated samples.

Probes accessibility was quantified by measuring FRET that is assumed to occur between lignin (donor) and rhodamine (acceptor) [34]. In addition to classical requirements (dipole orientation, fluorophore vicinity), FRET depends on i) the capacity of the fluorescent probe to penetrate the pore samples: we hypothesise that the smaller it is, the better it is; ii) the binding interaction between PEG and lignin: we hypothesise the longer the PEG chain is, the stronger

it is. Thus a smaller probe would have a better penetration but a lower binding, and vice-versa.

FRET efficiency showed (Figure 7) a strong negative relationship with the probe size, small probes having the highest FRET values. This demonstrates that FRET efficiency is governed by the penetration of the probes, this factor being the most important to consider, validating our first hypothesis but rejecting the second one. In addition, FRET efficiency increased after pretreatment, whatever the biomass species and probes are. This seems rational based on the structural effect of pretreatment, favouring the penetration of probes. The only notable exception regards hot water-pretreated poplar for which FRET decreased in comparison to untreated sample. It cannot be ascribed to the increase in lignin content that is similar to that of pine, nor to fluorescence properties which are similar. Rather, it is likely due to structural modifications at the polymer scale that were not examined, such as some hemicelluloses modification causing reduced accessibility, or changes in lignin reactivity towards PEG caused by chemical modifications

Finally, since binding to lignin reflect probes penetration, correlation between FRET efficiency and saccharification yield was tested, considering each probe size independently. Interestingly, the saccharification yield shows decreasing positive correlation values of 0.80 for 1 kDa-PEG down to 0.45 for 40 kDa-PEG. This means that the small probe, whose size does not reflect the average size of cellulases degrading cellulose [50], has increasing interactions with lignin in samples whose hydrolysis is favoured. Use of such a small 1 kDa probe can thus be considered as a relevant indicator of sample digestibility.

## **CONCLUSIONS**

Combined fluorescence microscopic approaches allowed evaluating some pretreatment-induced cell walls modifications responsible for an enhancement of enzymatic saccharification yields. An increase in fluorescence lifetime was measured for after pretreatments for poplar and pine samples that displayed both strong positive correlations with the saccharification yield, and strong negative correlations with the lignin content of the samples. The fluorescence lifetime of the lignin can thus be considered as a good indicator of pretreatment efficiency and biomass digestibility. The repartition of PEG probes mimicking the non-productive interactions of enzymes with the lignin showed different repartitions of the probes according to the biomass species, emphasising a different organisation of the plant cell wall in softwood and hardwood. FRET efficiency allowing measuring the interactions



between PEG probes and the lignin was found to depend on the probes size, with interactions decreasing as the probes size increased. These results reflected the importance of structural accessibility on probes diffusion and interactions with the plant cell walls constituents. Overall, the FRET efficiency was increased after pretreatment, suggesting an increased accessibility that might be responsible for the improvement of the saccharification yield. The FRET efficiency of the 1 kDa-PEG probe was found to be strongly correlated with the saccharification yield. However, FRET efficiency was decreased after hot water pretreatment for the poplar samples, suggesting that probes interactions with lignin depend not only on lignin accessibility, but also on the chemistry of the polymer that is modified during the pretreatment process.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge funding from the Dumont d'Urville Programme (Campus France) for facilitating collaboration between France and New-Zealand.

### **REFERENCES**

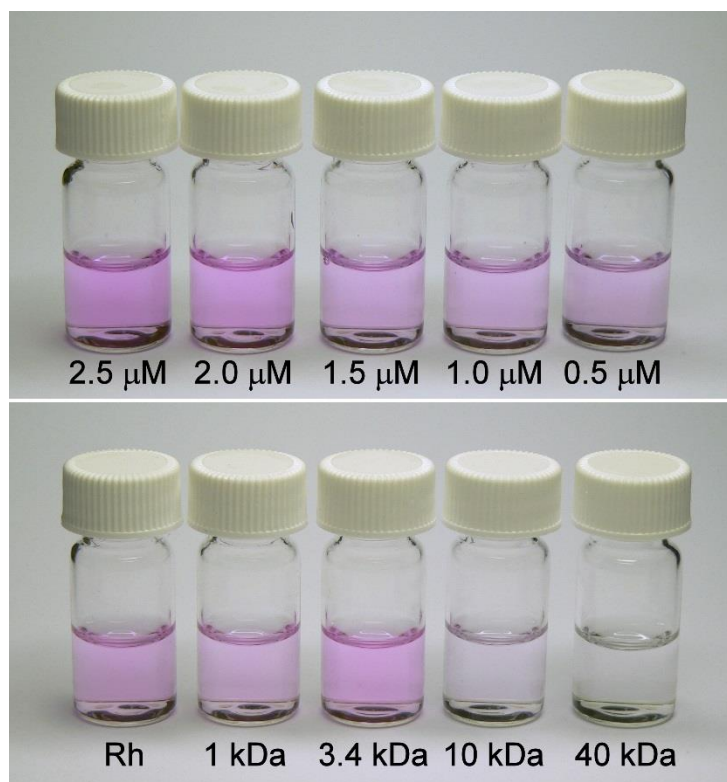
- [1] Menon V., Rao M., *Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept*. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38 (4), 522-550.
- [2] Burton R.A., *et al.*, *Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls*. Nature Chemical Biology, 2010, 6 (10), 724-732.
- [3] Paës G., *Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction: a review*. Molecules, 2014, 19 (7), 9380-402.
- [4] Arantes V., Sessler J.N., *Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates*. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4.
- [5] Zhao X.B., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr, 2012, 6 (4), 465-482.
- [6] Ding S.Y., *et al.*, *How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?* Science, 2012, 338 (6110), 1055-1060.

- 
- [7] Vaidya A.A., *et al.*, *Strength of adsorption of polyethylene glycol on pretreated Pinus radiata wood and consequences for enzymatic saccharification*. *Biomass & Bioenergy*, 2014, 70, 339-346.
- [8] Zeng Y., *et al.*, *Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27 (0), 38-45.
- [9] Silveira M.H.L., *et al.*, *Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries*. *ChemSusChem*, 2015, 8 (20), 3366-3390.
- [10] Agbor V.B., *et al.*, *Biomass pretreatment: fundamentals toward application*. *Biotechnology Advances*, 2011, 29 (6), 675-685.
- [11] Singh S., *et al.*, *Comparison of different biomass pretreatment techniques and their impact on chemistry and structure*. *Frontiers in Energy Research*, 2015, 2 (62).
- [12] Penttilä P.A., *et al.*, *Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose*. *Bioresource Technology*, 2013, 129 (0), 135-141.
- [13] Meng X., *et al.*, *Determination of porosity of lignocellulosic biomass before and after pretreatment by using Simons' Stain and NMR techniques*. *Bioresource Technology*, 2013, 144, 467-476.
- [14] Trajano H.L., *et al.*, *Xylan hydrolysis in Populus trichocarpa x P. deltoides and model substrates during hydrothermal pretreatment*. *Bioresource Technology*, 2015, 179, 202-210.
- [15] Asada C., *et al.*, *Chemical characteristics and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass treated using high-temperature saturated steam: Comparison of softwood and hardwood*. *Bioresource Technology*, 2015, 182 (0), 245-250.
- [16] Ralph J., *et al.*, *Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids*. *Phytochemistry Reviews*, 2004, 3, 29-60.
- [17] Scheller H.V., Ulvskov P., *Hemicelluloses*. In *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, 2010; Vol. 61, pp 263-289.
- [18] Meng X.Z., *et al.*, *Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus*. *Green Chemistry*, 2015, 17 (8), 4239-4246.
- [19] Nitsos C.K., *et al.*, *Optimization of hydrothermal pretreatment of hardwood and softwood lignocellulosic residues for selective hemicellulose recovery and improved cellulose enzymatic hydrolysis*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4 (9), 4529-4544.
-

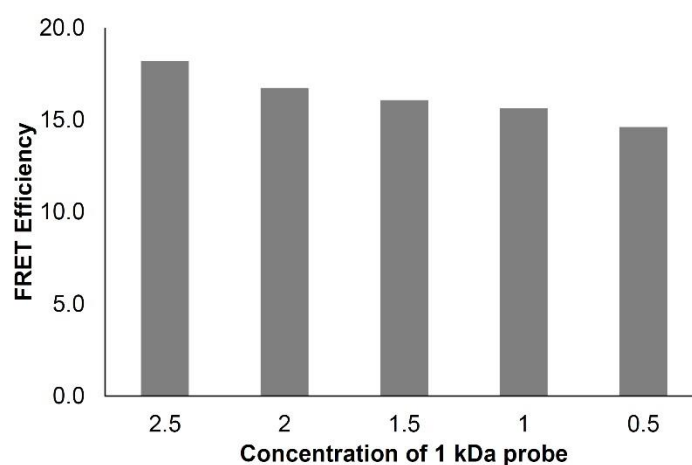
- 
- [20] Studer M.H., *et al.*, *Lignin content in natural Populus variants affects sugar release*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108 (15), 6300-6305.
- [21] Mottiar Y., *et al.*, *Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification*. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 37, 190-200.
- [22] Donohoe B.S., Resch M.G., *Mechanisms employed by cellulase systems to gain access through the complex architecture of lignocellulosic substrates*. Current Opinion in Chemical Biology, 2015, 29, 100-107.
- [23] Chundawat S.P.S., *et al.*, *Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment*. Energy & Environmental Science, 2011, 4 (3), 973-984.
- [24] Belmokhtar N., *et al.*, *Changes in phenolics distribution after chemical pretreatment and enzymatic conversion of Miscanthus x giganteus internode*. Bioenergy Research, 2013, 6 (2), 506-518.
- [25] Ma J., *et al.*, *Revealing the changes in topochemical characteristics of poplar cell Wall during hydrothermal pretreatment*. Bioenergy Research, 2014, 7 (4), 1358-1368.
- [26] Coletta V.C., *et al.*, *Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy*. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6.
- [27] Thygesen L.G., *et al.*, *Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38 (8), 975-983.
- [28] Moran-Mirabal J.M., *The study of cell wall structure and cellulose-cellulase interactions through fluorescence microscopy*. Cellulose, 2013, 20 (5), 2291-2309.
- [29] Luterbacher J.S., *et al.*, *Modeling Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates using Fluorescent Confocal Microscopy II: Pretreated Biomass*. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112 (1), 32-42.
- [30] Donaldson L., Vaidya A., *Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy*. Scientific Reports, 2017, 7.
- [31] Yang D., *et al.*, *Investigation of the porous structure of cellulosic substrates through confocal laser scanning microscopy*. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110 (11), 2836-2845.
-

- 
- [32] Donaldson L.A., *et al.*, *Detection of wood cell wall porosity using small carbohydrate molecules and confocal fluorescence microscopy*. *Journal of Microscopy*, 2015, 259 (3), 228-236.
- [33] Paës G., *et al.*, *Exploring accessibility of pretreated poplar cell walls by measuring dynamics of fluorescent probes*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10, 15.
- [34] Donaldson L.A., *et al.*, *Nanoscale Interactions of Polyethylene Glycol With Thermo-Mechanically Pre-Treated Pinus radiata Biofuel Substrate*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111 (4), 719-725.
- [35] Kumar R., *et al.*, *Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2013, 130, 372-381.
- [36] Wise L.E., *et al.*, *Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses*. *Paper Trade Journal*, 1946, 122 (2), 11-19.
- [37] Seaman J., *et al.*, *Techniques for determination of wood constituents by quantitative paper chromatography*. *Tappi Journal*, 1954, 37 (8), 336-343.
- [38] Iiyama K., Wallis A.F.A., *Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1990, 51, 145-161.
- [39] Lapierre C., *et al.*, *Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions*. *Holzforschung*, 1986, 40, 113-119.
- [40] Auxenfans T., *et al.*, *Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment*. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 36.
- [41] Donaldson L.A., Radotic K., *Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood*. *Journal of Microscopy*, 2013, 251 (2), 178-187.
- [42] Assor C., *et al.*, *Concomitant changes in viscoelastic properties and amorphous polymers during the hydrothermal treatment of hardwood and softwood*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (15), 6830-6837.
- [43] Balakshin M., *et al.*, *Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy*. *Planta*, 2011, 233 (6), 1097-1110.
-

- 
- [44] Abe K., Yamamoto H., *Change in mechanical interaction between cellulose microfibril and matrix substance in wood cell wall induced by hygrothermal treatment*. Journal of Wood Science, 2006.
- [45] Ding D.Y., *et al.*, *How does hemicelluloses removal alter plant cell wall nanoscale architecture and correlate with enzymatic digestibility?* Bioenergy Research, 2016, 9 (2), 601-609.
- [46] Fergus B.J., Goring D.A.I., *The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy*. Holzforschung, 1970, 24, 118-124.
- [47] Berezin M.Y., Achilefu S., *Fluorescence lifetime measurements and biological imaging*. Chemical Reviews, 2010, 110 (5), 2641-2684.
- [48] Ralph J., *et al.*, *Lignins*. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons L., Chichester., Ed. 2007.
- [49] Zeng Y., *et al.*, *In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid*. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8 (1), 126.
- [50] Luterbacher J.S., *et al.*, *A pore-hindered diffusion and reaction model can help explain the importance of pore size distribution in enzymatic hydrolysis of biomass*. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110 (1), 127-136.

**SUPPLEMENTARY FIGURES**

**Figure S1.** Dilution series of 1kDa PEG probe (top row) and the variation in equimolar probe solutions (1.6 μM) with probe size relative to Rhodamine solution showing the varying amount of rhodamine label on each probe.



**Figure S2.** Variation of FRET efficiency with probe concentration in the 1 kDa-PEG probe on control pine sections.



# **CHAPITRE 5**

## **RÉSUMÉ ÉTENDU**

Les résultats obtenus dans les chapitres précédents ont permis de mieux comprendre le lien existant entre l'action catalytique des enzymes et leur progression au sein des parois au cours de la saccharification. Bien qu'une approche dynamique ait été adoptée, dans le sens où l'activité et la diffusion des enzymes ont été étudiées à travers la quantité de glucose libéré et la mobilité de sondes fluorescentes respectivement, les analyses ont été effectuées à des temps bien précis et ne reflètent donc pas une évolution continue des paramètres étudiés.

L'objectif principal de ce dernier chapitre est d'imager en temps réel l'effet synergique de la Lytic Polysaccharide Monooxygenase de *Podospora anserina* (PaLPMO9E) et du cocktail commercial Celluclast<sup>®</sup>, contenant des cellulases de *T. reesei*, sur la dégradation des parois. L'action des enzymes, ainsi que leur progression au sein de différents tissus de miscanthus prétraité ont pu être suivies par mesure de l'autofluorescence des enzymes et des parois, ainsi que par microspectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) grâce à l'utilisation de rayonnements synchrotron.

L'hydrolyse enzymatique d'échantillons de miscanthus prétraités par explosion à la vapeur et au chlorite de sodium a montré une amélioration de l'action du cocktail Celluclast<sup>®</sup> en présence de la PaLPMO9E sur les échantillons prétraités, qui n'a pas été observé pour les échantillons de miscanthus non traités, ce qui valide l'effet synergique des enzymes.

L'analyse microscopique de l'activité et de la progression des enzymes au sein des parois a été réalisée sur les échantillons de miscanthus non traités et soumis au prétraitement au chlorite de sodium, qui permet, au contraire de l'explosion à la vapeur, de maintenir l'organisation tissulaire et pariétale, comme nous l'avons observé dans le chapitre 1.

Les observations de l'effet des enzymes sur des coupes de miscanthus en microscopie optique ont révélé que les différents tissus constitutifs des tiges n'étaient pas ou très peu dégradés par l'action de la Celluclast<sup>®</sup> pour le miscanthus non traité. Pour le miscanthus prétraité au chlorite de sodium, des effets différents ont été observés en fonction des tissus. Le sclérenchyme externe ne semble pas affecté par l'action des enzymes, à l'exception du phloème, alors que le parenchyme interne est rapidement dégradé. La région intermédiaire riche en parenchyme inter-fasciculaire est dégradée de manière plus lente, principalement au niveau du parenchyme, et cette dégradation est accélérée lors de l'ajout de PaLPMO9E.

Cette zone a donc été sélectionnée pour analyser la progression et l'action des enzymes par autofluorescence. Les enzymes n'ont pas été détectées au sein des parois pour le miscanthus non traité, alors qu'une augmentation de l'autofluorescence a été mesurée au



cours du temps dans les parois du miscanthus prétraité, en accord avec les observations précédentes. Cette augmentation est plus importante lors de l'action combinée de la Celluclast<sup>®</sup> et de la PaLPMO9E et s'accompagne d'une diminution de l'autofluorescence des parois, qui est elle aussi plus marquée en cas d'action combinée des deux enzymes. De manière intéressante, une autofluorescence des protéines plus importante a été observée au niveau de la gaine des cellules sclérenchymateuses, alors que ces dernières sont moins facilement dégradées, suggérant une action préférentielle des enzymes en fonction du type cellulaire.

L'analyse des parois par microspectrométrie FT-IR a montré une dégradation différente de la cellulose en fonction du type cellulaire. De manière intéressante, la cellulose du sclérenchyme est plus impactée par l'action combinée des deux enzymes que la cellulose du parenchyme, alors que les données précédentes ont montré une meilleure conservation du sclérenchyme au cours de la dégradation. Cette différence pourrait s'expliquer par des modifications locales de la cristallinité induite par le prétraitement, qui deviendrait plus importante au niveau du sclérenchyme. Cela pourrait expliquer l'intensité de fluorescence des protéines plus importante observée au niveau des cellules sclérenchymateuses lors de l'ajout de PaLPMO9E, qui attaque préférentiellement les régions cristallines de la cellulose.

---

## Action of lytic polysaccharide monooxygenase on plant tissue is governed by cellular type

Brigitte Chabbert<sup>1\*</sup>, Anouck Habrant<sup>1</sup>, Mickaël Herbaut<sup>1</sup>, Laurence Foulon<sup>1</sup>, Véronique Aguié-Béghin<sup>1</sup>, Sona Garajova<sup>2</sup>, Sacha Grisel<sup>2</sup>, Chloé Bennati-Granier<sup>2</sup>, Isabelle Gimbert-Herpoël<sup>2</sup>, Frédéric Jamme<sup>3</sup>, Matthieu Réfrégiers<sup>3</sup>, Christophe Sandt<sup>3</sup>, Jean-Guy Berrin<sup>2</sup> and Gabriel Paës<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FARE Laboratory, INRA, University of Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France

<sup>2</sup> BBF, INRA, Aix Marseille University, Polytech'Marseille, 13288 Marseille, France

<sup>3</sup> Synchrotron SOLEIL, 91190 Saint Aubin, France

### **ABSTRACT**

Lignocellulosic biomass bioconversion is hampered by the structural and chemical complexity of the network created by cellulose, hemicelluloses and lignin. Biological conversion of lignocellulose involves synergistic action of a large array of enzymes including the recently discovered lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) that perform oxidative cleavage of cellulose. Using *in situ* imaging by synchrotron UV fluorescence, we have shown that the addition of AA9 LPMO (from *Podospora anserina*) to cellulases cocktail improves the progression of enzymes in delignified *Miscanthus x giganteus* as observed at tissular levels. *In situ* chemical monitoring of cell wall modifications performed by synchrotron infrared spectroscopy during enzymatic hydrolysis demonstrated that the boosting effect of the AA9 LPMO was dependent on the cellular type indicating contrasted recalcitrance levels in plant tissues. Our study provides a useful strategy for investigating enzyme dynamics and activity in plant cell wall to improve enzymatic cocktails aimed at expanding lignocelluloses biorefinery.

---

## **INTRODUCTION**

Plant cell walls constitute the largest renewable source of biomass on Earth that can supply environmental benefits for the production of fuel, chemicals and materials. They are composed by lignocellulose made from three main polymers (cellulose, hemicelluloses, lignin) assembling as a network whose structural and chemical complexity hampers hydrolysis of cellulose by enzymes and micro-organisms [1]. In addition, cell walls display high variability depending on genetic and environmental factors, as well as plant tissue and cell types [2-4]. Understanding plant cell wall complexity during lignocellulosic bioconversion is therefore important to identify critical features impacting hydrolysis, for optimising pretreatments of biomass [5] and enzyme cocktails [6].

Investigation of the dynamics of lignocellulose hydrolysis requires physicochemical characterisation and multiscale visualisation [7, 8]. Combined approach using multiple microscopic techniques including light microscopy, immunocytochemistry and microspectrometry can be used to monitor microstructural and topochemical heterogeneity of plant cell walls and their recalcitrance at subcellular and cell levels [9-14]. In addition, spatial and temporal imaging of enzymes distribution within lignocellulose substrates can be carried out by means of immunoprobe or fluorescent labelled proteins [15-17] to study accessibility at the molecular scale [18, 19]. However real time imaging of cell wall microstructure and enzyme distribution during bioconversion still remains challenging.

Enzymatic degradation of cellulose and hemicelluloses involves several types of enzymes, namely glycoside hydrolases that work synergistically [20, 21]. To overcome the recalcitrance of plant polysaccharides, filamentous fungi and bacteria secrete lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) that perform oxidative cleavage of glycoside bonds [22-24]. In industrial processes, addition of LPMOs to cellulolytic cocktails leads to the reduction of the enzyme loading required for efficient saccharification of lignocellulosic biomass [25]. These powerful enzymes are copper-containing enzymes classified within the auxiliary activity (AA) class of the CAZy database ([www.cazy.org](http://www.cazy.org) [26]) in AA9-AA11 and AA13 families. AA9 LPMOs are mostly active on cellulose but some have been shown to act on xyloglucan and glucomannan [24, 27]. Despite their recognized boosting effect on biomass hydrolysis, AA9 LPMOs activity has been essentially investigated on model substrates with only sparse studies focusing on the insoluble fraction of the substrate that show their disruptive action at the surface of cellulosic fibers [28-30]. To our knowledge, no studies have investigated the impact of LPMOs on lignocellulose substrate at the plant tissue and cell wall levels.

In this study, we have followed the LPMO action on miscanthus as a model substrate using dynamical imaging. Enzymes from a commercial *Trichoderma reesei* cellulose-active cocktail (Celluclast<sup>®</sup>) were tested in combination with a fungal AA9 LPMO from *Podospora anserina* (*Pa*LPMO9E) bearing a family 1 carbohydrate binding module and acting on cellulose only [31]. Taking advantage of the high tuneability, brilliance and stability of the synchrotron light source, deep-UV autofluorescence of the enzymes and of the cell walls were used to track the enzyme localisation and to follow real-time cell wall modifications. Synchrotron Fourier Transformed InfraRed (FTIR) microspectrometry enabled to follow *Pa*LPMO9E-mediated chemical changes of the cell walls during hydrolysis.

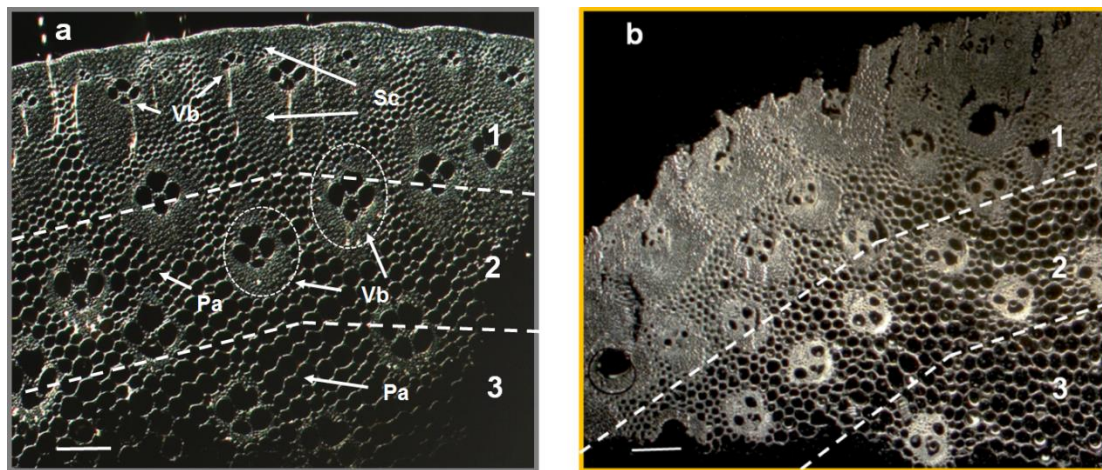
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Enzymatic hydrolysis of miscanthus**

Although LPMOs are known to boost the saccharification of plant cell wall [29], they have never been tested on miscanthus, which is a candidate perennial bioenergy crop producing high biomass with low input and environmental impact [32-34]. The ability of *Pa*LPMO9E to improve saccharification of pretreated miscanthus was first evaluated on steam-exploded miscanthus. Indeed, steam explosion is currently among the most effective pretreatment for second generation biofuels production and can be scaled-up industrially [35-37]. Steam explosion consists in application of steam at a high pressure followed by rapid decompression, inducing destructurement of lignocellulose and tissue disruption with lignin recondensation (Supplementary Figure 1a) [38, 39]. Addition of *Pa*LPMO9E to Celluclast<sup>®</sup> increased glucose yields by 87 % (Supplementary Figure 1b) in comparison to the action of Celluclast<sup>®</sup> alone. *Pa*LPMO9E was previously shown to oxidatively cleave cellulose at the C<sub>1</sub> position of the glucose unit [31]. Accordingly, C<sub>1</sub>-oxidized cello-oligosaccharides were detected following the addition of *Pa*LPMO9E alone or with Celluclast<sup>®</sup> on steam-exploded miscanthus (Supplementary Figure 1c) confirming *Pa*LPMO9E was responsible for the improvement in glucose yield.

Having demonstrated that *Pa*LPMO9E favoured cellulose enzymatic conversion of steam-exploded miscanthus, the boosting effect of *Pa*LPMO9E on the architecture of miscanthus was investigated at the cell wall scale. Such imaging requires lower severity of pretreatment to make observations of undamaged tissues. Since the steam explosion pretreatment dislocates the plant tissues, it did not seem appropriate. Rather, sodium chlorite-acetic acid treatment

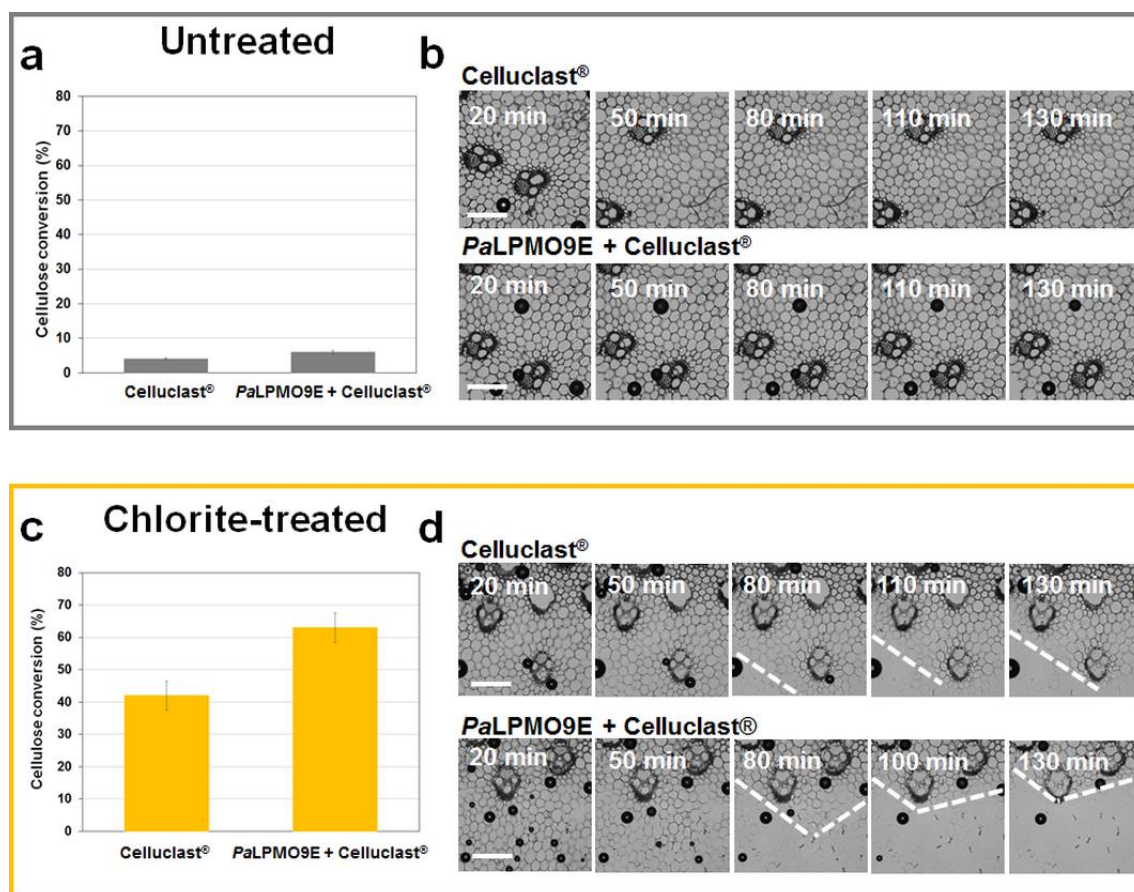
(so-called chlorite-pretreatment) was applied to small portions of miscanthus stem samples to preserve cell and tissue organisation. This reagent is widely used as delignification agent in paper industry for example [10, 40, 41]. Regarding chemical composition, chlorite pretreatment induced a strong decrease of the lignin content of miscanthus sample (from 26 % to 5% dry matter) in comparison to untreated sample (Supplementary Figure 2). Consequently, proportion of polysaccharides, especially cellulose, increased in chlorite-treated miscanthus (from 70 to 83% dry matter). Despite large variations in composition, the tissular and cell architecture of the sample was preserved as revealed by observations of transverse section of miscanthus stem at the cell scale (Figure 1) [3, 11]. Since stem miscanthus includes different cell types with typical organisation pattern as comparable to grass species [42], three main regions were distinguished from the outer to the inner part of a transverse section (Figure 1a): i) Region 1: the rind mainly including thick layer of sclerenchyma, with a small amount of small vascular bundles; ii) Region 2: the middle region, rich in interfascicular parenchyma and vascular bundles which are surrounded by a wide sclerenchyma sheath; iii) Region 3: the innermost region rich in parenchyma. Although outermost cells were slightly altered by chlorite treatment, the whole stem tissue architecture was not altered by the treatment (Figure 1b).



**Figure 1.** Visible light imaging of stem tissue architecture of untreated and chlorite-treated miscanthus sections. (a) Untreated miscanthus sample. (b) Chlorite-treated miscanthus sample. For each sample, transverse sections show three main regions: 1) rind with thick layer of sclerenchyma (Sc) and small vascular bundles (Vb), 2) middle region rich in interfascicular parenchyma (Pa) and vascular bundles which are surrounded by a wide sclerenchyma sheath, 3) innermost region rich in parenchyma. Scale bars are 200  $\mu\text{m}$ .

---

Considering the untreated miscanthus, Celluclast<sup>®</sup> only permitted a limited conversion of cellulose, which was not enhanced by the addition of *PaLPMO9E* (Figure 2a). The chlorite-treated sample conversion was ~25% with the cellulase cocktail alone, and reached 36% upon addition of *PaLPMO9E* (Figure 2c). Tissular changes were followed in the 3 regions defined in Figure 1. For both untreated and chlorite samples, the Region 1 that contains thick-wall sclerenchyma was unaltered over a time-period of more than 2 hours when incubated with *PaLPMO9E* + Celluclast<sup>®</sup> except of phloem cells in vascular bundles (Supplementary Figure 3). In agreement with the low recalcitrance of pith parenchyma [10], the Region 3 showed fast degradation following addition of Celluclast<sup>®</sup>, making difficult real-time observation of this region along enzymatic conversion. In Region 2 no changes in tissular architecture of untreated miscanthus were observed after 2 hours of incubation with enzymes (Figure 2b). In contrast, chlorite-treated miscanthus displayed significant modifications of Region 2 that mainly showed degradation of the parenchyma (Figure 2d). More precisely, degradation occurred faster when the *PaLPMO9E* was present since the parenchyma had disappeared after 80 min of incubation with *PaLPMO9E* + Celluclast<sup>®</sup> but was still present after 130 min with the cellulase cocktail alone. Overall, direct light imaging of enzymatic incubation of chlorite-treated miscanthus indicates tissue heterogeneity regarding susceptibility to enzymes. These observations suggest that the increase in the rate of enzymatic conversion of chlorite samples by addition of *PaLPMO9E* seems to be explained by a higher susceptibility of parenchyma in Region 2, thereby revealing that synergistic effect of accessory enzymes on cell wall saccharification varies at tissular level.



**Figure 2.** Effect of *PaLPMO9E* on the degradation of untreated and chlorite-treated miscanthus. Cellulose conversion of (a) untreated and (c) chlorite-treated miscanthus. Visible light time-lapse imaging of Region 2 of (b) untreated and (d) chlorite-treated miscanthus with Celluclast® alone and *PaLPMO9E* + Celluclast®. Dotted lines delineate the degraded parenchyma area region. Scale bars are 200  $\mu\text{m}$ .

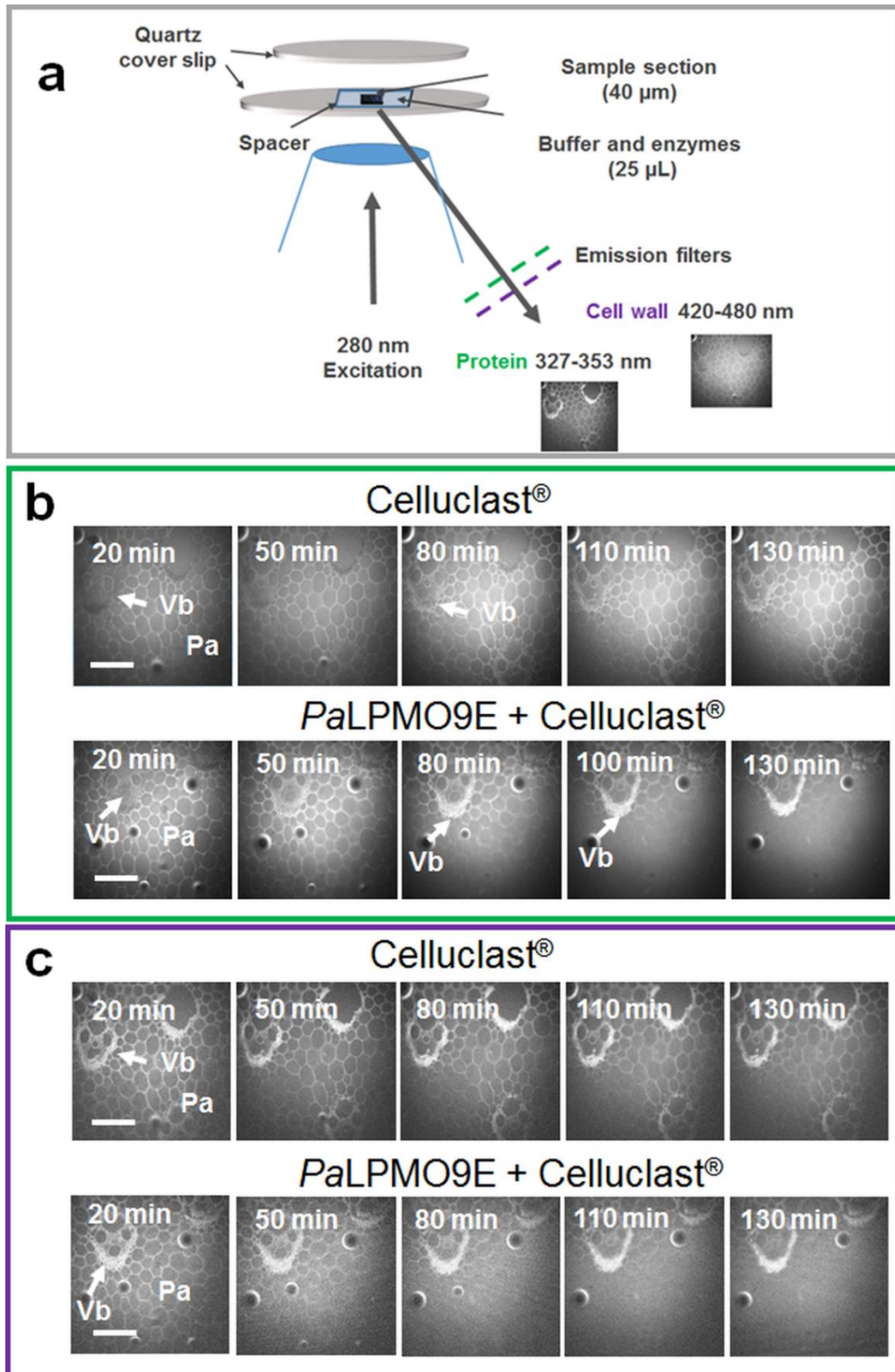
### Synchrotron fluorescence imaging

To visualise both enzymes and cell wall during enzymatic saccharification, time lapse fluorescence imaging at different emission wavelengths was implemented (Figure 3a). First, enzymes were followed through their aromatic amino acids (mainly tryptophan) using synchrotron UV fluorescence to track enzymes *in situ* (Figure 3b) [43, 44]. For the untreated miscanthus, fluorescence imaging of Region 2 did not indicate the presence of protein even after more than 2 hours of incubation with the *PaLPMO9E* + Celluclast® (Supplementary Figure 4). This observation is consistent with visible light imaging of miscanthus (Figure 2b) indicating the absence of any structural modification in the same conditions. In contrast, for the chlorite-treated sample, protein fluorescence was detected in the cell walls and the increase in fluorescence was more important and occurred earlier in the presence of

---

*PaLPMO9E* (Figure 3b). As a negative control, the same sample incubated in buffer with no enzymes did not show any significant modifications (Supplementary Figure 5). Importantly, sclerenchyma sheath of the vascular bundles displayed higher fluorescence intensity (Figure 3b). These observations demonstrate a faster progression of the cellulases in the presence of *PaLPMO9E* and preferential cell wall degradation within stem cells. Following observation of proteins, cell walls were imaged by following the fluorescence of phenolic compounds using an excitation wavelength of 280 nm and an emission filter at 420-480 nm (Figure 3a). In agreement with visible light observation and protein imaging, the cell wall remained unchanged for untreated miscanthus after 2 hours of incubation with buffer or enzymes (Supplementary Figure 4). In contrast, time lapse imaging of chlorite-treated miscanthus showed a decrease in the parenchyma cell wall fluorescence during enzymatic saccharification (Figure 3c), while no variation of fluorescence was observed when the sample was incubated in buffer alone (Supplementary Figure 5). The decrease in fluorescence in the presence of *PaLPMO9E* appeared higher than without (Figure 3c), as observed previously with visible light imaging (Figure 2d). Incubation of both untreated and chlorite samples with buffer even after 4 hours of incubation did not show any fluorescence change, indicating that the synchrotron beam light did not induce significant change during the course of the analysis (Supplementary Figures 4 and 5). Overall fluorescence UV synchrotron imaging allowed distinguishing variations in dynamic of enzymes and in cell wall breakdown according to the type of cell and tissue.





**Figure 3.** Fluorescence time-lapse imaging of enzymatic conversion of chlorite-treated miscanthus. (a) Experimental set-up of the deep-UV fluorescence imaging at synchrotron beamline. (b) Evolution of protein fluorescence during hydrolysis by Celluclast<sup>®</sup> alone or with *PaLPMO9E*. (c) Evolution of cell wall fluorescence during hydrolysis by Celluclast<sup>®</sup> alone or with *PaLPMO9E*. Scale bars are 200  $\mu\text{m}$ .

### **Synchrotron FTIR analysis**

As for visible light and fluorescence imaging, real time FTIR characterisation of miscanthus samples was achieved in a microfluidic device that allowed following structural changes of the cell walls in the presence of enzymes (Figure 4a). More specifically, real time FTIR imaging was performed on Region 2: vascular bundles that include different cell types (sclerenchyma, tracheids, phloem) and adjacent parenchyma cells (Figure 4b). As compared to untreated miscanthus, infrared spectra of the chlorite sample were altered at initial time of analysis (20 min): intensity of the bands assigned to lignin ( $1505\text{ cm}^{-1}$  and  $1460\text{ cm}^{-1}$ ) decreased in agreement with compositional data (Supplementary Figure 2). FTIR spectra did not change during the following 2 hours of incubation with buffer (Supplementary Figure 6) showing the stability of the miscanthus section in the absence of enzyme. Enzymatic degradation of phloem cells were not monitored by FTIR imaging, as these thin-walled and unglified cells were quickly degraded by Celluclast<sup>®</sup> (less than 30 min). When incubated with enzymes, the spectra of the chlorite-treated miscanthus showed decreasing intensity of several vibration bands assigned to lignocellulosic polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) as illustrated by the corresponding spectral regions recorded for sclerenchyma and parenchyma (Figures 4 c-f). Compared to incubation with Celluclast<sup>®</sup> (Figures 4c and 4e), addition of PaLPMO9E induced stronger alteration of the spectra (Figures 4d and 4f). This indicates that the progressive degradation of the cell walls by cellulases is enhanced by adding PaLPMO9E in agreement with previous fluorescence observations. Two main bands at  $1060$  and  $1105\text{ cm}^{-1}$  representative of cellulose [12] were selected to compare the course of the degradation at the cell level (sclerenchyma, parenchyma, tracheids). Intensity of these two bands was expressed relatively to the intensity at the beginning of hydrolysis (Table 1). No significant changes of the band intensity occurred after 80 min incubation with Celluclast<sup>®</sup> alone for the three cell types. Addition of the PaLPMO9E to Celluclast<sup>®</sup> resulted in almost 40% decrease in the intensity of the bands assigned to cellulose after 40 min of incubation whereas lower changes were observed for parenchyma (30%) and tracheids (10%) suggesting structural important differences in the recalcitrance of chlorite-treated miscanthus cells. Such heterogeneity was still observed after 80 min of incubation with PaLPMO9E. Thus combining Celluclast<sup>®</sup> and PaLPMO9E during hydrolysis induced a sharper decrease in the absorption for both bands compared to Celluclast<sup>®</sup> alone, especially for sclerenchyma. Faster and more severe degradation of cellulose was thus achieved on chlorite-treated miscanthus in the presence of PaLPMO9E, and this enhancement depended on the cell type with sclerenchyma

degradation being more affected compared to parenchyma and sclerenchyma. This result can be explained by the structural heterogeneity of corresponding cell walls (i.e. lignin content and composition, non-cellulosic matrix) [3, 42]. Indeed delignification can impact cellulose structure and removes some hemicelluloses and pectins. Interestingly, cellulose crystallinity was shown to increase after chlorite delignification [41]. Since PaLPMO9E preferentially acts on crystalline cellulose, one can suggest that higher crystallinity of cellulose in delignified sclerenchyma would explain the stronger boosting effect of PaLPMO9E on cellulases degradation of sclerenchyma.

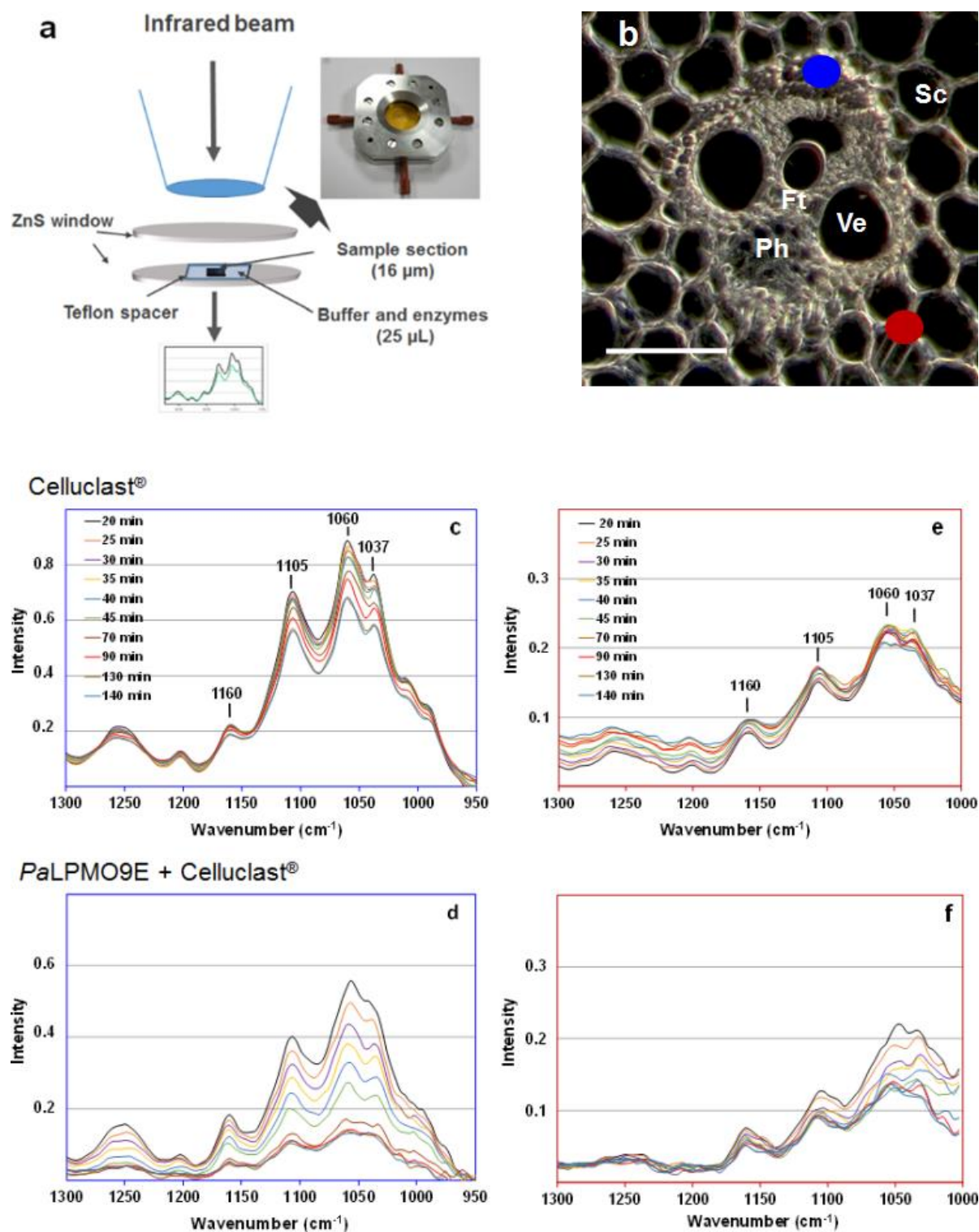
**Table 1.** Changes in FTIR absorbance at 1060 and 1105  $\text{cm}^{-1}$  of chlorite-treated miscanthus vascular bundle area (sclerenchyma, parenchyma, tracheids) after 40 min and 80 min of incubation with Celluclast<sup>®</sup> alone or with PaLPMO9E. Band intensity values are expressed as percent of the intensity measured at the initial recording time. Starting recorded values (20 min) have been normalized at 100 for each wavenumber.

	Sclerenchyma		Parenchyma		Tracheid	
	40 min	80 min	40 min	80 min	40 min	80 min
<b>Celluclast<sup>®</sup></b>						
1060 $\text{cm}^{-1}$	98 ± 2	93 ± 4	104 ± 1	109 ± 4	103 ± 3	99 ± 15
1105 $\text{cm}^{-1}$	99 ± 1	94 ± 1	107 ± 1	118 ± 5	104 ± 4	111 ± 11
<b>PaLPMO9E + Celluclast<sup>®</sup></b>						
1060 $\text{cm}^{-1}$	62 ± 3	39 ± 10	70 ± 2	65 ± 2	89 ± 4	76 ± 5
1105 $\text{cm}^{-1}$	59 ± 1	40 ± 7	66 ± 11	60 ± 9	88 ± 1	78 ± 1

## CONCLUSIONS

In conclusion, multimodal evaluation of the effect of PaLPMO9E on enzymatic saccharification of miscanthus indicates a synergistic and boosting effect of PaLPMO9E with cellulases on pretreated miscanthus. Experimental design setup at synchrotron allowed dynamic imaging of enzyme action working *in situ* under optimal conditions (temperature, hydrated substrate) and the corresponding changes in cell structure by real-time chemical monitoring. For the first time, the LPMO effect was found to depend on the tissue and the cell types in agreement with the heterogeneous structure and biological recalcitrance of cell walls.

This approach could be extended to other bioenergy crops showing stem tissue heterogeneity like maize or wheat and help gain a deeper understanding of the synergic action of enzymes in lignocellulose saccharification. In addition real-time monitoring of enzyme action on lignocelluloses using dedicated microscopic tools [28, 45, 46] should provide complementary information at mesoscopic and molecular scales to improve efficiency of pretreatments and enzyme cocktail.



**Figure 4. Real time monitoring of FTIR spectra of chlorite-treated miscanthus during enzymatic conversion.** (a) Experimental setup using the microfluidic device. (b) Vascular bundles cells and localisation of sclerenchyma (Sc) and parenchyma (Pa) (scale bar is 50  $\mu\text{m}$ ). Evolution of sclerenchyma FTIR spectra during hydrolysis (c) by Celluclast<sup>®</sup> alone or (d) with *PaLPMO9E*. Evolution of parenchyma FTIR spectra during hydrolysis (e) by Celluclast<sup>®</sup> alone or (f) with *PaLPMO9E*. Scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

## **METHODS**

### **Lignocellulosic samples**

Steam exploded miscanthus was provided by IFPEN (France). For synchrotron experiments, plant material was collected from the bottom stem region of *Miscanthus x giganteus* grown at INRA Estrées-Mons (France) and harvested at “dry” stage (February). Delignification pretreatment was performed on stem fragments (10 mm length × 3 mm thickness) using sodium chlorite-acetic acid as previously described [19]. Samples were washed several times with water then embedded in polyethylene glycol to get serial 40 µm and 16 µm thickness sections for fluorescence imaging and FTIR microspectrometry respectively. Before using miscanthus samples, PEG was removed from the sections by washing with water (3 × 5 min). Another set of samples was dried into air forced oven at 40°C and grinded prior to chemical analysis.

### **Chemical analysis**

Lignin content was quantified by spectroscopy using acetyl bromide. Polysaccharides composition was determined by quantifying sugar monomer released from sulfuric acid hydrolysis [19].

### **Saccharification assays**

Saccharification assays were carried out on several pretreated miscanthus samples. *PaLPMO9E* was produced and purified as previously described [31]. Supplementation assays were carried out in sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.8) in a final volume of 1 mL at 0.5% consistency (weight dry matter per volume). Enzymatic treatments were performed in 2-mL tubes incubated at 50°C and 850 rpm in a rotary shaker (Infors AG, Switzerland). *PaLPMO9E* was added to the substrate at a concentration of 4 mg/g of dry matter in presence of 1 mM ascorbic acid for 72 hours, followed by addition of 12 filter paper units of commercial cellulases from Celluclast<sup>®</sup> 1.5L (Sigma-Aldrich), per gram of dry matter. After hydrolysis, samples were boiled for 10 min to stop the enzymatic reaction. After centrifugation (16,000 g, 5 min, 4°C), glucose was quantified using the glucose RTU kit (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France), following the manufacturer's instructions. Assays were performed in triplicate. Oxidized cellobio-oligosaccharides were detected using ionic chromatography [27].

For microscopic visualisation of the dynamic changes at cell level, higher enzyme loadings (10 times more) were chosen to enable experiments within a reasonable timeframe of 2-3 hours. The reaction was performed in acetate buffer 50 mM pH 4.5 containing 1 mM ascorbate at 45°C using the cellulase cocktail Celluclast<sup>®</sup> 1.5L, alone or in combination with *Pa*LPMO9E.

### **Synchrotron fluorescence imaging**

Multispectral image acquisition was achieved after a 280 nm excitation obtained from the DISCO beamline bending magnet at the SOLEIL synchrotron (Gif sur Yvette, France) [47] using two filters: i) emission 327-353 nm to image enzyme (tryptophan autofluorescence) [44], ii) 420-480 nm to image cell walls (phenolic components fluorescence). These conditions were selected by comparing images obtained at different excitation/emission filters. Miscanthus sections (40 µm thickness) were mounted between 2 quartz cover slides (160 µm in thickness) using a spacer to provide a 25 µL sealed chamber containing 22 µL enzymes–buffer solution (Figure 3a). Reactions were performed at 45°C using a microscope-adapted temperature-controlled stage (Okolab, Italy). Time lapse images of the degradation were acquired sequentially at visible light and 275 nm and every 10 min during almost 2 hours for each experiment.

### **Synchrotron FTIR microspectrometry**

The data were acquired on the SMIS beamline in the SOLEIL synchrotron which exploits the edge and bending radiations from a bending magnet. The data were recorded on a Continuum XL microscope (ThermoScientifique, Courtaboeuf, France) equipped with a MCT-A detector. As for DISCO imaging, the incubation was performed at 45°C thanks to the use of a temperature-controlled microfluidic device. Miscanthus sections (16 µm thickness) were mounted in a home-made microfluidic device between two ZnS windows using a 25 µm thickness ETFE spacer (Goodfellow, Huntingdon, UK) to make a chamber of 12 µL volume (Figure 4a). Time lapse spectra were acquired every 5 min for 1 h then every 10 min for 1 h by selecting areas corresponding to different cell types. Spectra were recorded in transmission with 256 scans at 8 cm<sup>-1</sup> resolution with a 12 × 12 µm<sup>2</sup> aperture. A background spectrum was recorded in water at the beginning of the experiment. The infrared region 1200 - 900 cm<sup>-1</sup> was analysed with baseline correction to monitor the extent of cell wall degradation. Peak

intensities were measured at  $1060\text{ cm}^{-1}$  and at  $1107\text{ cm}^{-1}$  with a baseline between  $1300\text{ cm}^{-1}$  and  $950\text{ cm}^{-1}$ .

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in triplicates. Values in graphs and tables were presented as means with standard error of the means.

### **REFERENCES**

- [1] Arantes V., Saddler J.N., Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3, 4.
- [2] Zhang Y., et al., Color quantification of stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61 (13), 3186-3192.
- [3] Xue J., et al., Heterogeneity and glycan masking of cell wall microstructures in the stems of *Miscanthus x giganteus*, and its parents *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*. *Plos One*, 2013, 8 (11), e82114.
- [4] De Souza A.P., et al., How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66 (14), 4351-4365.
- [5] Meng X., Ragauskas A.J., Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27 (0), 150-158.
- [6] Himmel M.E., et al., Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315, 804-807.
- [7] Chundawat S.P.S., et al., Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4 (3), 973-984.
- [8] Inouye H., et al., Multiscale deconstruction of molecular architecture in corn stover. *Scientific Reports*, 2014, 4.
- [9] Singh S., et al., Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104 (1), 68-75.



- 
- [10] Siqueira G., et al., Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4, 7.
- [11] Belmokhtar N., et al., Changes in phenolics distribution after chemical pretreatment and enzymatic conversion of *Miscanthus x giganteus* internode. *Bioenergy Research*, 2013, 6 (2), 506-518.
- [12] Gierlinger N., et al., In situ FT-IR microscopic study on enzymatic treatment of poplar wood cross-sections. *Biomacromolecules*, 2008, 9 (8), 2194-2201.
- [13] Gierlinger N., Revealing changes in molecular composition of plant cell walls on the micron-level by Raman mapping and vertex component analysis (VCA). *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5, 306.
- [14] Goacher R.E., et al., Advancing lignocellulose bioconversion through direct assessment of enzyme action on insoluble substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27, 123-33.
- [15] Donohoe B.S., et al., Detecting cellulase penetration into corn stover cell walls by immuno-electron microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103 (3), 480-489.
- [16] Hansen M.A.T., et al., Enzyme affinity to cell types in wheat straw (*Triticum aestivum* L.) before and after hydrothermal pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 54.
- [17] Luterbacher J.S., et al., Modeling Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates using Fluorescent Confocal Microscopy II: Pretreated Biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112 (1), 32-42.
- [18] Donaldson L.A., et al., Detection of wood cell wall porosity using small carbohydrate molecules and confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 2015, 259 (3), 228-236.
- [19] Paës G., et al., Exploring accessibility of pretreated poplar cell walls by measuring dynamics of fluorescent probes. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 15.
- [20] Varnai A., et al., Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (19), 9096-9104.
- [21] Navarro D., et al., Fast solubilization of recalcitrant cellulosic biomass by the basidiomycete fungus *Laetisaria arvalis* involves successive secretion of oxidative and hydrolytic enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7, 143.

- 
- [22] Vaaje-Kolstad G., et al., An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 2010, 330 (6001), 219-222.
- [23] Quinlan R.J., et al., Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (37), 15079-15084.
- [24] Agger J.W., et al., Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111 (17), 6287-6292.
- [25] Johansen K.S., Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Biochemical Society Transactions*, 2016 44 (1), 143-149.
- [26] Levasseur A., et al., Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 41.
- [27] Fanuel M., et al., The *Podospora anserina* lytic polysaccharide monooxygenase PaLPMO9H catalyzes oxidative cleavage of diverse plant cell wall matrix glycans. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10, 63.
- [28] Eibinger M., et al., Cellulose surface degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase and its effect on cellulase hydrolytic efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289 (52), 35929-35938.
- [29] Rodriguez-Zuniga U.F., et al., Lignocellulose pretreatment technologies affect the level of enzymatic cellulose oxidation by LPMO. *Green Chemistry*, 2015, 17 (5), 2896-2903.
- [30] Villares A., et al., Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Scientific Reports*, 2017, 7, 40262.
- [31] Bennati-Granier C., et al., Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by *Podospora anserina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8 (1), 90.
- [32] Cadoux S., et al., Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *Global Change Biology Bioenergy*, 2014, 6 (4), 425-438.
- [33] Heaton E.A., et al., Managing a second-generation crop portfolio through sustainable intensification: Examples from the USA and the EU. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 2013, 7 (6), 702-714.
-

- 
- [34] Lewandowski I., et al., Progress on optimizing miscanthus biomass production for the European bioeconomy: Results of the EU FP7 project OPTIMISC. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7.
- [35] Galbe M., Zacchi G., Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 46, 70-78.
- [36] Biswas R., et al., Wet explosion: a universal and efficient pretreatment process for lignocellulosic biorefineries. *Bioenergy Research*, 2015, 1-16.
- [37] Rocha G.J.M., et al., Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products*, 2015, 74, 810-816.
- [38] Li J.B., et al., Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology*, 2007, 98, 3061-3068.
- [39] Auxenfans T., et al., Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10 (1), 36.
- [40] Wise L.E., et al., Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*, 1946, 122 (2), 11-19.
- [41] Kumar R., et al., Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2013, 130, 372-381.
- [42] Akin D.E., Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2008, 2 (4), 288-303.
- [43] Tawil G., et al., In situ tracking of enzymatic breakdown of starch granules by synchrotron UV fluorescence microscopy. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, 989–993.
- [44] Jamme F., et al., 3D imaging of enzymes working in situ. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (11), 5265-5270.
- [45] Farahi R.H., et al., Plasticity, elasticity, and adhesion energy of plant cell walls: nanometrology of lignin loss using atomic force microscopy. *Scientific Reports*, 2017, 7, 152.
- [46] Tetard L., et al., Nanometrology of delignified *Populus* using mode synthesizing atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2011, 22 (46), 465702.
-

- [47] Jamme F., et al., Synchrotron UV fluorescence microscopy uncovers new probes in cells and tissues. *Microscopy and Microanalysis*, 2010, 16 (5), 507-514.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

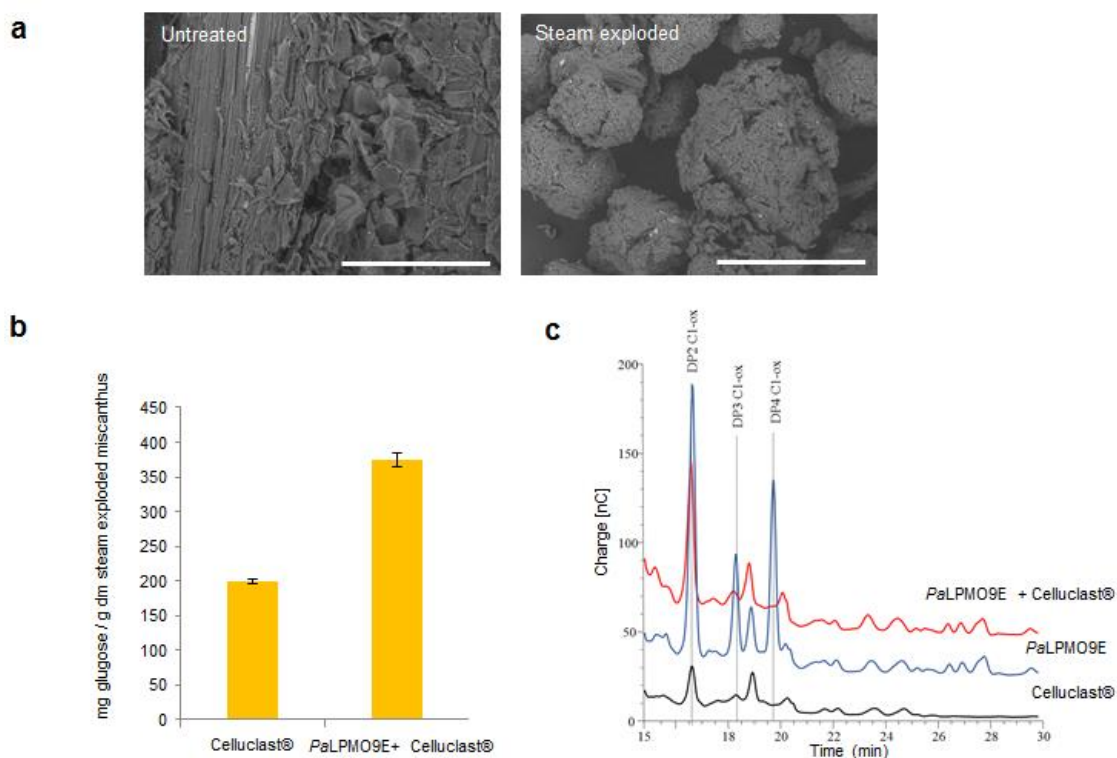
The authors acknowledge Dr M. Brancourt (INRA Estrées Mons, France) for providing miscanthus and IFPEN (France) for providing steam exploded miscanthus.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

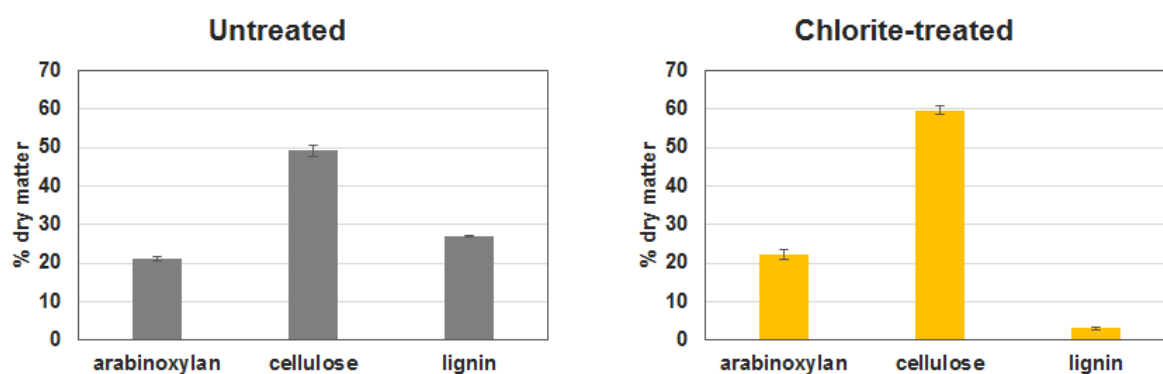
B.C. and G.P. conceived the project. A.H. and M.H. prepared miscanthus sections and performed chlorite treatment and chemical analysis. S. Garajova, S. Grisel, C. B.-G., I.G and J.-G. B provided *PaLPMO9E* and determined enzymatic conversion yields. Experimental setup at synchrotron was provided by F.J., C.D. and M.R. Experiments at synchrotron were performed by A.H., L.F., V.A.-B., M.H., B.C., G.P. and S. Garajova. B.C., G.P. and A.H. interpreted fluorescence imaging and FTIR spectra. BC, GP, A.H. V.A.-B and L.F. interpreted synchrotron data. The article was written by B.C and G.P with important contribution of J.-G.B. All authors read, reviewed, and approved the final article.

The authors declare no competing financial interests

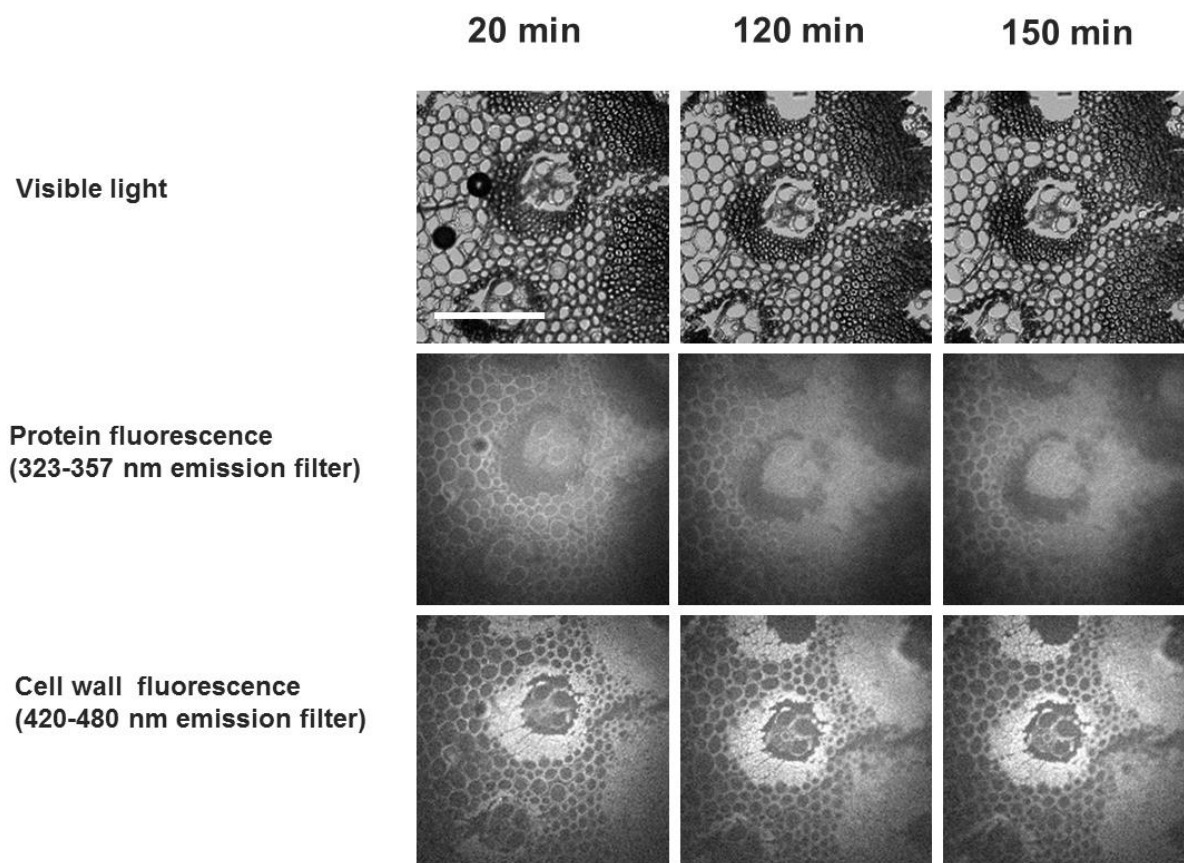
**SUPPLEMENTARY DATA**



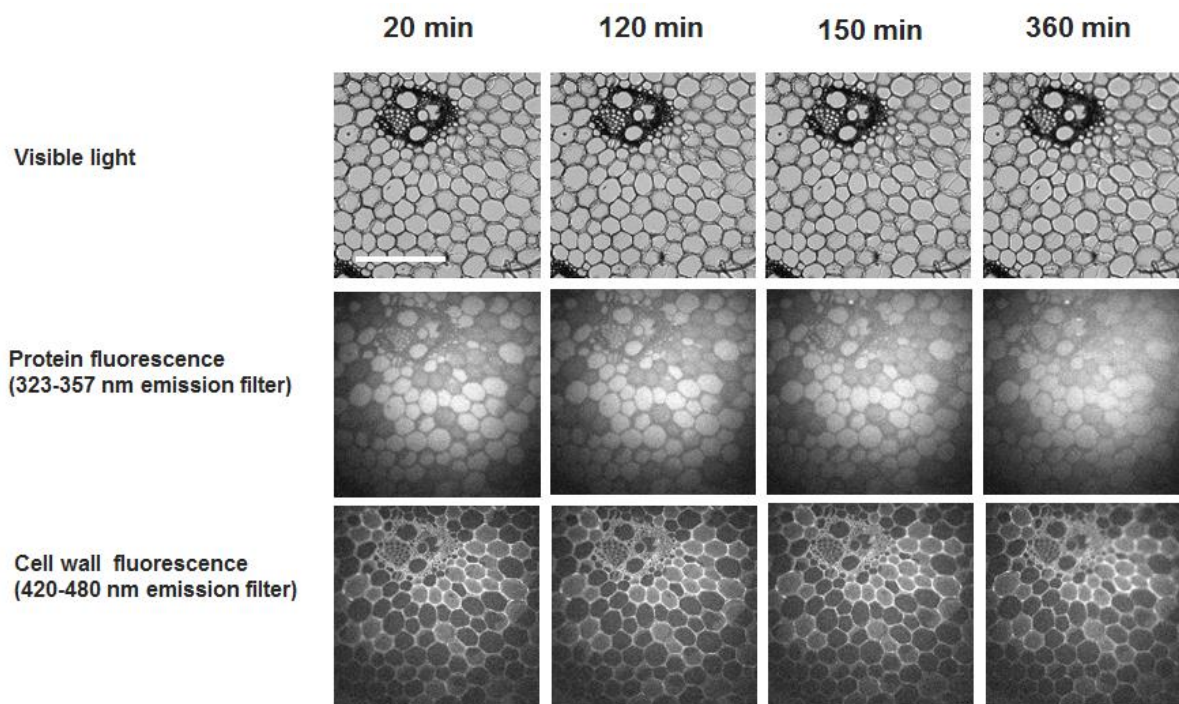
**Figure S1.** Effect of *PaLPMO9E* on enzymatic hydrolysis of steam exploded miscanthus. (a) SEM imaging shows destructure of steam exploded miscanthus (scale bar = 300  $\mu\text{m}$ ); (b) *PaLPMO9E* improved enzymatic degradation of miscanthus by Celluclast<sup>®</sup>; (c) *PaLPMO9E* oxidation of steam exploded miscanthus releases C<sub>1</sub>-oxidized sugars as dimer (DP2C1-ox), trimer (DP3C1-ox), and tetramer (DP4C1-ox).



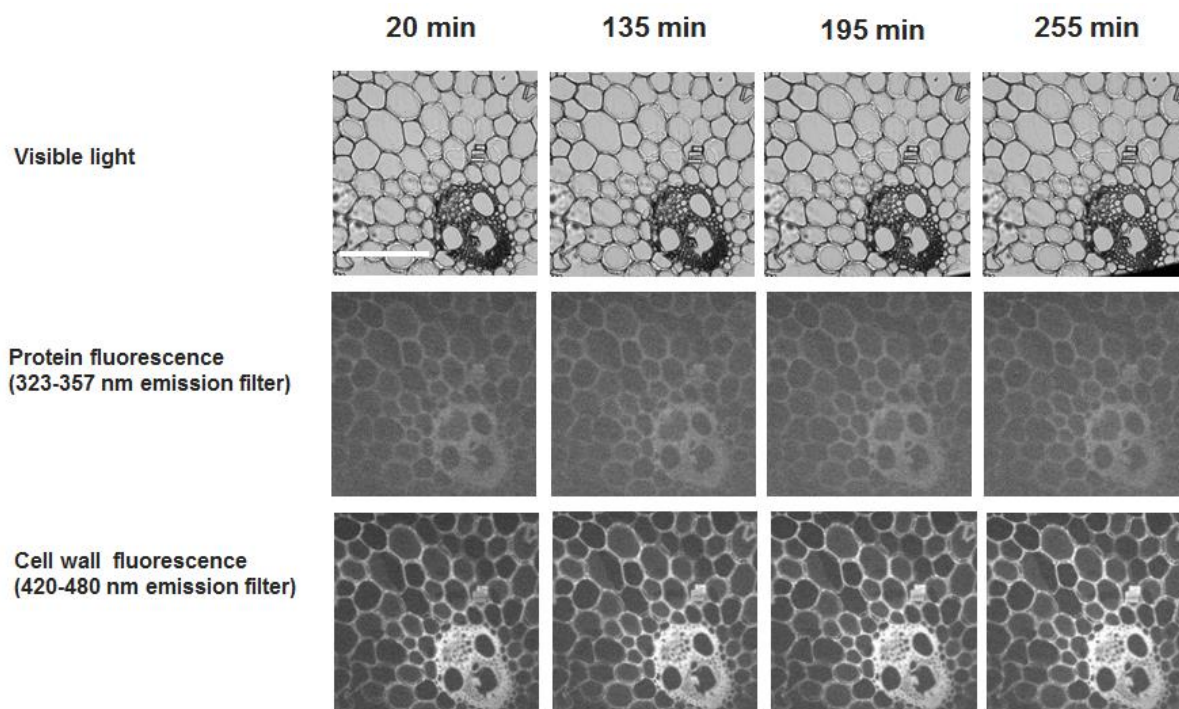
**Figure S2.** Chemical composition of untreated and chlorite-treated miscanthus. Lignin content is decreased by 5-fold, while relative content in arabinoxylan and cellulose increase.



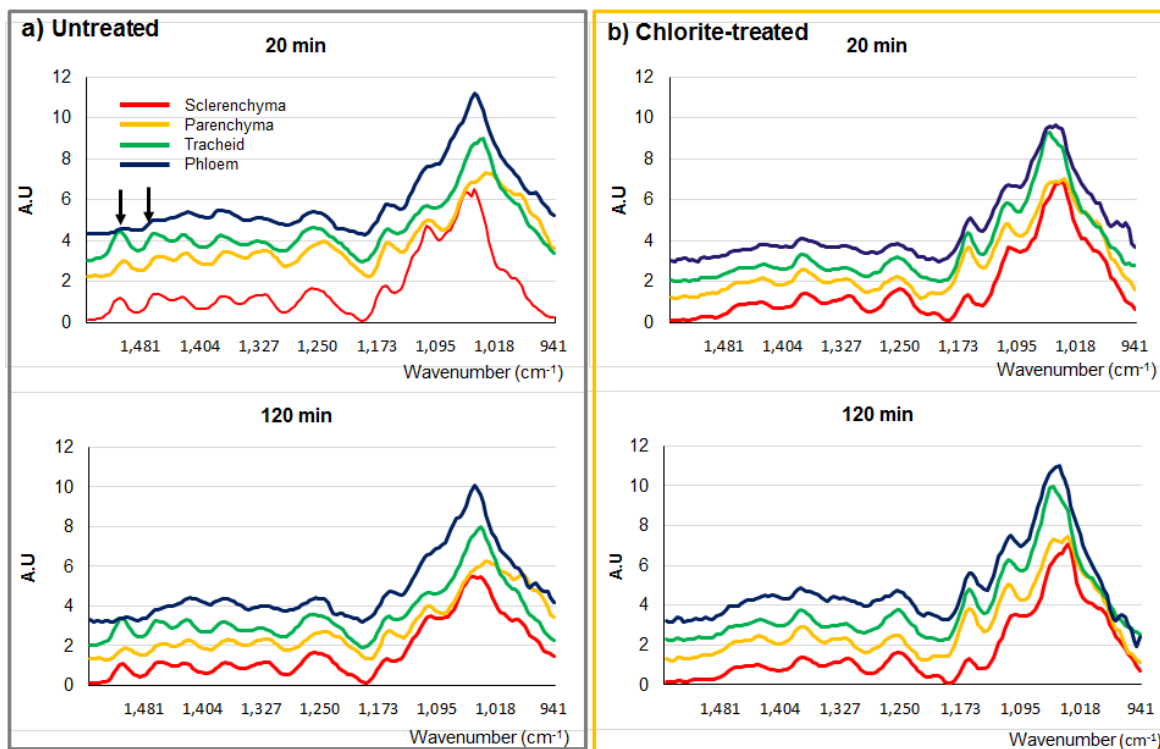
**Figure S3.** Time-lapse imaging of chlorite-treated miscanthus sample. Structure and fluorescence of region 1 are not modified over a time-period of more than 2 hours when incubated with *Pa*LPMO9E + Celluclast<sup>®</sup>. Scale bar = 200  $\mu$ m.



**Figure S4.** Time-lapse imaging of untreated miscanthus sample. Cell wall structure and fluorescence of region 2 are not modified over a time-period of more than 6 hours when incubated in the acetate buffer pH 4.5 at 45°C. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure S5.** Time-lapse imaging of chlorite-treated miscanthus sample. Cell wall structure and fluorescence of region 2 are not modified over a time-period of more than 4 hours when incubated in the acetate buffer pH 4.5 at 45°C. Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure S6.** FTIR spectra of vascular bundle cells of untreated (a) and chlorite-treated (b) miscanthus after 20 min and 120 min incubation in buffer. Arrows indicate lignin band ( $1506\text{ cm}^{-1}$  and  $1460\text{ cm}^{-1}$ )





**DISCUSSION GÉNÉRALE  
ET PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont montré la relation existant entre l'activité et la mobilité des enzymes lignocellulolytiques, et la dépendance de ces deux paramètres vis-à-vis de la composition chimique et de la structure globale de la paroi, mais aussi des polymères pariétaux de manière plus spécifique.

## **1 Les facteurs de la récalcitrance enzymatique**

La récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique a été étudiée sur des échantillons contrastés aussi bien du point de vue de leur origine botanique que de celui des prétraitements auxquels ils ont été soumis. Les conclusions établies quant à l'importance des facteurs de la biomasse dans sa susceptibilité à l'hydrolyse peuvent donc être considérées comme génériques.

L'impact négatif majeur de la lignine a été démontré par les corrélations calculées avec le rendement de saccharification des échantillons. Il a également pu être visualisé directement par la meilleure résistance à l'hydrolyse du sclérenchyme et des vaisseaux chez le miscanthus soumis à l'action synergique de cellulases et de la LPMO, alors qu'une dégradation du parenchyme contenant moins de lignine a pu être observée au cours du temps. La teneur en lignine est importante dans la récalcitrance, mais des coefficients de corrélations plus élevés démontrent que c'est principalement la structure de la lignine qui impacte l'hydrolyse enzymatique. La récalcitrance dépend donc de la quantité de lignine présente autour des microfibrilles, mais surtout de la manière dont elle s'organise autour de la cellulose pour la recouvrir et ainsi bloquer l'accès des enzymes.

Cette importance de la composition chimique et de la structure de la lignine dans la récalcitrance est notamment mise en lumière par le fait que le rendement de saccharification soit corrélé négativement avec l'intensité de fluorescence des parois, mais positivement avec le temps de vie de fluorescence de la lignine. Il est généralement considéré que le temps de vie de fluorescence est plus important pour des structures condensées. Cette observation, conjuguée à la corrélation négative déterminée entre le rendement et la proportion de liaisons  $\beta$ -O-4' souligne l'importance de la dépolymérisation de la lignine soluble au cours du prétraitement pour améliorer l'efficacité de l'hydrolyse. Les coefficients de corrélation quasiment identiques de l'impact de la teneur en lignine et des liaisons  $\beta$ -O-4' suggèrent également que la dépolymérisation de la lignine au cours des prétraitements s'effectue principalement au niveau des régions labiles, et peu, voire pas du tout, au niveau des régions condensées.

La porosité de la biomasse est également un facteur crucial dans le phénomène de récalcitrance. Les meilleures corrélations ne sont pas obtenues pour les mêmes seuils de porosité en fonction des biomasses, ce qui reflète les différences d'organisation des parois de ces biomasses. Cela est également souligné par le fait que la porosité ne soit pas corrélée avec la saccharification lorsque l'analyse est effectuée sur tous les échantillons. L'importance de la porosité est très probablement reliée au rôle négatif joué par la lignine, puisque cette dernière est connue pour jouer un rôle de remplissage de l'espace entre les microfibrilles.

La teneur en hémicelluloses n'a montré aucune relation avec le rendement d'hydrolyse final alors que ce polymère est considéré comme participant à la récalcitrance en formant une barrière physique autour des fibrilles de cellulose. Cela signifie probablement que la proportion d'hémicelluloses n'est pas le facteur le plus important à considérer, et que sa composition est un élément beaucoup plus déterminant.

Une étude des corrélations entre la teneur des différents monosaccharides constitutifs des hémicelluloses et le rendement d'hydrolyse pourrait être envisagée afin de comprendre si certains motifs structuraux au sein de ce polysaccharide participent à la baisse d'activité des enzymes. Une étude plus approfondie de la relation entre la composition et la structure de la lignine pourrait également permettre de comprendre l'impact plus important des unités G par rapport aux unités S sur le rendement d'hydrolyse.

## **2 Dynamique des enzymes dans les parois végétales**

L'étude de la mobilité des sondes fluorescentes au sein des parois a montré une dépendance beaucoup plus importante vis-à-vis de la structure que de la composition chimique des échantillons. Une faible évolution de la mobilité est observée au cours de l'hydrolyse malgré une modification de la composition chimique des parois se traduisant par une diminution de la teneur en polysaccharides et un enrichissement relatif en lignine. Cela montre que la structure des parois est suffisamment robuste pour résister à la dégradation importante des polysaccharides, mais aussi que l'activité catalytique des enzymes ne permet pas d'améliorer de manière importante leur diffusion.

La mobilité des sondes dépend majoritairement de la taille de ces dernières et de l'effet des prétraitements. Le principal facteur impactant la diffusion est donc la porosité des parois, qui est modifiée de manière plus importante au cours du prétraitement que pendant l'hydrolyse enzymatique.

Toutefois, une augmentation de la porosité n'induit pas nécessairement une amélioration de la mobilité. La lignine s'oppose en effet à la diffusion des sondes, et des enzymes plus généralement, par l'établissement de liaisons non-spécifiques. Les mesures effectuées pour quantifier ces interactions ont montré une augmentation de la liaison des sondes sur la lignine après prétraitement. Toutefois, ces interactions diminuent lorsque la taille des sondes augmente, de manière similaire à ce qui avait été observé lors des mesures de mobilité. Ces résultats peuvent être expliqués par une meilleure accessibilité à la lignine après prétraitement. Il est également possible que la dégradation de la cellulose et des hémicelluloses entraîne une modification de la conformation spatiale de la lignine suite à la levée de l'encombrement stérique induit par les polysaccharides qui influence le développement et la structure du polymère aromatique. Cette modification de conformation pourrait s'accompagner d'un changement d'affinité de la lignine vis-à-vis des sondes, et donc des enzymes. L'influence de la taille des sondes souligne une fois de plus l'interdépendance de la porosité et des interactions avec la lignine pour expliquer la dynamique des sondes et des enzymes au sein des parois.

Les interactions avec la lignine expliquent pourquoi la fraction mobile de chacune des sondes présente des corrélations plus importantes avec la proportion de pores dont le diamètre est au moins 5 fois supérieur à celui des sondes. L'interaction des enzymes avec la lignine pourrait être responsable d'un encombrement stérique empêchant la diffusion d'autres enzymes dans des pores de taille insuffisante, diminuant ainsi l'efficacité globale de l'hydrolyse. Il est donc nécessaire que la porosité des parois soit bien supérieure au diamètre des enzymes pour que ces dernières puissent diffuser efficacement, même lorsqu'elles « tapissent » la surface interne des parois. Le diamètre des pores est donc un critère essentiel à considérer pour choisir des enzymes dont la taille leur permettra de diffuser efficacement au sein de la matrice pariétale.

L'effet des interactions avec la lignine sur la mobilité des sondes pourrait être pris en compte lors des mesures de recouvrement de fluorescence avec l'application d'équations d'ajustement plus sophistiquées. Ces équations nécessitent de connaître la nature et la distribution des sites de fixation au sein des parois. Le développement de différents modèles faisant varier ces paramètres pourrait donc permettre de mieux comprendre la fixation à la lignine en fonction des degrés d'ajustement des équations avec nos courbes théoriques. L'analyse de la mobilité des sondes dans les échantillons prétraités au chlorite de sodium peut également être effectuée avec un modèle d'ajustement simplifié, ne prenant pas en compte les

interactions avec la lignine résiduelle. Les résultats obtenus avec ces modèles sur des échantillons de blé et de peuplier, non présentés dans ce manuscrit, ont montré une diminution de la fraction mobile des sondes de plus grande taille, qui diffusent beaucoup plus rapidement que dans les autres échantillons malgré une porosité similaire. L'utilisation de dextrans fluorescents pourrait également permettre de valider l'influence de la lignine sur la diffusion des enzymes, puisque ces sondes de taille modulable sont considérées comme n'interagissant pas avec les différents composés pariétaux.

### **3 Prédiction de la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique**

De manière intéressante, nos résultats ont montré l'existence de corrélations entre le rendement d'hydrolyse des échantillons et leur fluorescence intrinsèque. Les propriétés de temps de vie, mais surtout d'intensité de fluorescence, plus facile et rapide à mesurer, pourraient donc être utilisées comme indicateur de la susceptibilité de la biomasse à la dégradation enzymatique. La fluorescence est majoritairement émise par la lignine dans les tissus matures. Il est donc possible que ces corrélations reflètent l'influence spécifique de la lignine sur la récalcitrance. La fluorescence pourrait provenir, par exemple, de l'agencement particulier de certaines unités formant des motifs de liaisons préférentielles des cellulases.

Une meilleure compréhension des mécanismes régissant la fluorescence pourrait permettre de mieux appréhender la façon dont la lignine impacte la récalcitrance à l'hydrolyse. La fluorescence dépend de nombreux paramètres, tels que la teneur et la structure des fluorophores, mais aussi leur environnement et les interactions avec les autres composés pariétaux. La complexité résultant de ces différents facteurs pourrait être simplifiée par l'utilisation de lignines modèles synthétisées chimiquement, avec des structures et des compositions modulables. L'utilisation de biomasses comme le peuplier, qui présente une variabilité génétique importante avec de nombreux hybrides présentant des structures pariétales relativement contrastées, pourrait permettre d'analyser la fluorescence émise par des lignines de structures différentes au sein d'environnement similaires.

Les résultats de nos recherches, présentés dans ce manuscrit, montrent que la structure des parois est aussi importante que leur composition chimique pour expliquer la récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. L'utilisation de techniques de spectroscopie comme la RMN ou la reconstruction du volume pariétal par tomographie au rayon X ou par microscopie confocale, pourrait permettre de mieux comprendre l'évolution des structures

induites par les prétraitements au niveau des polymères ou au niveau de la paroi. L'étude de l'impact de la composition chimique et de l'agencement des polymères à l'échelle des différentes parois sur l'hydrolyse enzymatique, et plus précisément l'influence de la conformation de la lignine, pourrait être étudiée plus en détail grâce au développement des techniques de microspectrométrie de fluorescence, infrarouge ou Raman. Elle pourrait permettre d'observer l'influence de la composition chimique et de l'agencement des polymères à l'échelle des différentes parois sur l'hydrolyse enzymatique. Le développement de méthodes de microscopie, et notamment de microscopie confocale, semble prometteur pour assurer un suivi cinétique en temps réel de la déconstruction des parois et de la dynamique des enzymes. Une thèse, débutée au laboratoire en 2016 et basée en partie sur les résultats de nos recherches, vise à reconstituer en 3D l'évolution des structures des parois de coupes de biomasses au cours de la saccharification. L'ensemble des données ainsi recueillies permettra, à terme, d'améliorer l'efficacité des prétraitements, mais aussi de fournir des pistes dans les domaines de l'ingénierie génétique pour concevoir des parois plus faciles à déconstruire, ou pour produire des enzymes plus efficaces ou qui diffusent plus librement dans la matrice pariétale. Les résultats de mobilité de sondes dans les parois de blé et de miscanthus, non présentés dans ce manuscrit mais qui feront l'objet d'une prochaine publication, montre en effet des corrélations différentes de celle observées pour le peuplier entre la taille des pores et la mobilité des sondes, suggérant une nécessité de moduler la taille des enzymes en fonction de la biomasse considérée pour outrepasser le plus efficacement possible la récalcitrance des parois à l'hydrolyse enzymatique.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 
- [1] Carmody R.N., *et al.*, *Energetic consequences of thermal and nonthermal food processing*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, *108* (48), 19199-19203.
- [2] Wiessner P.W., *Embers of society: firelight talk among the Ju/'hoansi Bushmen*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, *111* (39), 14027-14035.
- [3] Bithas K.; Kalimeris P., *A brief history of energy use in human societies*. In *Revisiting the energy-development link: evidence from the 20th century for knowledge-based and developing economies*, Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 5-10.
- [4] Goldemberg J., *Energy: what everyone needs to know*. Oxford University Press: 2012; p 192.
- [5] Smil V., *World history and energy*. In *Encyclopedia of energy*, Cleveland C.J.; Ayres R.U., Eds. Elsevier Academic Press: 2004; Vol. 6, pp 549-561.
- [6] *Key world energy statistics*; International Energy Agency: 2016.
- [7] Naik S.N., *et al.*, *Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, *14* (2), 578-597.
- [8] Lackner K.S., *Can fossil farbon fuel the 21st century?* International Geology Review, 2002, *44* (12), 1122-1133.
- [9] GIEC, *Changement climatique 2014 : rapport de synthèse*. 2014.
- [10] Bichat H.; Mathis P., *La biomasse, énergie d'avenir?* Editions Quæ, 2013.
- [11] Diesel R., *The diesel oil engine*. Journal of the American Society for Naval Engineers, 1912, *24* (1), 653-692.
- [12] Dias De Oliveira M.E., *et al.*, *Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint*. BioScience, 2005, *55* (7), 593-602.
- [13] Mohr A.; Raman S., *Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels*. Energy Policy, 2013, *63*, 114-122.
- [14] Yuan J.S., *et al.*, *Plants to power: bioenergy to fuel the future*. Trends in Plant Science, 2008, *13* (8), 421-429.
- [15] Azadi P., *et al.*, *Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: a critical review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2013, *21*, 506-523.
- [16] Shafiei M., *et al.*, *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass*. In *Lignocellulose-Based Bioproducts*, Karimi K., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 85-154.



- 
- [17] Beck C.B., *An Introduction to Plant Structure and Development: Plant Anatomy for the Twenty-First Century*. 2 ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2010.
- [18] Chundawat S.P., *et al.*, *Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals*. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2, 121-45.
- [19] Brandt A., *et al.*, *Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids*. *Green Chemistry*, 2013, 15 (3), 550-583.
- [20] Karp A.; Halford N.G., *Chapter 1 - Energy crops: introduction*. In *Energy Crops*, The Royal Society of Chemistry: 2010; pp 1-12.
- [21] Zegada-Lizarazu W., *et al.*, *Dedicated crops for advanced biofuels: consistent and diverging agronomic points of view between the USA and the EU-27*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2013, 7 (6), 715-731.
- [22] Heaton E., *et al.*, *A quantitative review comparing the yields of two candidate C4 perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water*. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 27 (1), 21-30.
- [23] Wilson P., *et al.*, *Prospects for dedicated energy crop production and attitudes towards agricultural straw use: the case of livestock farmers*. *Energy Policy*, 2014, 74, 101-110.
- [24] Blanco-Canqui H., *Growing dedicated energy crops on marginal lands and ecosystem services*. *Soil Science Society of America Journal*, 2016, 80 (4), 845-858.
- [25] Brown J.C., *et al.*, *Chapter 15 Developing miscanthus for bioenergy*. In *Energy Crops*, The Royal Society of Chemistry: 2010; pp 301-321.
- [26] Lewandowski I., *et al.*, *The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe*. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 25 (4), 335-361.
- [27] Lee W.C.; Kuan W.C., *Miscanthus as cellulosic biomass for bioethanol production*. *Biotechnology Journal*, 2015, 10 (6), 840-54.
- [28] Lesur-Dumoulin C., *et al.*, *Analysis of young Miscanthus × giganteus yield variability: a survey of farmers' fields in east central France*. *Global Change Biology Bioenergy*, 2016, 8 (1), 122-135.
- [29] Pouzet D., *Production durable de biomasse : la lignocellulose des Poacées*. Quae ed.; 2011; p 224.

- 
- [30] Cadoux S., *et al.*, *Nutrient requirements of Miscanthus x giganteus: conclusions from a review of published studies*. Biomass and Bioenergy, 2012, 38, 14-22.
- [31] Amougou N., *et al.*, *Miscanthus x giganteus leaf senescence, decomposition and C and N inputs to soil*. Global Change Biology Bioenergy, 2012, 4 (6), 698-707.
- [32] Gezan S.A.; Riche A.B., *Over-winter yield decline in Switchgrass and Miscanthus*. Aspects of Applied Biology, 2008, 90, 219-224.
- [33] Dohleman F.G.; Long S.P., *More productive than maize in the Midwest: how does miscanthus do it?* Plant Physiology, 2009, 150 (4), 2104-2115.
- [34] McCalmont J.P., *et al.*, *Environmental costs and benefits of growing Miscanthus for bioenergy in the UK*. Global Change Biology Bioenergy, 2017, 9 (3), 489-507.
- [35] Xue S., *et al.*, *Present and future options for Miscanthus propagation and establishment*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2015, 49, 1233-1246.
- [36] Dickmann D.I., *Silviculture and biology of short-rotation woody crops in temperate regions: then and now*. Biomass and Bioenergy, 2006, 30 (8), 696-705.
- [37] Dillen S.Y., *et al.*, *Chapter 14 Poplar*. In *Energy Crops*, The Royal Society of Chemistry: 2010; pp 275-300.
- [38] Fischer M., *et al.*, *A critical analysis of species selection and high vs. low-input silviculture on establishment success and early productivity of model short-rotation wood-energy cropping systems*. Biomass and Bioenergy, 2017, 98, 214-227.
- [39] Karp A.; Shield I., *Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge*. New Phytologist, 2008, 179 (1), 15-32.
- [40] Sannigrahi P., *et al.*, *Poplar as a feedstock for biofuels: a review of compositional characteristics*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2010, 4 (2), 209-226.
- [41] *Synthesis of countries progress report*; FAO, Rome: September 2016, 2016.
- [42] Verlinden M.S., *et al.*, *First vs. second rotation of a poplar short rotation coppice: above-ground biomass productivity and shoot dynamics*. Biomass and Bioenergy, 2015, 73, 174-185.
- [43] Kauter D., *et al.*, *Quantity and quality of harvestable biomass from Populus short rotation coppice for solid fuel use—a review of the physiological basis and management influences*. Biomass and Bioenergy, 2003, 24 (6), 411-427.
- [44] Fillatti J.J., *et al.*, *Agrobacterium mediated transformation and regeneration of Populus*. Molecular and General Genetics, 1987, 206 (2), 192-199.
-

- 
- [45] Tuskan G.A., *et al.*, *The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa*. *Science*, 2006, 313 (5793), 1596-1604.
- [46] Gregg J.S.; Smith S.J., *Global and regional potential for bioenergy from agricultural and forestry residue biomass*. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2010, 15 (3), 241-262.
- [47] Bentsen N.S., *et al.*, *Agricultural residue production and potentials for energy and materials services*. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2014, 40, 59-73.
- [48] Ghosh S., *et al.*, *Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: a review of the efficiency and economics of biochemical pretreatment processes*. *Applied Energy*, 2017, 198, 284-298.
- [49] Blanco-Canqui H.; Lal R., *Crop residue removal impacts on soil productivity and environmental quality*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2009, 28 (3), 139-163.
- [50] López-Bellido L., *et al.*, *Energy crops: prospects in the context of sustainable agriculture*. *European Journal of Agronomy*, 2014, 60, 1-12.
- [51] Gustafson P., *et al.*, *Wheat evolution, domestication, and improvement*. In *Wheat Science and Trade*, Wiley-Blackwell: 2009; pp 3-30.
- [52] Lev-Yadun S., *et al.*, *The cradle of Agriculture*. *Science*, 2000, 288 (5471), 1602-1603.
- [53] Boudreau A.; Ménard G., *Le Blé: éléments fondamentaux et transformation*. Presses de l'Université Laval: 1992.
- [54] Shewry P.R., *et al.*, *Chapter 2 Challenges and opportunities for using wheat for biofuel production*. In *Energy Crops*, The Royal Society of Chemistry: 2010; pp 13-26.
- [55] FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (June 30, 2017),
- [56] Talebnia F., *et al.*, *Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (13), 4744-4753.
- [57] Kirby E.J.M., *Botany of the wheat plant*. In *FAO, Rome, FAO, Rome: Bread wheat, improvement and production*, 2002.
- [58] Tye Y.Y., *et al.*, *The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 60, 155-172.
-

- 
- [59] Padgitt M., *et al.* *Production practices for major crops in U.S. Agriculture, 1990-97*; United States Department of Agriculture: September 2000, 2000; p 110.
- [60] Kim S.; Dale B.E., *Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues*. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 26 (4), 361-375.
- [61] Hooke R., *Micrographia*. Martyn, J. and Allestry, J.: London, 1754.
- [62] Zhong R.; Ye Z.-H., *Regulation of cell wall biosynthesis*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10 (6), 564-572.
- [63] Keegstra K., *Plant cell walls*. *Plant Physiology*, 2010, 154 (2), 483-486.
- [64] Bacic A., *et al.*, *Structure and function of plant cell walls*. In *The Biochemistry of Plants*, Academic Press: San Diego, 1988; Vol. 14, pp 297-371.
- [65] Carpita N.C.; Gibeaut D.M., *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. *The Plant Journal*, 1993, 3 (1), 1-30.
- [66] Brett C.; Waldron K., *The role of the cell wall in the life of the plant*. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, Springer Netherlands: Dordrecht, 1990; pp 1-3.
- [67] Brongniart A., *et al.*, *Rapport sur un mémoire de M. Payen, relatif à la composition de la matière ligneuse*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 1839, 8, 51 - 53.
- [68] Horn S.J., *et al.*, *Novel enzymes for the degradation of cellulose*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5 (1), 45.
- [69] Zhao X., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6 (4), 465-482.
- [70] O'Sullivan A.C., *Cellulose: the structure slowly unravels*. *Cellulose*, 1997, 4 (3), 173-207.
- [71] Endler A.; Persson S., *Cellulose synthases and synthesis in Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2011, 4 (2), 199-211.
- [72] Eichhorn S.J., *et al.*, *Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites*. *Journal of Materials Science*, 2009, 45 (1), 1.
- [73] Schulze E., *Zur kenntniss der chemischen zusammensetzung der pflanzlichen zellmembranen*. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1891, 24 (2), 2277-2287.
-

- 
- [74] Scheller H.V.; Ulvskov P., *Hemicelluloses*. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61 (1), 263-289.
- [75] Brodeur G., *et al.*, *Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review*. Enzyme Research, 2011, 2011, 787532.
- [76] Juodeikiene G., *et al.*, *The use of  $\beta$ -xylanase for increasing the efficiency of biocatalytic conversion of crop residues to bioethanol*. Catalysis Today, 2011, 167 (1), 113-121.
- [77] Dodd D.; Cann I.K.O., *Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production*. Global Change Biology Bioenergy, 2009, 1 (1), 2-17.
- [78] de Candolle A.P., *Théorie élémentaire de la botanique ou exposition des principes de la classification naturelle et de l'art de décrire et d'étudier les végétaux*. Paris, Déterville, 1813, 548.
- [79] Boerjan W., *et al.*, *Lignin biosynthesis*. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54 (1), 519-546.
- [80] Vanholme R., *et al.*, *Lignin biosynthesis and structure*. Plant Physiology, 2010, 153 (3), 895-905.
- [81] Sibout R.; Höfte H., *Plant cell biology: The ABC of monolignol transport*. Current Biology, 2012, 22 (13), R533-R535.
- [82] Ralph J., *Hydroxycinnamates in lignification*. Phytochemistry Reviews, 2010, 9 (1), 65-83.
- [83] Calvo-Flores F.G., *et al.*, *Biosynthesis of lignin*. In *Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials*, John Wiley & Sons, Ltd: 2015; pp 75-112.
- [84] Ralph J., *et al.*, *Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids*. Phytochemistry Reviews, 2004, 3 (1), 29-60.
- [85] Liu C.-J., *Deciphering the enigma of lignification: precursor transport, oxidation, and the topochemistry of lignin assembly*. Molecular Plant, 2012, 5 (2), 304-317.
- [86] Wang Y., *et al.*, *Plant cell wall lignification and monolignol metabolism*. Frontiers in Plant Science, 2013, 4, 220.
- [87] Hatfield R.D., *et al.*, *Grass cell walls: a story of cross-linking*. Frontiers in Plant Science, 2016, 7, 2056.
- [88] Donaldson L.A., *Mechanical constraints on lignin deposition during lignification*. Wood Science and Technology, 1994, 28 (2), 111-118.
-

- 
- [89] Panda H., *The complete book on gums and stabilizers for food industry*. Asia Pacific Business Press Inc.: 2010.
- [90] Atmodjo M.A., *et al.*, *Evolving views of pectin biosynthesis*. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64 (1), 747-779.
- [91] Harholt J., *et al.*, *Biosynthesis of pectin*. Plant Physiology, 2010, 153 (2), 384-395.
- [92] Yokoyama R., *et al.*, *The biosynthesis and function of polysaccharide components of the plant cell wall*. In *Plant Cell Wall Patterning and Cell Shape*, John Wiley & Sons, Inc: 2014; pp 1-34.
- [93] Albenne C., *et al.*, *Plant cell wall proteins: a large body of data, but what about runaways?* Proteomes, 2014, 2 (2), 224.
- [94] Rose J.K.C.; Lee S.-J., *Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome*. Plant Physiology, 2010, 153 (2), 433-436.
- [95] San Clemente H.; Jamet E., *WallProtDB, a database resource for plant cell wall proteomics*. Plant Methods, 2015, 11, 2.
- [96] Jamet E., *et al.*, *Recent advances in plant cell wall proteomics*. PROTEOMICS, 2008, 8 (4), 893-908.
- [97] Mewalal R., *et al.*, *Cell wall-related proteins of unknown function: missing links in plant cell wall development*. Plant and Cell Physiology, 2014, 55 (6), 1031-1043.
- [98] Keegstra K., *et al.*, *The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured Sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components*. Plant Physiology, 1973, 51 (1), 188-197.
- [99] Brett C.; Waldron K., *Cell wall structure and the skeletal functions of the wall*. In *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, Springer Netherlands: Dordrecht, 1990; pp 4-57.
- [100] Schwarze F.W.M.R., *et al.*, *Fundamental aspects*. In *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2000; pp 5-31.
- [101] Sticklen M.B., *Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol*. Nature Reviews Genetics, 2008, 9 (6), 433-443.
- [102] Cosgrove D.J., *Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly*. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 22, 122-131.

- 
- [103] Zhang T., *et al.*, *Visualization of the nanoscale pattern of recently-deposited cellulose microfibrils and matrix materials in never-dried primary walls of the onion epidermis*. Cellulose, 2014, 21 (2), 853-862.
- [104] Dick-Perez M., *et al.*, *Multidimensional solid-state NMR studies of the structure and dynamics of pectic polysaccharides in uniformly <sup>13</sup>C-labeled Arabidopsis primary cell walls*. Magnetic Resonance in Chemistry, 2012, 50 (8), 539-550.
- [105] Wang T., *et al.*, *Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110 (41), 16444-16449.
- [106] Park Y.B.; Cosgrove D.J., *Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall*. Plant and Cell Physiology, 2015, 56 (2), 180-194.
- [107] Kumar M., *et al.*, *Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation*. Journal of experimental botany, 2016, 67 (2), 515-531.
- [108] Pauly M.; Keegstra K., *Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels*. The Plant Journal, 2008, 54 (4), 559-568.
- [109] Zhong R.; Ye Z.-H., *Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation*. Plant and Cell Physiology, 2015, 56 (2), 195-214.
- [110] Minster J., *Features of first generation biofuels*. In *Lignocellulosic Biorefineries*, Press C., Ed. EPFL Press: 2013; p 521.
- [111] Schenk P.M., *et al.*, *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*. BioEnergy Research, 2008, 1 (1), 20-43.
- [112] Voloshin R.A., *et al.*, *Review: biofuel production from plant and algal biomass*. International Journal of Hydrogen Energy, 2016, 41 (39), 17257-17273.
- [113] Dragone G., *et al.*, *Third generation biofuels from microalgae*. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 2010, 2, 1355-1366
- [114] Aro E.-M., *From first generation biofuels to advanced solar biofuels*. Ambio, 2016, 45 (Suppl 1), 24-31.
- [115] Menon V.; Rao M., *Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept*. Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38 (4), 522-550.

- [116] Cantarel B.L., *et al.*, *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (Database issue), D233-D238.
- [117] Sharma A., *et al.*, *Biomass pyrolysis—A review of modelling, process parameters and catalytic studies*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 50, 1081-1096.
- [118] Chen H.; Wang L., *Chapter 1 - Introduction*. In *Technologies for Biochemical Conversion of Biomass*, Academic Press: Oxford, 2017; pp 1-10.
- [119] Cragg S.M., *et al.*, *Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 29, 108-119.
- [120] Artzi L., *et al.*, *Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides*. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15 (2), 83-95.
- [121] Carbohydrate-Active enZymes Database. <http://www.cazy.org/Welcome-to-the-Carbohydrate-Active.html> (01/08/2017),
- [122] Henrissat B., *et al.*, *Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis*. *Gene*, 1989, 81 (1), 83-95.
- [123] Shallom D.; Shoham Y., *Microbial hemicellulases*. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6 (3), 219-228.
- [124] Hu J., *et al.*, *The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?* *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4, 36-36.
- [125] Himmel M.E., *et al.*, *Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production*. *Science*, 2007, 315 (5813), 804-807.
- [126] Várnai A., *et al.*, *Carbohydrate-binding modules of fungal cellulases*. *Advances in Applied Microbiology*, 2014, 88, 103-165.
- [127] Kubicek C.P.; Kubicek E.M., *Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 35, 51-57.
- [128] Sheehan J.; Himmel M., *Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol*. *Biotechnology Progress*, 1999, 15 (5), 817-827.
- [129] Reese E.T., *History of the cellulase program at the U.S. army Natick Development Center*. 1975.
- [130] Schuster A.; Schmoll M., *Biology and biotechnology of Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87 (3), 787-799.



- 
- [131] Bischof R.H., *et al.*, *Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer Trichoderma reesei*. Microbial Cell Factories, 2016, 15 (1), 106.
- [132] Wilson D.B., *Cellulases and biofuels*. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20 (3), 295-299.
- [133] Spezio M., *et al.*, *Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase*. Biochemistry, 1993, 32 (38), 9906-9916.
- [134] Kuhad R.C., *et al.*, *Microbial cellulases and their industrial applications*. Enzyme Research, 2011, 2011, 10.
- [135] Brethauer S.; Studer M.H., *Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - A review*. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2015, 69 (10), 572-581.
- [136] Liu H., *et al.*, *Toward a fundamental understanding of cellulase-lignin interactions in the whole slurry enzymatic saccharification process*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2016, 10 (5), 648-663.
- [137] Lynd L.R., *et al.*, *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66 (3), 506-577.
- [138] Horn S.J., *et al.*, *Measuring processivity*. Methods in Enzymology, 2012, 510, 69-95.
- [139] Rosgaard L., *et al.*, *Evaluation of minimal Trichoderma reesei cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates*. Biotechnology Progress, 2007, 23 (6), 1270-1276.
- [140] Urbanowicz B.R., *et al.*, *Structural organization and a standardized nomenclature for plant endo-1,4- $\beta$ -glucanases (cellulases) of glycosyl hydrolase family 9*. Plant Physiology, 2007, 144 (4), 1693-1696.
- [141] Rouvinen J., *et al.*, *Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from Trichoderma reesei*. Science, 1990, 249 (4967), 380-386.
- [142] Divne C., *et al.*, *High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei*. Journal of Molecular Biology, 1998, 275 (2), 309-325.
- [143] Parsiegla G., *et al.*, *The crystal structure of the processive endocellulase CelF of Clostridium cellulolyticum in complex with a thiooligosaccharide inhibitor at 2.0 Å resolution*. The EMBO Journal, 1998, 17 (19), 5551-5562.
- [144] Harjunpää V., *et al.*, *Cello-oligosaccharide hydrolysis by cellobiohydrolase II from Trichoderma reesei*. European Journal of Biochemistry, 1996, 240 (3), 584-591.
-

- [145] Igarashi K., *et al.*, *High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I on crystalline cellulose*. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284 (52), 36186-36190.
- [146] Reverbel-Leroy C., *et al.*, *The processive endocellulase CelF, a major component of the Clostridium cellulolyticum cellulosome: purification and characterization of the recombinant form*. Journal of Bacteriology, 1997, 179 (1), 46-52.
- [147] Watson B.J., *et al.*, *Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by Saccharophagus degradans*. Journal of Bacteriology, 2009, 191 (18), 5697-5705.
- [148] Reese E.T., *et al.*, *The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis*. Journal of Bacteriology, 1950, 59 (4), 485-497.
- [149] Wood T.M.; McCrae S.I., *The purification and properties of the C(1) component of Trichoderma koningii cellulase*. Biochemical Journal, 1972, 128 (5), 1183-1192.
- [150] Jalak J., *et al.*, *Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited*. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287 (34), 28802-28815.
- [151] Fägerstam L.G.; Pettersson L.G., *The 1.4-β-glucan cellobiohydrolases of Trichoderma reesei QM 9414*. FEBS Letters, 1980, 119 (1), 97-100.
- [152] Badino S.F., *et al.*, *Exo-exo synergy between Cel6A and Cel7A from Hypocrea jecorina: Role of carbohydrate binding module and the endo-lytic character of the enzymes*. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114 (8), 1639-1647.
- [153] Medve J., *et al.*, *Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from Trichoderma reesei: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes*. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59 (5), 621-634.
- [154] Zamani A., *Introduction to Lignocellulose-based Products*. In *Lignocellulose-Based Bioproducts*, Karimi K., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1-36.
- [155] Álvarez C., *et al.*, *Enzymatic hydrolysis of biomass from wood*. Microbial Biotechnology, 2016, 9 (2), 149-156.
- [156] Van Dyk J.S.; Pletschke B.I., *A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy*. Biotechnology Advances, 2012, 30 (6), 1458-1480.
- [157] Hurlbert J.C.; Preston J.F., *Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of Erwinia chrysanthemi*. Journal of Bacteriology, 2001, 183 (6), 2093-2100.

- 
- [158] Zhang J., *et al.*, *Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis*. *Bioresource Technology*, 2011, *102* (19), 9090-9095.
- [159] Vincken J.-P., *et al.*, *Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity?* *Carbohydrate Research*, 1997, *298* (4), 299-310.
- [160] Boraston Alisdair B., *et al.*, *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. *Biochemical Journal*, 2004, *382* (Pt 3), 769-781.
- [161] Van Tilbeurgh H., *et al.*, *Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei**. *FEBS Letters*, 1986, *204* (2), 223-227.
- [162] Zhang S. W.J., Lu X., Zhou Q., *Structures and interactions of ionic liquids*. *Structure and Bonding*, 2014, *151*, 79-105.
- [163] Lehtiö J., *et al.*, *The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, *100* (2), 484-489.
- [164] Din N., *et al.*, *Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase*. *Nature Biotechnology*, 1991, *9* (11), 1096-1099.
- [165] Hall M., *et al.*, *Biological pretreatment of cellulose: enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases*. *Bioresource Technology*, 2011, *102* (3), 2910-2915.
- [166] Mello B.L.; Polikarpov I., *Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates*. *AMB Express*, 2014, *4*, 36-36.
- [167] Bugg T.D.H.; Rahmanpour R., *Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, *29*, 10-17.
- [168] Ruiz-Dueñas F.J.; Martínez Á.T., *Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this*. *Microbial Biotechnology*, 2009, *2* (2), 164-177.
- [169] Wang W., *et al.*, *Efficient, environmentally-friendly and specific valorization of lignin: promising role of non-radical lignolytic enzymes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, *33* (6), 125.
- [170] Kirk T.K.; Farrell R.L., *Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin*. *Annual Review of Microbiology*, 1987, *41* (1), 465-501.
- [171] Beeson W.T., *et al.*, *Cellulose degradation by polysaccharide monooxygenases*. *Annual Review of Biochemistry*, 2015, *84* (1), 923-946.
-

- [172] Armesilla A.L., *et al.*, *CELL1: a novel cellulose binding protein secreted by Agaricus bisporus during growth on crystalline cellulose*. FEMS Microbiology Letters, 1994, 116 (3), 293-299.
- [173] Vaaje-Kolstad G., *et al.*, *The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from Serratia marcescens is essential for chitin degradation*. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280 (31), 28492-28497.
- [174] Vaaje-Kolstad G., *et al.*, *An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides*. Science, 2010, 330 (6001), 219-222.
- [175] Morgenstern I., *et al.*, *Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family*. Briefings in Functional Genomics, 2014, 13 (6), 471-481.
- [176] Agger J.W., *et al.*, *Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (17), 6287-6292.
- [177] Cannella D., *et al.*, *Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content*. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5 (1), 26.
- [178] Wilson D.B., *Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production—lessons from bacterial genomes and structural analysis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93 (2), 497-502.
- [179] Georgelis N., *et al.*, *Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99 (9), 3807-3823.
- [180] Chen X.-a., *et al.*, *Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by Aspergillus fumigatus Swol*. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (8), 2556-2561.
- [181] McCann M.C.; Carpita N.C., *Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property*. Journal of experimental botany, 2015, 66 (14), 4109-18.
- [182] Himmel M.E.; Picataggio S.K., *Our challenge is to acquire deeper understanding of biomass recalcitrance and conversion*. In *Biomass Recalcitrance*, Blackwell Publishing Ltd.: 2009; pp 1-6.

- 
- [183] Arantes V.; Saddler J.N., *Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates*. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4 (1), 3.
- [184] Meng X.; Ragauskas A.J., *Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27, 150-8.
- [185] Yeh A.-I., *et al.*, *Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose*. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79 (1), 192-199.
- [186] Dasari R.K.; Eric Berson R., *The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 137 (1), 289-299.
- [187] Zhu J.Y., *Physical pretreatment – Woody biomass size reduction for forest biorefinery*. In *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass*, American Chemical Society: 2011; Vol. 1067, pp 89-107.
- [188] Wang Q.Q., *et al.*, *Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109 (2), 381-389.
- [189] Viamajala S., *et al.*, *Heat and mass transport in processing of lignocellulosic biomass for fuels and chemicals*. In *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy*, Singh O.V.; Harvey S.P., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 2010; pp 1-18.
- [190] Neuman R.P.; Walker L.P., *Solute exclusion from cellulose in packed columns: Experimental investigation and pore volume measurements*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 40 (2), 218-225.
- [191] Huang R., *et al.*, *Understanding the key factors for enzymatic conversion of pretreated lignocellulose by partial least square analysis*. *Biotechnology Progress*, 2010, 26 (2), 384-392.
- [192] Jänis J., *et al.*, *Thermostability of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei* studied by electrospray ionization Fourier-transform ion cyclotron resonance MS, hydrogen/deuterium-exchange reactions and dynamic light scattering*. *Biochemical Journal*, 2001, 356 (2), 453-460.
- [193] Hall M., *et al.*, *The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma reesei* is also a thermostabilizing domain*. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155 (4), 370-376.
-

- [194] Emons A.M.C.; Mulder B.M., *How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture*. Trends in Plant Science, 2000, 5 (1), 35-40.
- [195] Li M., *et al.*, *Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance*. Frontiers in Chemistry, 2016, 4, 45.
- [196] Zeng Y., *et al.*, *Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels*. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27, 38-45.
- [197] Jung H.G.; Casler M.D., *Maize stem tissues: impact of development on cell wall degradability*. Crop Science, 2006, 46 (4), 1801-1809.
- [198] Shen H., *et al.*, *Developmental control of lignification in stems of lowland switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency*. BioEnergy Research, 2009, 2 (4), 233-245.
- [199] Wang J., *et al.*, *Lignification of sheepgrass internodes at different developmental stages and associated alteration of cell wall saccharification efficiency*. Frontiers in Plant Science, 2017, 8 (414).
- [200] Besombes S.; Mazeau K., *The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: seeking for evidence of organization of lignin molecules at the interface with cellulose*. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43 (3), 277-286.
- [201] Zhang Y., *et al.*, *Impact of lignin structure and cell wall reticulation on maize cell wall degradability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (18), 10129-10135.
- [202] Hirasawa T., *et al.*, *Chapter 4 - Production technology for bioenergy crops and trees*. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Academic Press: Boston, 2014; pp 51-106.
- [203] Studer M.H., *et al.*, *Lignin content in natural Populus variants affects sugar release*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108 (15), 6300-6305.
- [204] Mansfield S.D., *et al.*, *Designed for deconstruction—poplar trees altered in cell wall lignification improve the efficacy of bioethanol production*. New Phytologist, 2012, 194 (1), 91-101.
- [205] Chen F.; Dixon R.A., *Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production*. Nature Biotechnology, 2007, 25 (7), 759-761.
- [206] Wu Z., *et al.*, *Biomass digestibility is predominantly affected by three factors of wall polymer features distinctive in wheat accessions and rice mutants*. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6, 183-183.

- 
- [207] Shi J., *et al.*, *Impact of engineered lignin composition on biomass recalcitrance and ionic liquid pretreatment efficiency*. *Green Chemistry*, 2016, 18 (18), 4884-4895.
- [208] Jung H.G.; Phillips R.L., *Putative Seedling Ferulate Ester (sfe) Maize Mutant: Morphology, Biomass Yield, and Stover Cell Wall Composition and Rumen Degradability*. *Crop Science*, 2010, 50 (1), 403-418.
- [209] Li M., *et al.*, *Structural characterization of alkaline hydrogen peroxide pretreated grasses exhibiting diverse lignin phenotypes*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5, 38-38.
- [210] Palonen H., *et al.*, *Adsorption of Trichoderma reesei CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin*. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107 (1), 65-72.
- [211] Rahikainen J.L., *et al.*, *Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 53 (5), 315-321.
- [212] Rahikainen J., *et al.*, *Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood—Study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108 (12), 2823-2834.
- [213] Tabka M.G., *et al.*, *Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39 (4), 897-902.
- [214] García-Aparicio M.P., *et al.*, *Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 137 (1), 353-365.
- [215] Sasaki T., *et al.*, *Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbial cellulase*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1979, 21 (6), 1031-1042.
- [216] Yoshida M., *et al.*, *Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of Miscanthus sinensis to monosaccharides*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72 (3), 805-810.
- [217] Chundawat S.P.S., *et al.*, *Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133 (29), 11163-11174.
-

- 
- [218] Zhang Y.-H.P.; Lynd L.R., *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88 (7), 797-824.
- [219] Ohmine K., *et al.*, *Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulose from *Trichoderma viride**. *Biotechnology and Bioengineering*, 1983, 25 (8), 2041-2053.
- [220] Lenz J., *et al.*, *Changes of structure and morphology of regenerated cellulose caused by acid and enzymatic hydrolysis*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1990, 41 (5-6), 1315-1326.
- [221] Puls J.; Wood T.M., *The degradation pattern of cellulose by extracellular cellulases of aerobic and anaerobic microorganisms*. *Bioresource Technology*, 1991, 36 (1), 15-19.
- [222] Peciulyte A., *et al.*, *Impact of the supramolecular structure of cellulose on the efficiency of enzymatic hydrolysis*. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8, 56.
- [223] Wang P., *et al.*, *Genetic manipulation of lignocellulosic biomass for bioenergy*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 29, 32-39.
- [224] Juturu V.; Wu J.C., *Microbial cellulases: engineering, production and applications*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 33, 188-203.
- [225] Hakamada Y., *et al.*, *Mutated alkaline cellulase*. United States Patent and Trademark Office: 2008.
- [226] St-Pierre P., *et al.*, *Modified cellulases with increased thermostability, thermophilicity, and alkalophilicity*. United States Patent and Trademark Office: 2012.
- [227] Lavigne J.A., *et al.*, *Cellulase variants with reduced inhibition by glucose*. United States Patent and Trademark Office: 2011.
- [228] Scott B.R., *et al.*, *Novel lignin-resistant cellulase enzymes*. European Patent Register: 2012.
- [229] Strobel K.L., *et al.*, *Engineering Cel7A carbohydrate binding module and linker for reduced lignin inhibition*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113 (6), 1369-1374.
- [230] Börjesson J., *et al.*, *Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40 (4), 754-762.
- [231] Börjesson J., *et al.*, *Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41 (1), 186-195.
-



- 
- [232] Nakazawa H., *et al.*, *Biomass-binding peptides designed by molecular evolution for efficient degradation of cellulose in biomass by cellulase*. *Green Chemistry*, 2013, 15 (2), 365-369.
- [233] Akimkulova A., *et al.*, *Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin*. *Bioresource Technology*, 2016, 208, 110-116.
- [234] Galbe M.; Zacchi G., *Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production*. In *Biofuels*, Olsson L., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 41-65.
- [235] Zhao X., *et al.*, *Biomass recalcitrance. Part II: fundamentals of different pretreatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6 (5), 561-579.
- [236] Silveira M.H., *et al.*, *Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries*. *ChemSusChem*, 2015, 8 (20), 3366-90.
- [237] Mosier N., *et al.*, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (6), 673-86.
- [238] Makela M.R., *et al.*, *Plant biomass degradation by fungi*. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 72, 2-9.
- [239] Wan C.; Li Y., *Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Biotechnology Advances*, 2012, 30 (6), 1447-1457.
- [240] Shi J., *et al.*, *Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production*. *Biomass and Bioenergy*, 2009, 33 (1), 88-96.
- [241] Hatakka A.I., *Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1983, 18 (6), 350-357.
- [242] Hendriks A.T.W.M.; Zeeman G., *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (1), 10-18.
- [243] Hideno A., *et al.*, *Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw*. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (10), 2706-2711.
- [244] Toma M., *et al.*, *Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2001, 8 (2), 137-142.
-

- 
- [245] Kardos N.; Luche J.-L., *Sonochemistry of carbohydrate compounds*. Carbohydrate Research, 2001, 332 (2), 115-131.
- [246] Clark J.H., *et al.*, *The integration of green chemistry into future biorefineries*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2009, 3 (1), 72-90.
- [247] Pu Y., *et al.*, *Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments*. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6 (1), 15.
- [248] Loow Y.-L., *et al.*, *Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment*. Cellulose, 2016, 23 (3), 1491-1520.
- [249] Kumar A.K.; Sharma S., *Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review*. Bioresources and Bioprocessing, 2017, 4 (1), 7.
- [250] Foston M.; Ragauskas A.J., *Changes in the structure of the cellulose fiber wall during dilute acid pretreatment in Populus studied by <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H NMR*. Energy & Fuels, 2010, 24 (10), 5677-5685.
- [251] Qing Q., *et al.*, *Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes*. Bioresource Technology, 2010, 101 (24), 9624-9630.
- [252] Vancov T.; McIntosh S., *Effects of dilute acid pretreatment on enzyme saccharification of wheat stubble*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2011, 86 (6), 818-825.
- [253] Zhao X., *et al.*, *Pretreatment of Siam weed stem by several chemical methods for increasing the enzymatic digestibility*. Biotechnology Journal, 2010, 5 (5), 493-504.
- [254] Silverstein R.A., *et al.*, *A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks*. Bioresource Technology, 2007, 98 (16), 3000-3011.
- [255] Sannigrahi P., *et al.*, *Pseudo-lignin and pretreatment chemistry*. Energy & Environmental Science, 2011, 4 (4), 1306-1310.
- [256] Vancov T., *et al.*, *Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels*. Renewable Energy, 2012, 45, 1-6.
- [257] Swatloski R.P., *et al.*, *Dissolution of cellose with ionic liquids*. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124 (18), 4974-4975.
- [258] Fort D.A., *et al.*, *Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride*. Green Chemistry, 2007, 9 (1), 63-69.
-

- 
- [259] Sun N., *et al.*, *Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate*. *Green Chemistry*, 2009, 11 (5), 646-655.
- [260] Elgharbawy A.A., *et al.*, *Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass*. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 109, 252-267.
- [261] Moulthrop J.S., *et al.*, *High-resolution  $^{13}\text{C}$  NMR studies of cellulose and cellulose oligomers in ionic liquid solutions*. *Chemical Communications*, 2005, (12), 1557-1559.
- [262] Remsing R.C., *et al.*, *Mechanism of cellulose dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a  $^{13}\text{C}$  and  $^{35/37}\text{Cl}$  NMR relaxation study on model systems*. *Chemical Communications*, 2006, (12), 1271-1273.
- [263] da Costa Lopes A.M., *et al.*, *Ionic liquid as a tool for lignocellulosic fractionation*. *Sustainable Chemical Processes*, 2013.
- [264] Jiang M., *et al.*, *Isolation of cellulose with ionic liquid from steam exploded rice straw*. *Industrial Crops and Products*, 2011, 33 (3), 734-738.
- [265] George A., *et al.*, *The effect of ionic liquid cation and anion combinations on the macromolecular structure of lignins*. *Green Chemistry*, 2011, 13 (12), 3375-3385.
- [266] Tan S.S.Y., *et al.*, *Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid*. *Green Chemistry*, 2009, 11 (3), 339-345.
- [267] Carvalho A.V., *et al.*, *Relevance of the acidic 1-butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulphate ionic liquid in the selective catalysis of the biomass hemicellulose fraction*. *RSC Advances*, 2015, 5 (58), 47153-47164.
- [268] Yoon L.W., *et al.*, *Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes*. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 36, 160-169.
- [269] Bahcegul E., *et al.*, *Different ionic liquids favor different lignocellulosic biomass particle sizes during pretreatment to function efficiently*. *Green Chemistry*, 2012, 14 (7), 1896-1903.
- [270] Viell J.; Marquardt W., *Disintegration and dissolution kinetics of wood chips in ionic liquids*. In *Holzforschung*, 2011; Vol. 65, p 519.
- [271] Engel P., *et al.*, *Point by point analysis: how ionic liquid affects the enzymatic hydrolysis of native and modified cellulose*. *Green Chemistry*, 2010, 12 (11), 1959-1966.
-

- [272] Auxenfans T., *et al.*, *Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments*. *Energy Conversion and Management*, 2014, 88, 1094-1103.
- [273] Li Q., *et al.*, *Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment*. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (14), 3570-3575.
- [274] Li C.; Zhao Z.K., *Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquid*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 349 (11-12), 1847-1850.
- [275] Yates M.V., *et al.*, *Manual of environmental microbiology, fourth edition*. American Society of Microbiology: 2016.
- [276] Ali S.N.; Mahmood R., *Sodium chlorite increases production of reactive oxygen species that impair the antioxidant system and cause morphological changes in human erythrocytes*. *Environmental Toxicology*, 2017, 32 (4), 1343-1353.
- [277] Kumar R., *et al.*, *Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2013, 130, 372-381.
- [278] Yokoyama T., *et al.*, *Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (5), 1040-1044.
- [279] Höije A., *et al.*, *Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks*. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 61 (3), 266-275.
- [280] Wise L.E., *et al.*, *Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses*. *Paper Trade Journal*, 1946, 122 (2), 35-43.
- [281] Collings G.F., *et al.*, *Lignin as determined by oxidation with sodium chlorite and a comparison with permanganate lignin*. *Journal of Dairy Science*, 1978, 61 (8), 1156-1160.
- [282] Gierer J., *Chemistry of delignification*. *Wood Science and Technology*, 1985, 19 (4), 289-312.
- [283] Hubbell C.A.; Ragauskas A.J., *Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (19), 7410-7415.

- 
- [284] Siqueira G., *et al.*, *Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite*. *Applied Energy*, 2013, 102, 399-402.
- [285] Agarwal U.P., *et al.*, *Enzymatic hydrolysis of loblolly pine: effects of cellulose crystallinity and delignification*. *Holzforschung*, 2013, 67 (4), 371-377.
- [286] Huron M., *et al.*, *Impact of delignification on the morphology and the reactivity of steam exploded wheat straw*. *Industrial Crops and Products*, 2016, 79, 104-109.
- [287] Kim J.S., *et al.*, *A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, 2016, 199, 42-48.
- [288] Zhao X., *et al.*, *Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82 (5), 815.
- [289] Tang X., *et al.*, *Green processing of lignocellulosic biomass and Its derivatives in deep eutectic solvents*. *ChemSusChem*, 2017, 10 (13), 2696-2706.
- [290] Yan L., *et al.*, *Hot water pretreatment of lignocellulosic biomass: an effective and environmentally friendly approach to enhance biofuel production*. *Chemical Engineering & Technology*, 2016, 39 (10), 1759-1770.
- [291] Alvira P., *et al.*, *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (13), 4851-4861.
- [292] Mosier N.S., *Fundamentals of aqueous pretreatment of biomass*. In *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, John Wiley & Sons, Ltd: 2013; pp 129-143.
- [293] Pu Y., *et al.*, *Lignin structural alterations in thermochemical pretreatments with limited delignification*. *BioEnergy Research*, 2015, 8 (3), 992-1003.
- [294] Yu Z., *et al.*, *Effect of lignin chemistry on the enzymatic hydrolysis of woody biomass*. *ChemSusChem*, 2014, 7 (7), 1942-1950.
- [295] Ko J.K., *et al.*, *Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112 (2), 252-262.
- [296] Rahikainen J.L., *et al.*, *Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption*. *Bioresource Technology*, 2013, 133, 270-278.
- [297] Zhu J.Y., *et al.*, *Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine*. *Bioresource Technology*, 2009, 100 (8), 2411-2418.
-

- 
- [298] Singh J., *et al.*, *Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review*. Carbohydrate Polymers, 2015, 117, 624-631.
- [299] Kumar R., *et al.*, *Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies*. Bioresource Technology, 2009, 100 (17), 3948-3962.
- [300] Sun S., *et al.*, *The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials*. Bioresource Technology, 2016, 199, 49-58.
- [301] Sluiter A., *et al.*, *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass*. Laboratory Analytical Procedure, 2008, 1617, 1-16.
- [302] DeMartini J.D., *et al.*, *Small-scale and automatable high-throughput compositional analysis of biomass*. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108 (2), 306-312.
- [303] Xu F., *et al.*, *Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review*. Applied Energy, 2013, 104, 801-809.
- [304] Teeäär R., *et al.*, *Crystallinity of cellulose, as determined by CP/MAS NMR and XRD methods*. Polymer Bulletin, 1987, 17 (3), 231-237.
- [305] Gierlinger N., *et al.*, *Raman imaging of lignocellulosic feedstock*. In *Cellulose - biomass conversion*, Kadla P.J., Ed. InTech: 2013.
- [306] Kim H.; Ralph J., *Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-d<sub>6</sub>/pyridine-d<sub>5</sub>*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2010, 8 (3), 576-591.
- [307] Carpita N., *et al.*, *Determination of the pore size of cell walls of living plant cells*. Science, 1979, 205 (4411), 1144-1147.
- [308] Li C., *et al.*, *Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover*. Bioresource Technology, 2011, 102 (13), 6928-6936.
- [309] Hinkle J.D., *et al.*, *Biomass accessibility analysis using electron tomography*. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8 (1), 212.
- [310] Rondeau-Mouro C., *et al.*, *Assessment of cell wall porosity in Arabidopsis thaliana by NMR spectroscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42 (2), 83-92.
- [311] Kristensen J.B., *et al.*, *Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production*. Biotechnology for Biofuels, 2008, 1 (1), 5.
-

- 
- [312] Wang B., *et al.*, *Deconstructing recalcitrant Miscanthus with alkaline peroxide and electrolyzed water*. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (2), 752-760.
- [313] Hansen M.A.T., *et al.*, *Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (Triticum aestivum L.) – The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3), 2804-2811.
- [314] Moran-Mirabal J.M., *The study of cell wall structure and cellulose–cellulase interactions through fluorescence microscopy*. *Cellulose*, 2013, 20 (5), 2291-2309.
- [315] Lucas M., *et al.*, *Reversible swelling of the cell wall of poplar biomass by ionic liquid at room temperature*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (6), 4518-4523.
- [316] Brunecky R., *et al.*, *Redistribution of xylan in maize cell walls during dilute acid pretreatment*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102 (6), 1537-1543.
- [317] DeMartini J.D., *et al.*, *Application of monoclonal antibodies to investigate plant cell wall deconstruction for biofuels production*. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4 (10), 4332-4339.
- [318] Jervis E.J., *et al.*, *Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (38), 24016-24023.
- [319] Yang D., *et al.*, *Investigation of the porous structure of cellulosic substrates through confocal laser scanning microscopy*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110 (11), 2836-2845.
- [320] Ding S.-Y., *et al.*, *How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility?* *Science*, 2012, 338 (6110), 1055-1060.
- [321] Luterbacher J., *et al.*, *Biphasic supercritical carbon dioxide-water pretreatment of lignocellulosic biomass*. United States Patent and Trademark Office: 2011.
- [322] Luterbacher J.S., *et al.*, *Modeling enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates using confocal fluorescence microscopy I: Filter paper cellulose*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112 (1), 21-31.
- [323] Luterbacher J.S., *et al.*, *Modeling Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates using Fluorescent Confocal Microscopy II: Pretreated Biomass*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112 (1), 32-42.
- [324] Belmokhtar N., *et al.*, *Changes in Phenolics Distribution After Chemical Pretreatment and Enzymatic Conversion of Miscanthus × giganteus Internode*. *BioEnergy Research*, 2013, 6 (2), 506-518.
-

- [325] Auxenfans T., *et al.*, *Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic liquids towards one-batch process*. Carbohydrate Polymers, 2012, 90 (2), 805-813.
- [326] Barr C.J., *et al.*, *Influence of ionic-liquid incubation temperature on changes in cellulose structure, biomass composition, and enzymatic digestibility*. Cellulose, 2014, 21 (2), 973-982.
- [327] Adney B.; Baker J., *Measurement of cellulase activities* NREL Technical Report, 2008, 11.
- [328] Lowry O.H., *et al.*, *Protein measurement with the folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193 (1), 265-275.
- [329] Monties B., *Dosage de la lignine insoluble en milieu acide : influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille*. Agronomie, 1984, 4 (4), 387-392.
- [330] González López C.V., *et al.*, *Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass*. Bioresource Technology, 2010, 101 (19), 7587-7591.
- [331] Rolando C., *et al.*, *Thioacidolysis*. In *Methods in Lignin Chemistry*, Lin S.Y.; Dence C.W., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1992; pp 334-349.
- [332] Chantreau M., *et al.*, *Ectopic lignification in the flax lignified bast fiber1 mutant stem is associated with tissue-specific modifications in gene expression and cell wall composition*. The Plant Cell, 2014, 26 (11), 4462-4482.
- [333] Paës G., *Fluorescent probes for exploring plant cell wall deconstruction: a review*. Molecules, 2014, 19 (7), 9380-402.
- [334] Fricker M., *et al.*, *Quantitative fluorescence microscopy: from art to science*. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57 (1), 79-107.



---

## Déconstruction de la biomasse lignocellulosique : corrélations entre l'activité et la mobilité enzymatiques

---

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer des facteurs pouvant être considérés comme des marqueurs génériques de la récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. Des analyses chimiques, spectroscopiques et microscopiques ont permis d'étudier la relation entre la dynamique enzymatique et certains facteurs descriptifs de la composition chimique et de la structure d'échantillons de biomasse (blé, miscanthus, peuplier) soumis à quatre prétraitements contrastés.

La structure et la composition de la lignine sont les principaux acteurs de la récalcitrance pour chaque biomasse, comme le montre la corrélation négative entre la fluorescence et le rendement d'hydrolyse. Une augmentation de la porosité améliore la saccharification de manières différentes pour chaque biomasse en raison des différences d'organisation de leurs parois. Des mesures de mobilité de sondes fluorescentes de tailles similaires à celles des enzymes ont révélé que les prétraitements impactent la structure pariétale de manière plus importante que la saccharification. Les tailles des pores des parois de peuplier doivent être au moins 5 fois supérieures au diamètre des enzymes pour que celles-ci puissent diffuser efficacement dans les parois, probablement en raison d'une obturation des pores causée par les interactions des enzymes avec la lignine. Des mesures d'interaction des sondes avec la lignine ont montré que ces dernières dépendent à la fois de la structure du polymère et de son accessibilité déterminée par la taille des pores.

Nos résultats ont permis de fournir des informations sur la récalcitrance qui pourront servir de pistes pour permettre une meilleure valorisation de la biomasse.

---

**Mots-clés :** lignocellulose – récalcitrance – enzymes – diffusion – lignine – porosité – fluorescence – FRAP – FRET

---

## Deconstruction of lignocellulosic biomass: correlations between enzymatic activity and mobility

---

Biomass recalcitrance to enzymatic hydrolysis is a multifactorial phenomenon still challenging to understand. The main objective of this work was to determine factors that could be considered as generic markers of this recalcitrance. The relationship between enzymes dynamics and cell wall chemical and structural properties was studied using a panel of contrasted biomass samples (wheat straw, miscanthus, poplar) submitted to four different pretreatments, using a combination of chemical, spectroscopic and microscopy analyses.

Lignin structure and composition were found to be the main factors explaining recalcitrance for all three biomasses, as highlighted by the negative correlations between fluorescence intensity and glucose yield. Increasing porosity improves saccharification differently for each species reflecting the different organisation of their cell walls. Mobility measurements of probes representative of enzyme size revealed that pretreatments have a more important impact on cell wall structure than the subsequent saccharification. Both the activity and mobility of enzymes are governed by pores sizes whose diameter need to be at least 5 times the diameter of the enzymes for the catalyst to diffuse efficiently in poplar cell walls, likely due to a fill-in effect caused by interactions with lignin. The intertwining between lignin and pores sizes was emphasized by measurements of the probes interactions with lignin revealing that binding depended on lignin structure, but also on its accessibility and on cell wall porosity.

Our strategy and results provide insights for the improvement of pretreatment methods allowing a better valorisation of lignocellulosic biomass.

---

**Keywords:** lignocellulose – recalcitrance – enzymes – diffusion – lignin – porosity – fluorescence – FRAP – FRET

---

**Discipline :** SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Spécialité :** Biotechnologie végétale



Université de Reims Champagne-Ardenne

UMR 614 Fractionnement des AgroRessources et Environnement

2, esplanade Roland GARROS 51686 REIMS Cedex 2