Ecole doctorale ABIES

UFR

Université de Reims Champagne-Ardenne

Thèse présentée par :

Quentin CZERWIEC

Soutenue le 25 Mars 2020

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**

Discipline : SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIQUES AGRO-ALIMENTAIRES

Evaluation du potentiel ligninolytique bactérien pour la production de molécules aromatiques

Composition du jury

Rapporteurs : Mme Hélène Carrere, Directrice de Recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement de Narbonne

M. Éric Record, Directeur de Recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement de Marseille

Examinateurs : M. Nicolas Brosse, Professeur, Université de Lorraine

M. Éric Gelhaye, Directeur de Recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement de Champenoux

Directeurs : Mme Harivony Rakotoarivonina, Maitre de conférences, Université de Reims Champagne Ardenne

M. Bernard Kurek, Directeur de Recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement de Reims

Co-encadrante : Mme. Brigitte Chabbert, Chargé de Recherche, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement de Reims

Résumé

Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel ligninolytique de la bactérie *Thermobacillus xylanilyliticus*, en étudiant son comportement en présence de différents substrats riches en lignine, comme la paille de blé, la paille de blé explosée à la vapeur et la lignine kraft. Après avoir caractérisé ces substrats, des cultures ont été réalisées en présence de ces substrats complémentés ou non avec du xylane. Des activités phénol-oxydases ont été mises en évidence avec des profils dépendant de la nature de ces substrats. Par la suite, les modifications des résidus et des milieux de culture ont été évaluées pour mesurer l'impact de la croissance bactérienne. Les changements observés sur les résidus n'ont pu être reliés de manière certaine à la dégradation de la lignine. En revanche, dans les milieux de culture, des modifications des concentrations de plusieurs molécules phénoliques ont été observées et pourraient être reliées au métabolisme de ces composés par la bactérie. Pour identifier les enzymes responsables des activités phénol-oxydases et des modifications de composés phénoliques, les protéines produites par la bactérie et spécifiquement induites en présence de substrats riches en lignine ont été étudiées. Plusieurs protéines ont été identifiées comme des enzymes ayant potentiellement un rôle dans le métabolisme des composés aromatiques et/ou dans la réponse au stress probablement due à la présence de ces composés phénoliques. Enfin, parmi les enzymes identifiées, une catalase/peroxydase a été clonée, produite et caractérisée. Cette enzyme est thermoactive, et possède une activité peroxydase optimale, à pH 7 et 55°C.

Mots clés : *Thermobacillus xylanilyticus*, Lignine, Molécules aromatiques, Oxydoréductases, Valorisation, Bioraffinerie.

Abstract

In this study, we evaluated the ligninolytic potential of the bacterium *Thermobacillus xylanilyliticus* by studying its behaviour in the presence of different lignin-rich substrates, such as wheat straw, steam-exploded wheat straw and kraft lignin. After characterizing these lignified substrates, cultures were carried out with these substrates supplemented or not with xylan. Phenol-oxidases activities were produced with dissimilar profiles depending on the nature of the substrates used. Subsequently, modifications in residues and culture media were evaluated to measure the impact of bacterial growth. The changes observed in the residues could not be reliably related to the lignin degradation. On the other hand, modifications of phenolic compounds concentrations were observed in the culture media and could be related to the metabolism of these molecules by the bacterium. To identify enzymes related to phenol oxidases activities and modifications of phenolic compounds, the proteins produced by the bacterium and induced by lignin rich substrates were studied. Several proteins were identified as enzymes with a potential role in the metabolism of aromatic compounds and/or in stress response probably due to the presence of these phenolic compounds. Finally, a catalase/peroxidase was cloned, produced and characterized. This enzyme is thermoactive, with a peroxidase optimal activity, at pH 7 and 55°C.

Keywords : *Thermobacillus xylanilyticus*, Lignin, Aromatic compounds, Oxidoreductases, Valorization, Biorefinery.

Laboratoire d'accueil

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet LIGNOFRAC au sein de la Chaire Agroressources FERmentation Enzymes (AFERE), Unité Mixte de Recherche Fractionnement des AgroRessources et Environnement (UMR FARE), Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), et Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA).

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été financés par le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) et la communauté urbaine du Grand Reims.

“Science sans conscience n’est que ruine de l’âme”

Rabelais, *Pantagruel*.

Remerciements

Après trois années passées à Reims, au sein de l'UMR FARE, il est aujourd'hui temps de remercier toutes les personnes qui ont permis et accompagné cette aventure.

Je commencerai par remercier l'ensemble de mes encadrants, sans qui ce projet n'aurait pu être mené à bien. Merci à Harivony Rakotoarivonina, Brigitte Chabbert, Bernard Kurek et Véronique Aguié qui ont pris le temps, pour discuter et m'accompagner tout au long de ce projet. Merci d'avoir passé autant de temps avec moi pour finaliser ce mémoire qui sera, je l'espère à la hauteur de vos espérances.

Merci aux rapporteurs, Éric Record et Hélène Carrere ainsi qu'aux membres du jury Éric Gelhaye et Nicolas Brosse, d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci aux membres de l'UMR FARE pour leur accueil chaleureux, que ce soit dans la vie au laboratoire mais aussi dans l'animation scientifique. En particulier à tous les doctorants, post-doctorants, ingénieurs et stagiaires de passage au sein de l'unité qui ont égayé mes journées. Alicia, Amandine, Anne, Aya, Bérangère, Carlos, Céline, Christelle, Doriane, Elisa, Elise, Flora, Florian, Gaétan, Issa, Jean, Juliette, Justine, Karina, Laurent, Mathilde, Mickael, Raphael, Romain, Terence, Thibault et Thomas.

Un grand merci à David, qui m'a beaucoup aidé pour les analyses HPLC et RMN, à Anouck pour ces conseils sur l'IRTF, à François pour ces analyses en HPAE-PAD, mais aussi Agnès, Delphine et Fréderic pour m'avoir facilité la partie administrative.

Merci aux membres de l'activité enzyme pour leurs aides, leurs bonnes humeurs et l'organisation de la vie quotidienne dans le laboratoire : Caroline, Corinne, Ludovic et Sofiène.

Au niveau plus personnel, je tiens à remercier tous mes amis et ma famille, pour leur soutien inconditionnel durant ces dernières années. Avec le Crou initiale : Clément, JP, Mehdi, Nicolas, Thomas et Simon. La Team Chat : Beber, Dudu, Fanou, Juju, Lulu, PPT et Roro, la Team Fut : Arthur, Aude, Elodie, Emilie, François, Géo, Joris, Jonathan, Julien, Ludovic, Mohamed, Nicolas, Pierre, Soizic, Thomas, Ulysse, Vivien, ainsi que les amis éparpillés à travers la France et le Monde : Armelle, Camille, Clément et Florent.

Des remerciements s'imposent pour mon colocataire Nordine, et ma chérie Kaoutar, avec qui j'ai vécu de très agréables années en leur compagnie à Croix-Rouge. Merci de m'avoir supporté aussi longtemps, surtout pendant cette dernière période de rédaction. Je vous aime de tout mon cœur.

Enfin, un grand merci à toute ma famille et plus particulièrement à ma sœur Aurore et mes parents Isabelle et Thierry pour leur aide et leur soutien sans faille.

Sommaire

Introduction **1**

Etat de l'art **3**

I : La lignine, un composant majeur de la biomasse lignocellulosique 3

I.1. La complexité de la biomasse lignocellulosique 3

I.2. Les différentes liaisons entre les polymères pariétaux 9

I.3. La récalcitrance naturelle de la biomasse lignocellulosique 12

II. Lignines industrielles et leurs valorisations 14

II.1. Les lignines techniques 15

II.2. Valorisation de la lignine 19

III. Conversion biologique de la lignine 22

III.1. La dégradation biologique de la lignine 22

III.2. Conversion enzymatique de la lignine 23

IV Microorganismes ligninolytiques et leurs aptitudes à croître sur la lignine 42

IV.1. Les microorganismes impliqués dans la ligninolyse 42

IV.2. Physiologie bactérienne en présence de lignines et biomasses lignifiées 43

V. *Thermobacillus xylanilyticus*, une bactérie d'intérêt pour la ligninolyse 48

V.1. Origine et caractéristiques de la bactérie 48

V.2. Potentiel enzymatique de *TX* et fractionnement des biomasses lignocellulosiques 49

Problématique **52**

Objectifs **53**

Questions scientifiques **53**

Matériel et Méthodes **54**

I : Nature et caractérisation des substrats lignifiés 54

I.1. Nature des substrats 54

I.2. Composition en glucides 54

I.3. Composition en composés phénoliques 56

I.4. Teneurs en lignine 57
II : Cultures de *TX* en présence de substrats lignifiés 58
II.1. Mise en culture de la bactérie 58
II.2. Analyse des différents échantillons obtenus (milieu de culture et résidus de culture) .. 60
II.3. Caractérisation chimique des résidus solides et liquides des cultures bactériennes 64
III. Protéomique 68
III.1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-Page) 68
III.2. Préparation des échantillons 69
III.3. Traitements des données 71
IV : Clonage d'un gène d'intérêt 72
IV.1. Les bactéries utilisées 72
IV.2. Le vecteur 72
IV.3. Amplification du gène d'intérêt 73
V : Production et purification de Txyl-3231-His 77
V.1. Conditions d'induction de la production de Txyl-3231-His par bactéries d'expression . 77
V.2. Production de Txyl-3231-His et purification 78
VI : Mesure des paramètres biochimiques de Txyl-3231-His et de son activité 79
VI.1. Détermination de la température et du pH optimal 79
Résultats 80
I : Caractérisation des substrats utilisés 80
I.1. Composition en lignines et polysaccharides 80
I.2. Composition en molécules phénoliques 81
I.3. Potentiels en lignines et en acides phénoliques dans les milieux de culture 83
II : Croissance de *TX* sur des substrats lignifiés 83
II.1. Croissance bactérienne en présence de substrats lignifiés 83
II.2. Les activités enzymatiques 90
III : Effet sur les résidus et composés phénoliques 98

III.1. Caractérisation des résidus 98

III.2. Composition des milieux de culture au cours de la croissance 111

IV : Analyse protéomique 116

IV.1. Analyse globale 116

IV.2. Comparaison de l'expression des protéines clés 122

V : Production et caractérisation d'une peroxydase d'intérêt 125

V.1. Isolement du gène d'intérêt par PCR 125

V.2. Expression de *Tx-3231* 126

V.3. Purification de Tx-3231 recombinante 127

V.4. Caractérisation partielle de Tx-3231 : pH et température optimaux 128

Discussion 130

I. Choix des substrats utilisés 130

II : Croissance et activités enzymatiques de TX sur des substrats lignifiés 131

III : Effet sur les résidus et composés phénoliques 139

IV : Identification d'oxydoreductases clés par approches omiques et caractérisation d'enzyme d'intérêt 143

Discussion générale et perspective 147

Bibliographie 151

Résumé 185

Tables des Figures

Figure 1 : A) Paroi d'une cellule végétale (adaptée de Agarwal, 2006). B) Répartition des constituants de la paroi en fonction des couches pariétales (adaptée Brandt *et al.,* 2013). C) Arrangement spatial des constituants dans la paroi (adaptée Rakotovelo, 2017)..... **3**

Figure 2 : Structure de la cellulose (adaptée de Brandt *et al.*, 2013)..... **4**

Figure 3 : A) Oses constitutifs des hémicellulsoes (adaptée de Brandt *et al.*, 2013). B) Structures de différentes hémicelluloses : (1) glucuronoxylane, (2) glucuronoarabinoxylane, (3) galactomannane et (4) galactoglucomannane (adaptée de Scheller and Ulvskov, 2010)..... **6**

Figure 4 : A) Principaux monolignols présents dans la lignine. B) Principales unités présentes dans la lignine. C) Principales liaisons présentes dans la lignine. D) Structure de la lignine chez différentes espèces végétales (adaptée de Ralph *et al.*, 2004a; Mansfield *et al.*, 2012; Ralph *et al.*, 2019). **8**

Figure 5 : Représentation des dimères, trimères et tétramères d'acide férulique, ainsi que des pontages inter et intramoléculaires entre des arabinoxylanes (adaptée de Bento-Silva *et al.*, 2018). **10**

Figure 6 : Liaisons covalentes associées aux complexes lignines-carbohydrates. Les liaisons sont illustrées par les flèches noires (adaptée de Balakshin *et al.*, 2011; Nishimura *et al.*, 2018). **11**

Figure 7 : Représentation de la structure de la paroi cellulaire secondaire chez les graminées (adaptée de Santiago *et al.*, 2013). **12**

Figure 8 : Représentation de la structure complexe de la biomasse lignocellulosique (*https://cmb.ornl.gov/index.php/research/plant-cell-wall/structure-and-dynamics*; Consulté le 03/12/19). **14**

Figure 9 : Réactions de modifications des structures de la lignine pendant le procédé kraft. A) Réactions des structures β-aryle éthers (adaptée de Li and Takkellapati, 2018). B) Réactions de recondensation (adaptée de Asina *et al.*, 2017)..... **16**

Figure 10 : A) Réactions de dépolymérisation d'une structure β-O-4. B) Réactions de repolymérisation sous forme de structure condensée C-C (adaptée de Li *et al.*, 2007). **18**

Figure 11 : Représentation schématique du système de dégradation microbienne de la lignine (adaptée de Kamimura *et al.*, 2019). **23**

Figure 12 : A) Présentation des enzymes capables de dépolymériser la lignine polymérique (adaptée de Abdelaziz *et al.*, 2016). B) Exemple de molécules oxydantes. C) Diffusion des molécules oxydantes dans la lignine (adaptée de Brown and Chang, 2014)..... **24**

Figure 13 : Activité enzymatique d'une laccase et son mécanisme d'oxydoréduction. Le substrat est un aromatique phénolique, sauf en présence du mécanisme LMS, ou le substrat peut être un aromatique phénolique ou non (adaptée de Baldrian, 2006; Abdelaziz *et al.*, 2016). **26**

Figure 14 : Applications industrielles des laccases en pourcentage d'utilisation (adaptée de Mate and Alcalde, 2017). **26**

Figure 15 : Mécanisme d'action des différentes peroxydases. A) LiP, B) MnP et C) VP. Le substrat est un aromatique non phénolique pour la LiP, un aromatique phénolique pour la MnP et un aromatiques phénolique ou non pour la VP (adaptée de Hofrichter, 2002; Abdelaziz *et al.*, 2016; Chen and Wan, 2017)..... **29**

Figure 16 : Radicaux : A) Quinone, B) Méthoxyle et C) Phénoxyle. **32**

Figure 17 : Catabolisme intracellulaire des composés aromatiques (adaptée de Schutyser *et al.*, 2018)..... **33**

Figure 18 : Voie catabolique des β-éthérases chez *Sphingobium sp*. SYK-6 (adaptée de (Kamimura *et al.*, 2017b; Higuchi *et al.*, 2019)..... **34**

Figure 19 : Voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques. A) Voie de dégradation des composés issus de l'unité H de la lignine. B) Voie de dégradation des composés issus de l'unité G de la lignine. C) Voie de dégradation des composés issus de l'unité S de la lignine (adaptée de Wang *et al.*, 2017; Chen and Wan, 2017; Xu *et al.*, 2019; Ravi, Abdelaziz, *et al.*, 2019)..... **36**

Figure 20 : Voies cataboliques périphériques (adaptée de Fuchs *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2019). **38**

Figure 21 : Voies cataboliques inférieures avec le clivage des intermédiaires centraux (adaptée de Lubbers *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019)..... **40**

Figure 22 : Images de microscopie optique de la souche *Thermobacillus xylanilyticus* (Barre = 2 mm). A) Cellules à l'état végétatif. B) Cellules en cours de sporulation. C) Cellules en phase de croissance exponentielle tardive observées en microscopie électronique à balayage (adaptée de Touzel *et al.*, 2000). **48**

Figure 23 : Présentation des substrats riches en lignine utilisés dans cette étude. **54**

Figure 24 : A) Régénération de la souche XE de *TX* pour la pré-culture. B) Culture de *TX* en présence des substrats lignifiés : témoins (T), xylane (X), paille de blé (PB), paille de blé explosée à la vapeur (PBEV) et lignine kraft (LK). **59**

Figure 25 : Gamme étalon de la BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford. **61**

Figure 26 : Gamme étalon du xylose par la méthode de Kidby et Davidson pour le dosage de l'activité xylanase. **63**

Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la purpurogalline pour le dosage des activités phénol oxydases..... **64**

Figure 28 : Principe de l'ACP, avec l'ensemble des individus représentés sous forme de tableau (A), ou sous forme d'espace vectoriel (B) et la carte factorielle des individus (C). ... **66**

Figure 29 : Carte du vecteur pET-28b. **73**

Figure 30 : Croissance de *TX* en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Ces substrats sont complémentés ou non avec du xylane à 20 % et à 50 %. **85**

Figure 31 : Croissance de *TX* sur l'ensemble des substrats complémentés avec 50 % de xylane. **86**

Figure 32 : Cinétique de production de protéines en fonction de la croissance (DO_{600nm}), et évolution du ratio EC/IC, en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les concentrations protéiques extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les concentrations protéiques intracellulaires (IC) sont hachurées. **89**

Figure 33 : Cinétique de production d'activités xylanases en fonction de la croissance (DO_{600nm}) et en fonction de la production de protéines (mg) au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. **92**

Figure 34 : Cinétique de production des activités phénol-oxydases en fonction de la croissance (DO_{600nm}) et évolution du ratio EC/IC, au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les activités extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les activités intracellulaires (IC) sont hachurées. **96**

Figure 35 : Cinétique de production d'activités phénol-oxydases en fonction des protéines et évolution du ratio EC/IC, au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les activités extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les activités intracellulaires (IC) sont hachurées. **97**

Figure 36 : Spectres infrarouge à transformée de Fourier des substrats avec ou sans croissance bactérienne des résidus. Les spectres bleus, rouges et verts correspondent respectivement aux résidus PB, PBEV et LK..... **100**

Figure 37 : Analyse en composantes principales de l'ensemble des spectres. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne. Les spectres bleus, rouges et verts correspondent respectivement aux résidus PB, PBEV et LK. **102**

Figure 38 : Analyse en composantes principales des spectres de la PB. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne. **103**

Figure 39 : Analyse en composantes principales des spectres de la PBEV. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne. **104**

Figure 40 : Analyse en composantes principales sur la LK. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne. **105**

Figure 41 : Analyse RMN-2D des résidus de la PB avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. En bleu clair, les liaisons aryle-éther (β-O-4), en vert les liaisons phenylcoumarane (β-5), en violet les liaisons résinol (β-β), en vert pale les unités G et en rouge les unités S. **107**

Figure 42 : Analyse RMN-2D des résidus de la PBEV avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. En bleu clair, les liaisons aryle-éther (β-O-4), en vert les liaisons phenylcoumarane (β-5), en violet les liaisons résinol (β-β), en vert pale les unités G et en rouge les unités S. **108**

Figure 43 : Analyse RMN du phosphore des résidus de LK avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. OH A = Aliphatique ; Ei = Etalon interne ; OH S = Syringyle ; OH G = Guaiacyle ; OH H = *p*-Hyroxyphényle. **110**

Figure 44 : Molécules phénoliques présentes dans les milieux de culture sans (Témoin 30 h) et avec croissance (Croissance 30 h) en présence de PB (A), PBEV (B) et LK (C) complémentée par le xylane 50 %. Acide *p*-Coumarique (*p*CA) ; Acide Férulique (FA) ; Acide Di-Férulique (Di-FA) ; Acide *p*-Hydroxybenzoïque (*p*HA) ; Acide Vanillique (VA) ; Acide Syringique (SA) ; *p*-Hydroxybenzaldhéyde (*p*H) ; Vanilline (V) et Syringaldéhyde (S). **113**

Figure 45 : Fonctions des différentes protéines intracellulaires IC (A) et extracellulaires EC (B) identifiées sur les différents substrats ainsi que leur abondance en pourcentage (%) et le nombre de protéines exprimées (Nb). **118**

Figure 46 : Diagramme de Venn sur les protéines intracellulaires (A) et extracellulaires (B) **121**

Figure 47 : Analyse électrophorétique du gène Tx-3231 amplifié par PCR ; A) après amplification, B) après purification ; (M : marqueurs de masses moléculaire, T+ témoin d'amplification) **126**

Figure 48 : Profil électrophorétique des différents extraits de culture de *E. coli* Tuner DE3 et JM109DE3 contenant le plasmide recombinant Tx-3231 pEt28 His obtenus après différentes conditions d'induction (M : marqueurs de masses moléculaire) **127**

Figure 49 : Profil électrophorétique de la purification de *Tx-3231*. A) révélation au bleu de Coomassie, B) révélation en Western Blot avec des anticorps anti-Histidine ; (M marqueurs de mases moléculaire). **128**

Figure 50 : pH et Température optimaux de Tx-3231. A-B) activité peroxydase; C-D) activité catalase **129**

Listes des Tableaux

Tableau 1 : Composition paroi chez différentes plantes (adaptée de Galkin and Samec, 2016). **4**

Tableau 2 : Variation des proportions en liaisons inter-monomères des lignines en fonction des espèces végétales (en pourcentage des liaisons totales analysées). **9**

Tableau 3 : Caractérisation au niveau de la masse moléculaire et composition de deux types de lignines industrielles différentes (adaptée de El Mansouri and Salvadó, 2006). **18**

Tableau 4 : Molécules aromatiques issues de la bioconversion de la lignine et leurs applications. **21**

Tableau 5 : Enzymes accessoires, favorisant la dégradation de la lignine. **31**

Tableau 6 : Enzymes des voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques. **35**

Tableau 7 : Enzymes des voies cataboliques périphériques des monomères aromatiques. **37**

Tableau 8 : Enzymes des voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques, avec en gras les dioxygénases. **39**

Tableau 9 : Champignons ligninolytiques et leurs substrats. **42**

Tableau 10 : Enzymes surexprimées identifiées par des analyses « Omics ». **47**

Tableau 11 : Gènes codant pour des enzymes d'intérêt chez *TX* (adaptée de Meline *et al.,* en préparation) **51**

Tableau 12 : Gènes codant pour des oxydoréductases d'intérêt chez *TX* (adaptée de Meline *et al.,* en préparation) **51**

Tableau 13 : Composition macro-minéraux, vitamines et en traces minérales du milieu de culture. **58**

Tableau 14 : Composition des solutions pour l'analyse des protéines par électrophorèse SDS-Page **69**

Tableau 15 : Présentation des génotypes des bactéries d'amplification et d'expression. **72**

Tableau 16 : Amorces utilisés pour le clonage de Txyl-3231. ..... **73**

Tableau 17 : Teneurs en lignines et en sucres des substrats lignifiés (% de matière sèche). ... **81**

Tableau 18 : Composition en acides phénoliques liés en éthers et esters (µg.g^{-1} de matière sèche). **82**

Tableau 19 : Potentiels en lignines et acides phénoliques (µg.50 mg^{-1} matière sèche) **83**

Tableau 20 : Comparaison des paramètres de croissance de *TX* sur les différents substrats lignifiés sans complémentation en xylane (0 %) ou avec complémentation en xylane (20 % et 50 %). **85**

Tableau 21 : Attribution des différentes bandes d'absorption. **101**

Tableau 22 : Analyse RMN-2D des résidus de la PB et de la PBEV **106**

Tableau 23 : RMN du phosphore des résidus de LK avec et sans croissance (µmol.mg^{-1}). **109**

Tableau 24 : Sucres présents dans les milieux de culture avec et sans croissance. **111**

Tableau 25 : Phénols totaux présents dans les milieux de cultures avec et sans croissance. . **115**

Tableau 26 : Acides phénoliques présents dans les milieux de culture avec et sans croissance. **115**

Tableau 27 : Analyse globale des protéines exprimées en fonction des substrats : nombre de protéines exprimées (Nb) et pourcentage (%) de protéines intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC). **116**

Tableau 28 : Identification des oxydoréductases et hémicellulases intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC) communes à l'ensemble des substrats. **118**

Tableau 29 : Identification des oxydoréductases et des hémicellulases intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC) exprimées uniquement sur les substrats riches en lignine **121**

Tableau 30 : Nombre de protéines IC et EC sur-exprimées et sous-exprimées, (% de sur-expressions des protéines (%) sur l'ensemble des substrats lignifiés par rapport au xylane). **123**

Tableau 31 : Expression des oxydoréductases et des hémicellulases en présence de substrats riches en lignine par rapport au xylane (Témoin). Un niveau d'expression >1 traduit une sur-expression par rapport au xylane alors qu'un niveau <1 montre une sous-expression. **124**

Abréviations

AA : Activité auxiliaire

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ACP : Analyse en composante principale

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADEME : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie

ANOVA : Analysis of variance

ARN : Acide ribonucléique

BSA : Bovine serum albumine

CAZY : Carbohydrate-Active enZYmes

CE : Carbohydrate estérase

CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance

CP : Composante principale

Di-FA : Acide di-férulique

DTT : Dithiothréitol

DyP : Peroxydase décolorante

EC : Extracellulaire

EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique

Ei : Etalon interne

FA : Acide férulique

FI : Fraction insoluble

FS : Fraction soluble

FT : Fraction totale

GH : Glycoside hydrolase

HBT : Hydroxybenzotriazole

HPAE-PAD : High-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection

HPLC : High-performance liquid chromatography

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

IC : Intracellulaire

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LB : Luria-Bertani

LCC : lignin-carbohydrate complex

LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry

LiP : Lignine peroxydase

LK : Lignine Kraft

MB : Milieu de base

Mn : Masses moléculaires moyens en nombre

MnP : Manganèse peroxydase

MS : Matière sèche

Mw : Masses moléculaires moyens en masse

Mw/Mn : Polydispersité

OH A : Aliphatique

OH S : Syringyle

OH G : Guaiacyle

OH H : p-Hyroxyphényle.

PB : Paille de blé

PBEV : Paille de blé explosé à la vapeur

PCR : polymerase chain reaction

***p*CA :** Acide *p*-coumarique

***p*HA :** Acide *p*-hydroxybenzoïque

***p*H :** *p*-Hydroxybenzaldhéyde

POX : Phénol-oxydase

PYGL : Pyrogallol

RMN : Résonance magnétique nucléaire

S : Syringaldéhyde

SA : Acide syringique

SDS-Page : Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

TCD : Thermal Conductivity Detector

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

***TX* :** *Thermobacillus xylanilyticus*

VA : Acide vanillique

V : Vanilline

VP : Versatile peroxydase

Introduction

Les réserves de combustibles fossiles qui s'épuisent et le réchauffement climatique qui devient de plus en plus concret, nous amènent à concevoir des alternatives à l'exploitation de ressources non renouvelables comme le pétrole. C'est pourquoi, il est aujourd'hui essentiel d'accroître la part des produits issus de la bioraffinerie (Octave and Thomas, 2009). Le concept de la bioraffinerie est basé sur l'utilisation du carbone issu de la biomasse végétale pour remplacer le carbone fossile dans un contexte de bioéconomie (Kamm and Kamm, 2004). Les principaux bioproduits issus de la bioraffinerie sont la bioénergie (biocarburant…), les molécules biosourcées et les biomatériaux (Cherubini, 2010). A long terme, les bioraffineries devront apporter la plus large gamme de bioproduits commercialisables de manière durable, tout en restant compétitif en termes de coûts et de performances par rapport aux produits équivalents dérivés du pétrole (Ragauskas *et al.*, 2006). En France, l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie), a financé 13 projets de valorisation pour la production de bioénergies, 23 projets pour les biomatériaux et 27 projets pour les molécules biosourcées entre 2008 et 2015 (ADEME, 2017).

La biomasse végétale est produite à partir du CO_2 atmosphérique, de l'eau et de la lumière du soleil par photosynthèse biologique (Fernando *et al.*, 2006). Elle est considérée comme une source durable de carbone organique sur terre en raison de ses propriétés écologiques telles que le caractère renouvelable, la biocompatibilité et la biodégradabilité. La biomasse lignocellulosique présente des avantages importants, car elle constitue la partie non comestible de la plante et n'interfère donc pas avec l'approvisionnement alimentaire (Isikgor and Becer, 2015). Elle peut provenir de l'agriculture (co-produits agricoles ou cultures dédiées à fort rendement en biomasse), de la foresterie et industries associées (Cherubini, 2010; De Bhowmick *et al.*, 2018). Les usages industriels de la biomasse lignocellulosique concernent plusieurs secteurs comme le papier, l'énergie (chauffage), le textile ou la construction. De plus, les coproduits de l'agriculture comme la paille de blé sont traditionnellement utilisés comme apport organique dans les sols ou encore dans l'alimentation animale.

A l'heure actuelle, un des enjeux majeurs pour la bioraffinerie est donc une meilleure valorisation de la biomasse lignocellulosique. En effet, les procédés actuels (industrie papetière ou biocarburants de deuxième génération) privilégient l'utilisation des parties polysaccharidiques de la biomasse et la lignine est considérée comme un co-produit (Naik *et al.*, 2010). La lignine est brûlée comme combustible pour alimenter les usines à papier (Taherzadeh and Karimi, 2008; Tuck *et al.*, 2012). Néanmoins, la valorisation des lignocelluloses *via* la bioraffinerie, représente

des opportunités importantes, notamment par l'exploitation des co-produits issus des différentes industries alimentaires, agricoles ou forestières (Kaparaju *et al.*, 2009; Clark, 2017). Cette sous-utilisation est en grande partie due à la difficulté de dégrader ou dépolymériser la lignine (Li *et al.*, 2016). La lignine est l'un des composants naturels les plus abondants sur terre et c'est la première source renouvelable en composés aromatiques, ce qui représente un potentiel important de valorisation en une large gamme de molécules (Bruijnincx *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2019). L'amplification des recherches menées cette dernière décennie, montre l'engagement de la communauté scientifique pour une meilleure utilisation de la biomasse et en particulier la lignine au sein des bioraffineries (Ragauskas *et al.*, 2014).

C'est dans le contexte général de valorisation de la biomasse lignocellulosique que s'inscrit mon sujet de thèse, dans le cadre du projet LIGNOFRAC, dont l'objectif est d'évaluer le potentiel enzymatique d'une bactérie thermophile pour la dépolymérisation de la lignine en molécules aromatiques.

Etat de l'art

I : La lignine, un composant majeur de la biomasse lignocellulosique

I.1. La complexité de la biomasse lignocellulosique

Les parois végétales sont le principal composant de la biomasse lignocellulosique et présentent trois couches : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. La lamelle moyenne, située à l'interface des parois primaires de cellules adjacentes, permet d'assurer la cohésion entre les cellules végétales. La lamelle moyenne et la paroi primaire, de faible épaisseur, sont les premières couches pariétales formées lors de la division et la croissance des cellules. La paroi secondaire formée sur la face interne de la paroi primaire, est constituée de cellulose, hémicelluloses (polymères glucidiques) et lignines (polymère phénolique) (Pauly and Keegstra, 2010).

Les parois lignocellulosiques sont essentiellement représentées par la paroi secondaire dont la structure comporte différentes couches concentriques (S1, S2, S3) composées d'une armature de microfibrilles de cellulose enrobées d'une matrice constituée d'hémicelluloses et de lignines. Les microfibrilles sont disposées parallèlement les unes aux autres en formant un angle par rapport à l'axe de la cellule ; cet angle varie selon les strates S1, S2 et S3. La **Figure 1** montre l'organisation de la paroi lignocellulosique d'une cellule végétale (A) l'évolution de sa composition en fonction des couches pariétales (lamelle moyenne, paroi primaire, paroi secondaire) (B) et l'arrangement spatial des polymères constitutifs (C). Par ailleurs, la composition chimique des parois végétales varie en fonction de l'origine botanique (**Tableau 1**).

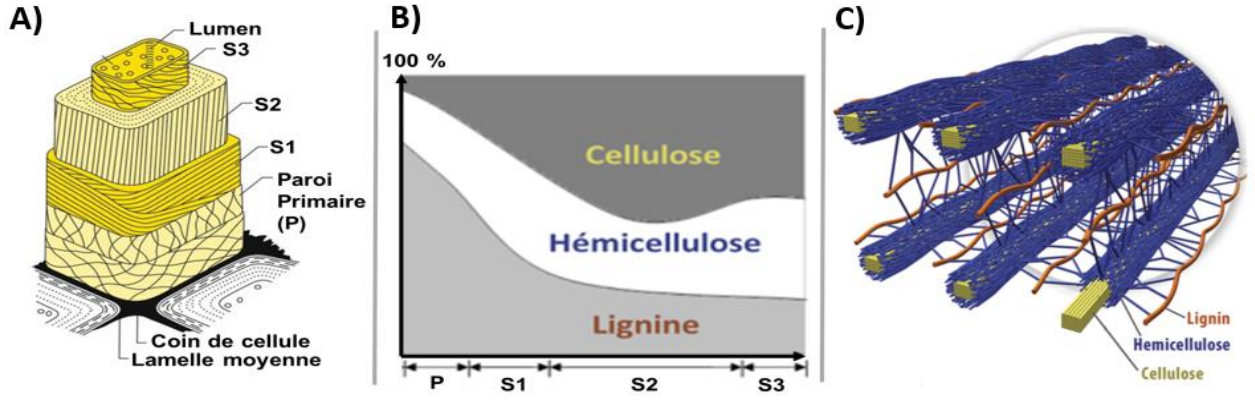


Figure 1 : A) Paroi d'une cellule végétale (adaptée de Agarwal, 2006). B) Répartition des constituants de la paroi en fonction des couches pariétales (adaptée Brandt *et al.,* 2013). C) Arrangement spatial des constituants dans la paroi (adaptée Rakotovelo, 2017).

Tableau 1 : Composition paroi chez différentes plantes (adaptée de Galkin and Samec, 2016).

	Monocotylédones (Graminées)	**Dicotylédones (Feuillus)**	**Gymnospermes (Résineux)**
Cellulose	25-50 %	40-55 %	45-50 %
Hémicellulose	25-50 %	25-40 %	25-35 %
Lignine	10-25 %	15-25 %	25-35 %

I.1.1. La cellulose

Le principal constituant de la biomasse lignocellulosique est la cellulose qui est estimée représenter environ la moitié du carbone organique de l'ensemble de la biosphère (Zhou *et al.*, 2011). C'est un polysaccharide constitué uniquement d'unités D-glucose liés en β-1,4 par liaison glycosidique. La configuration β des unités glucoses confère une conformation linéaire à la chaîne de glucane, ce qui permet l'établissement de nombreuses liaisons hydrogène entre les groupes OH des chaînes de glucanes qui s'associent entre elles pour former des plans en feuillets (Pérez and Mazeau, 2004; Cosgrove, 2005). La structure de la cellulose est donc constituée d'un vaste réseau de liaisons, qui relient étroitement ces unités, avec notamment pour chaque unité de glucose, deux liaisons hydrogène intramoléculaires et une liaison hydrogène intermoléculaire avec une molécule de glucose voisine dans le même plan (**Figure 2**). Les feuillets interagissent entre eux par l'intermédiaire d'interactions de Van der Waals pour former des microfibrilles. L'existence de zones ordonnées (cristallines) et d'autres moins ordonnées (amorphes) au niveau des microfibrilles confèrent à la cellulose un caractère semi-cristallin et fibrillaire (Somerville, 2006; Nishiyama, 2009; Fernandes *et al.*, 2011).

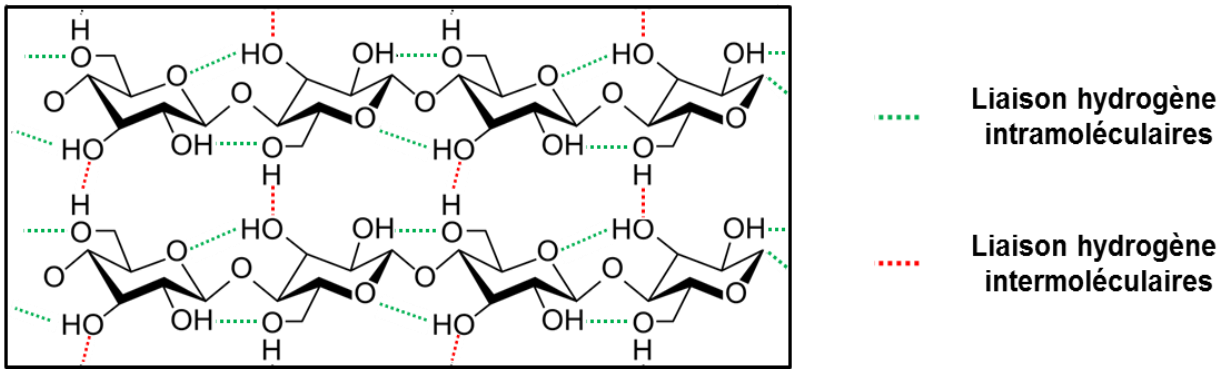


Figure 2 : Structure de la cellulose (adaptée de Brandt *et al.*, 2013).

I.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont un groupe hétérogène de polysaccharides constitués de différents oses reliés par des liaisons osidiques β-1,4 : des pentoses (xylose, arabinose) ou des hexoses (mannose, glucose, galactose, rhamnose et fucose). Ces polymères peuvent être greffés et/ou ramifiés par des acides uroniques (acide glucuronique), des groupements acétyles ou d'autres oses, grâce à d'autres types de liaisons (osidiques ou esters; **Figure 3A**). Les hémicelluloses présentent des structures hétérogènes selon l'espèce végétale, le type cellulaire ou les strates pariétales (Scheller and Ulvskov, 2010).

Les principaux types d'hémicelluloses des parois secondaires sont les xylanes (glucurono-(arabino)-xylane) et les mannanes (glucomannane, galactomannane et galactoglucomannane). Les hémicelluloses majoritaires chez les monocotylédones et les dicotylédones sont des xylanes constitués d'un squelette de résidus de xylose liés par des liaisons osidiques β-1,4. Les glucurono-(arabino)-xylanes comportent des substituants constitués par l'acide glucuronique (potentiellement estérifié par un groupement O-méthyle) ou l'arabinose (liés par des liaisons osidiques α-1,2 ou 1,3). Chez certaines espèces de monocotylédones comme les graminées, les résidus arabinoses sont substitués par des esters d'acide férulique ou d'acide *p*-coumarique (**Figure 3B**; Eronen *et al.*, 2011; Lapierre *et al.*, 2018). Par exemple, la paille de blé renferme deux fois plus d'acide *p*-coumarique (5,7 $mg.g^{-1}$) que d'acide férulique (3,2 $mg.g^{-1}$) liés en esters (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Del Río *et al.*, 2012).

Les mannanes sont les hémicelluloses majoritaires des gymnospermes. Ces mannanes ont un squelette de résidus de mannose liés par des liaisons osidiques en position β-1,4. Dans le cas des glucomannanes, la chaine principale peut contenir des résidus glucose ou mannose distribués de manière aléatoire alors que les galactomannanes et les galactoglucomannanes ont des chaines latérales constituées de résidus galactoses (**Figure 3B**; Scheller and Ulvskov, 2010).

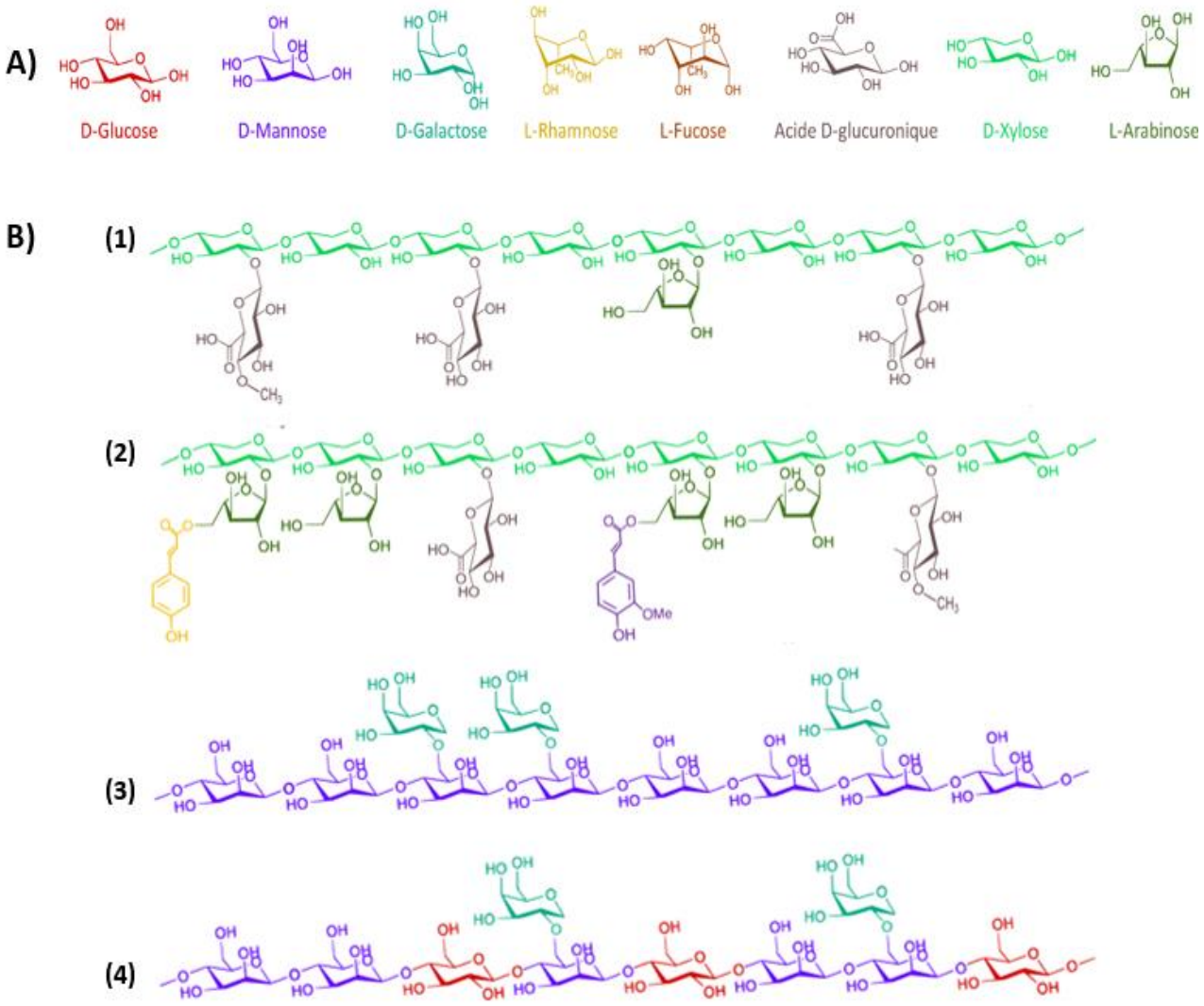


Figure 3 : A) Oses constitutifs des hémicellulsoes (adaptée de Brandt *et al.*, 2013). B) Structures de différentes hémicelluloses : (1) glucuronoxylane, (2) glucuronoarabinoxylane, (3) galactomannane et (4) galactoglucomannane (adaptée de Scheller and Ulvskov, 2010).

I.1.3. La lignine

La lignine est un polymère phénolique, dont les principaux monomères sont les unités 4-hydroxyphénylpropanoïdes (monolignols) ; ces unités diffèrent par le degré de méthoxylation du cycle aromatique : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (**Figure 4A**). La polymérisation de ces monomères dans la paroi cellulaire résulte de réactions de couplages covalents entre un monolignol et la lignine en croissance ou entre deux oligomères de lignine déjà formés. Cette polymérisation est une réaction de déshydrogénation où les monomères sont oxydés par des enzymes oxydantes (peroxydases et/ou laccases) en radicaux phénoxyles très réactifs dont le couplage aléatoire conduit à la formation d'une grande variété de liaisons intramonomères (Tobimatsu and Schuetz, 2019).

Une fois incorporés dans le polymère de lignine, les 3 monolignols principaux donnent les motifs suivants : *p*-hydroxyphényle (H), guaïacyle (G) et syringyle (S), qui représentent les unités principales de la lignine (Vanholme *et al.*, 2010). Les unités d'acide *p*-coumarique (*p*C) et d'acide férulique (F) sont associées par des liaisons ester ou éther dans la lignine de graminée comme la paille de blé. L'acide *p*-coumarique est principalement associé en ester au carbone terminal de la chaîne propyle (Cγ). Chez certaines dicotylédones, comme le peuplier, les unités de lignines sont estérifiées par l'acide *p*-hydroxybenzoïque (*p*H) (**Figure 4B**; Lu *et al.*, 2004; Ralph, 2010).

La composition en monomères des lignines varie selon l'origine botanique. Les lignines d'espèces dicotylédones se composent principalement d'unités G et S, tandis que les lignines de gymnospermes se composent principalement d'unités G avec une faible teneur en unités H. Les lignines des graminées incorporent des unités G et S à des niveaux comparables, et sont plus riches en unités H que les dicotylédones (Boerjan *et al.*, 2003a). Par exemple la paille de blé, possède 5 % d'unité H, 65 % d'unité G et 30 % d'unité S (Del Río *et al.*, 2012).

Le couplage aléatoire des différentes unités conduit à une grande diversité de liaisons inter-monomères (Vanholme *et al.*, 2012). Ces liaisons sont de type éther (β-aryl éther [β-O-4] ou biphenyl éther [4-O-5]), carbone-carbone (Spirodiènone [β-1) ou des liaisons mixtes (Phenylcoumarane [β-5 (α-O-4)], résinol [β-β (γ-O-α)] ou dibenzodioxocine [5-5/β-O-4 (α-O-4)]) dont les proportions varient selon les espèces végétales (**Figure 4C**; Ralph *et al.*, 2019). La proportion en liaisons intermonomères de type β-aryl éther [β-O-4] est plus importante dans les lignines de graminées par rapport aux lignines de feuillus ou de résineux (**Tableau 2**). Les compositions des lignines sont donc très diverses, ce qui conduit à une complexité chimique variable en fonction des espèces végétales (**Figure 4D**).

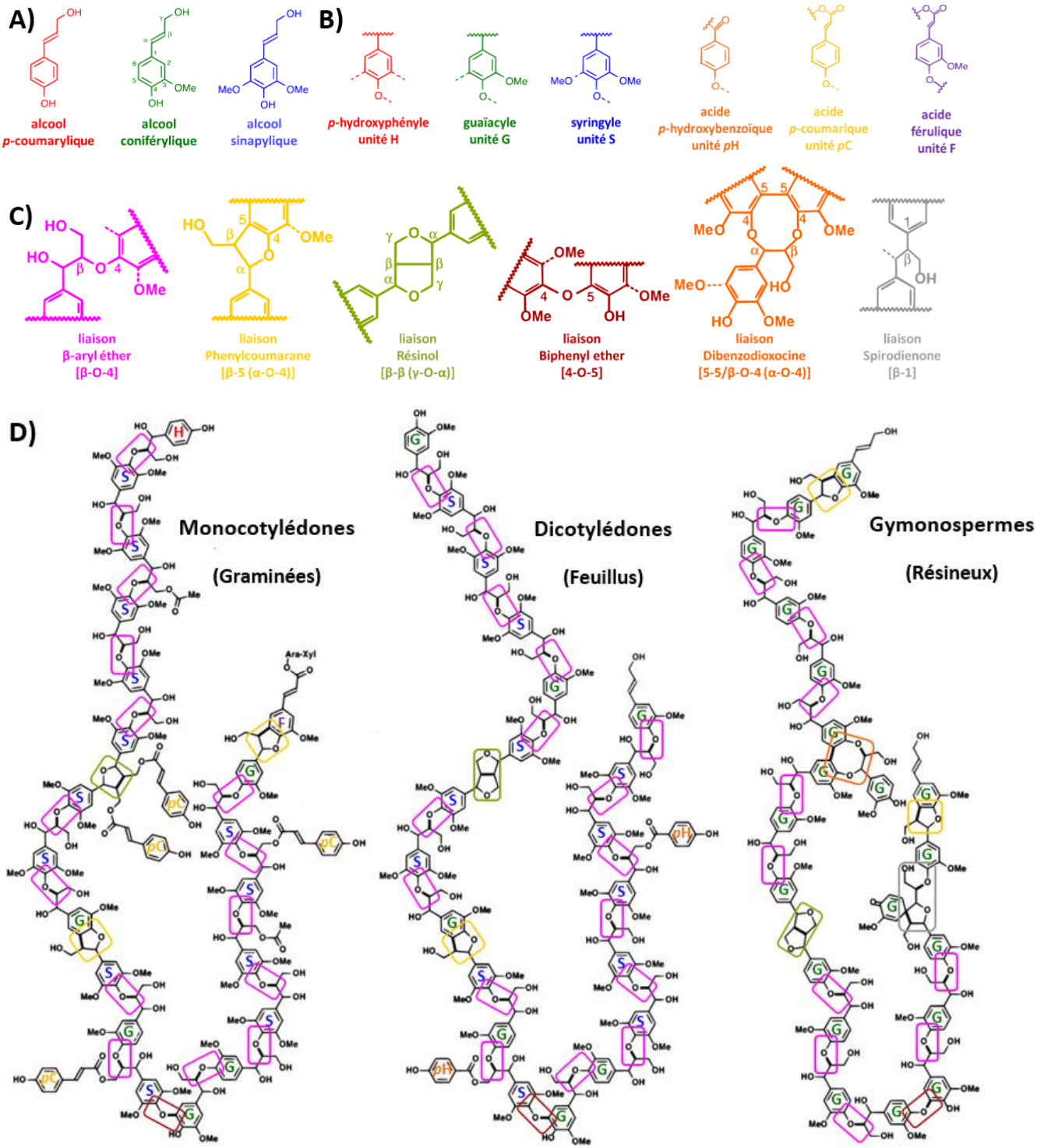


Figure 4 : A) Principaux monolignols présents dans la lignine. B) Principales unités présentes dans la lignine. C) Principales liaisons présentes dans la lignine. D) Structure de la lignine chez différentes espèces végétales (adaptée de Ralph *et al.*, 2004a; Mansfield *et al.*, 2012; Ralph *et al.*, 2019).

Tableau 2 : Variation des proportions en liaisons inter-monomères des lignines en fonction des espèces végétales (en pourcentage des liaisons totales analysées).

	Monocotylédones (Graminées)	**Dicotylédones (Feuillus)**	**Gymnospermes (Résineux)**
β-aryl ether [β-O-4]	75-85 %	60 %	40-50 %
Phenylcoumaran [β-5 (α-O-4)]	5-15 %	6 %	9-12 %
Resinol [β-β (γ-O-4)]	2-5 %	3-12 %	2-6 %
Biphenyl ether [4-O-5]	0 %	4 %	4-8 %
Dibenzodioxocin [5–5/β-O-4 (α-O-4)]	0-3 %	5-10 %	25-25 %
Spirodienone [β-1]	3 %	1-2 %	7-10 %
Références	(Del Río *et al.*, 2012; Del Río *et al.*, 2015)	(Shuai *et al.*, 2016)	(Chakar and Ragauskas, 2004)

I.2. Les différentes liaisons entre les polymères pariétaux

Les polymères de la biomasse lignocellulosique interagissent entre eux de façon covalente ou non au niveau des parois. Au niveau de la paroi secondaire, ces liaisons conduisent à la formation d'un réseau tridimensionnel complexe, composé d'une matrice amorphe hémicellulose-lignine enrobant les microfibrilles de cellulose. Cette organisation confère une résistance structurelle à la biomasse lignocellulosique (Brandt *et al.*, 2013).

I.2.1. Les liaisons entre la cellulose et les hémicelluloses

Les structures des polysaccharides présents dans les parois de la biomasse lignocellulosique sont très proches (unités constitutives et liaisons impliquées), ce qui permet de multiples possibilités de liaisons non covalentes entre ces polymères. Les hémicelluloses interagissent de façon non covalente avec les microfibrilles de cellulose. La présence de substituants sur la chaîne principale hémicellulosique confère un arrangement moléculaire facilitant l'établissement de ces liaisons entre hémicelluloses et résidus de glucose situés en surface des microfibrilles (Somerville *et al.*, 2004; Somerville, 2006; Scheller and Ulvskov, 2010). Ces interactions entre hémicelluloses et cellulose via des liaisons hydrogène sont liées à deux mécanismes intervenant pendant la formation des parois : i) association de l'hémicellulose

pendant la formation de la microfibrille juste après la synthèse des chaînes de glucane, ii) formation de liaisons entre des chaînes hémicellulosiques associées à des microfibrilles contribuant ainsi au renforcement de la paroi (Cosgrove and Jarvis, 2012; Busse-Wicher *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Cosgrove, 2014). En particulier, dans le cas des parois de graminées, les arabinoxylanes peuvent établir des liaisons inter ou intra-chaînes de type covalent via des pontages impliquant des dimères, trimères ou tétramères d'acides féruliques estérifiés aux arabinoses (**Figure 5**; Saulnier *et al.*, 1999; Funk *et al.*, 2005; Bunzel *et al.*, 2005; Bunzel *et al.*, 2006; Lapierre *et al.*, 2019).

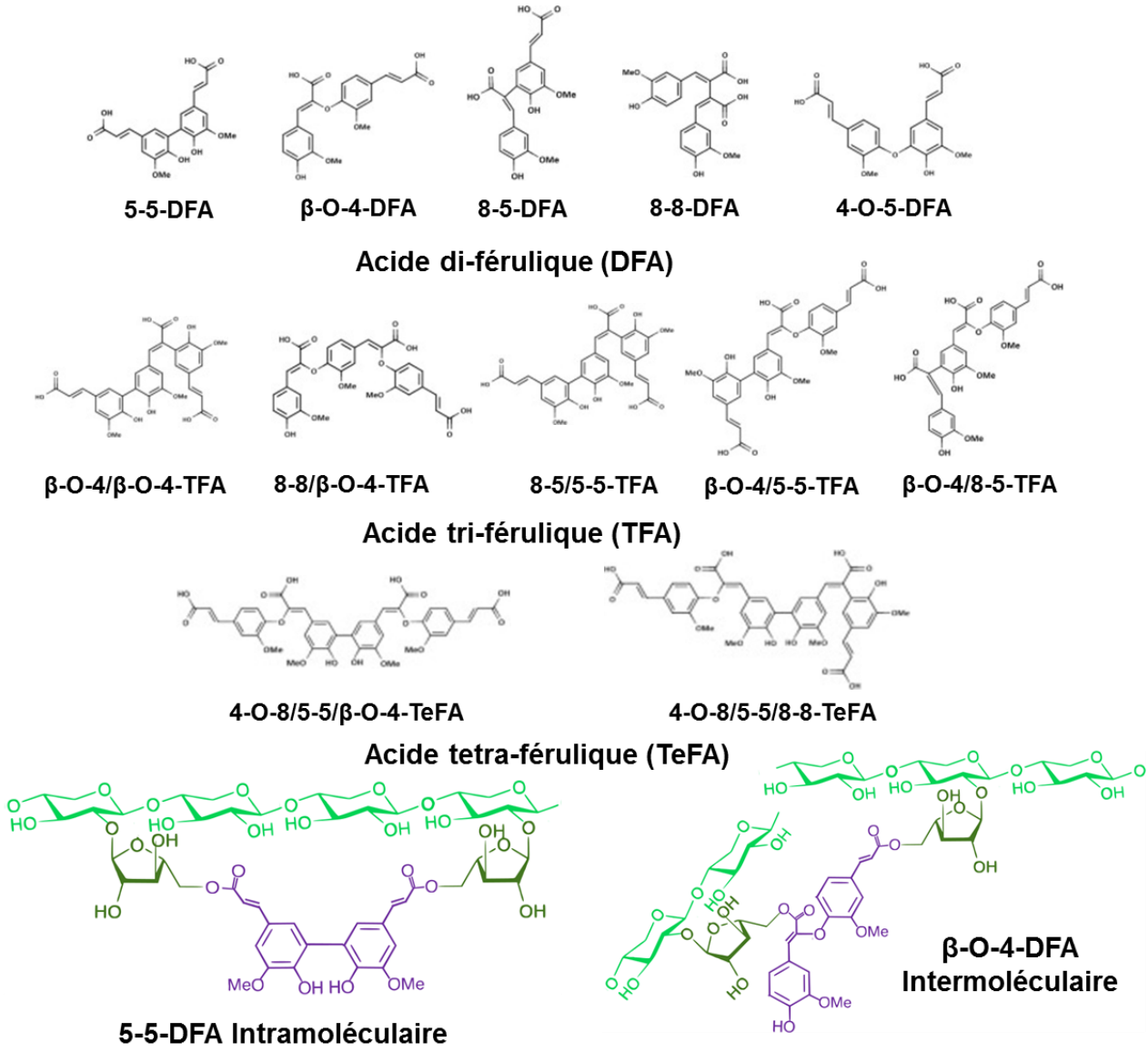


Figure 5 : Représentation des dimères, trimères et tétramères d'acide férulique, ainsi que des pontages inter et intramoléculaires entre des arabinoxylanes (adaptée de Bento-Silva *et al.*, 2018).

I.2.2. Les liaisons entre la lignine et les polysaccharides

Les hémicelluloses peuvent s'associer avec la lignine par de nombreuses liaisons non covalentes, mais aussi covalentes. Des interactions covalentes seraient formées lors de la polymérisation déshydrogénative des monolignols, impliquant la formation de radicaux phénoxyles très réactifs (Ralph, Lundquist, *et al.*, 2004; Bunzel *et al.*, 2008; Mottiar *et al.*, 2016). L'ensemble de ces liaisons forment des complexes lignines-carbohydrates (LCC pour « lignin-carbohydrate complex »). Les principales liaisons covalentes lignine–hémicellulose sont de type éther-benzylique, γ-esters, γ-esters conjugués, phényle-glycoside ou encore des liaisons impliquant les esters d'acides di-féruliques liés avec l'arabinoxylane chez les graminées (**Figure 6**; Ralph *et al.*, 2004; Lawoko *et al.*, 2005; Balakshin *et al.*, 2011). L'acide férulique (FA) est principalement estérifié avec les arabinoxylanes des hémicelluloses, et étherifié avec les unités G de la lignine (**Figure 7**), ce qui permet de fixer de façon covalente les carbohydrates avec la lignine (Ralph, 2010; Lapierre *et al.*, 2019). L'acide *p*-coumarique (*p*CA) est principalement estérifié en position γ des chaînes latérales des unités S de la lignine et ne serait pas impliqué dans la réticulation de la lignine et des hémicelluloses. C'est pourquoi les *p*CA dans les parois de graminées sont principalement associés à la fraction de lignine (Santiago *et al.*, 2013). L'architecture de la paroi secondaire repose donc sur un édifice complexe où les hémicelluloses interagissent de façon non covalente avec les microfibrilles de cellulose et forment un réseau avec la lignine via des liaisons covalentes et non covalentes, conférant ainsi une rigidité accrue des parois cellulaires et une résistance de la biomasse lignocellulosique à la digestion enzymatique (Eronen *et al.*, 2011; Isikgor and Becer, 2015).

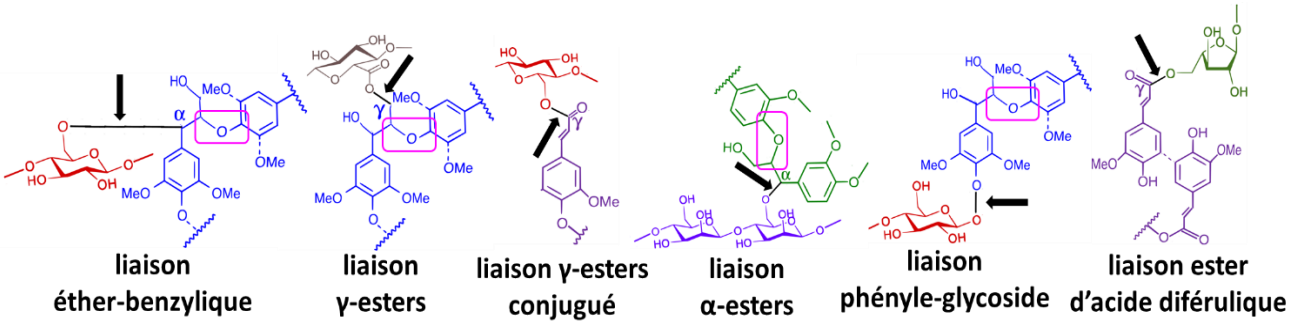
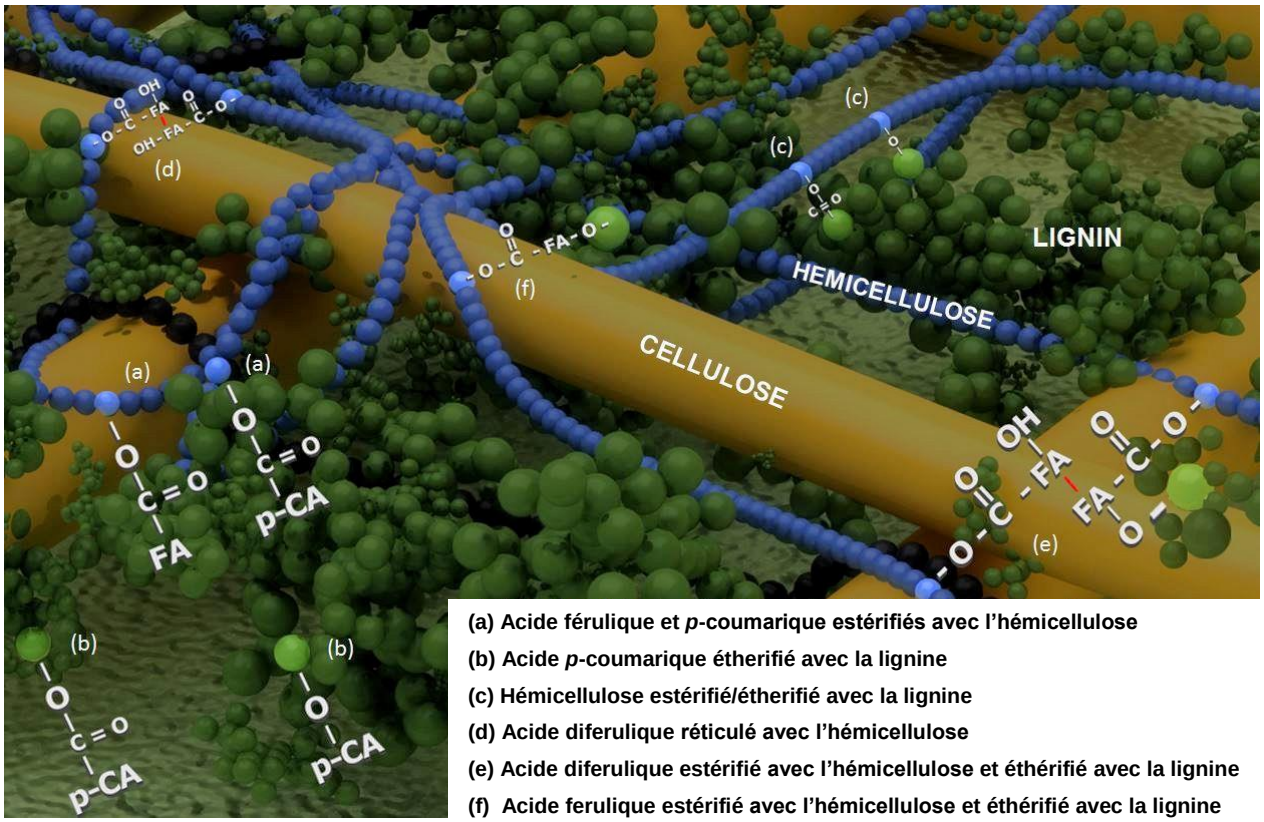


Figure 6 : Liaisons covalentes associées aux complexes lignines-carbohydrates. Les liaisons sont illustrées par les flèches noires (adaptée de Balakshin *et al.*, 2011; Nishimura *et al.*, 2018).



(a) Acide férulique et *p*-coumarique estérifiés avec l'hémicellulose
(b) Acide *p*-coumarique étherifié avec la lignine
(c) Hémicellulose estérifié/étherifié avec la lignine
(d) Acide diferulique réticulé avec l'hémicellulose
(e) Acide diferulique estérifié avec l'hémicellulose et éthérifié avec la lignine
(f) Acide ferulique estérifié avec l'hémicellulose et éthérifié avec la lignine

Figure 7 : Représentation de la structure de la paroi cellulaire secondaire chez les graminées (adaptée de Santiago *et al.*, 2013).

I.3. La récalcitrance naturelle de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique, par sa structure complexe et son hétérogénéité, est naturellement résistante à la dégradation en particulier biologique. Cette résistance est souvent désignée par le terme « récalcitrance » (**Figure 8**; Studer *et al.*, 2011). La récalcitrance correspond à l'ensemble des caractéristiques de la biomasse qui limitent la conversion enzymatique des lignocelluloses dans les procédés de bioraffinerie, ce qui augmente les coûts et la complexité des opérations de la bioraffinerie, et/ou restreint la récupération du carbone de la biomasse en produits ciblés d'intérêt (Himmel *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2012; McCann and Carpita, 2015).

Plusieurs facteurs limitent la dégradation biologique des biomasses lignocellulosiques. Au-delà des propriétés catalytiques intrinsèques aux protéines enzymatiques, l'action des catalyseurs biologiques comme les cellulases ou les hémicellulases est influencée par des facteurs structuraux liés à l'accessibilité du substrat au sein des tissus et cellules végétales, et du réseau

pariétal (surface accessible, porosité). En effet, l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique est améliorée par réduction de la taille des particules, qui entraîne une augmentation de la surface accessible (Grethlein, 1985; Wang *et al.*, 2013a). De plus, les parois lignifiées forment un réseau dense de polymères étroitement associés, qui limite la pénétration et la diffusion des protéines enzymatiques dans les nanopores de la paroi (Ding *et al.*, 2012).

La récalcitrance de la biomasse lignocellulosique est principalement associée à la lignine qui intervient à plusieurs niveaux structuraux et chimiques. Ce composé est associé aux hémicelluloses dans la matrice enrobant les microfibrilles de cellulose et constitue une barrière physique limitant l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes. Cette restriction est renforcée par l'existence des multiples liaisons existant entre les polymères des parois lignifiées, en particulier les complexes covalents LCC (Ralph *et al.*, 2004b; Boukari *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Dans le cas des graminées, le rôle négatif des acides phénoliques est ainsi en partie expliqué par les interactions intra- et inter-polymères impliquant surtout l'acide férulique qui réticule les hémicelluloses et les lignines (Li *et al.*, 2016). L'accessibilité du substrat est également restreinte par la formation d'interactions non spécifiques entre les enzymes et la lignine via des interactions hydrophobes rendant les protéines non disponibles pour l'hydrolyse enzymatique (Berlin *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2014).

Les lignines issues des procédés industriels de transformation de la biomasse ont tendance à se re-polymériser, ce qui se traduit par une augmentation du degré de condensation (liaisons C-C), augmentant ainsi son hydrophobicité et augmentant les interactions lignine-enzymes en formant des liaisons non productives (Berlin *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Vermaas *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Par ailleurs, du fait de sa structure phénolique hétérogène, la lignine est un substrat récalcitrant à la dégradation biologique (Akin, 2008). En effet, elle possède une grande variété d'unités monomériques aromatiques associées par des liaisons diverses et difficiles à rompre (Weng *et al.*, 2008; Linger *et al.*, 2014). De plus, les prétraitements physicochimiques utilisés pour améliorer la digestibilité enzymatique des lignocelluloses peuvent générer plusieurs co-produits inhibiteurs de croissance pour la fermentation, avec notamment les furfurals et les hydroxyméthylfurfurals issus de l'hémicellulose, ou certains aromatiques dérivés des lignines et des acides phénoliques susceptibles d'interagir de manière non spécifique et/ ou d'inhiber l'action catalytique des enzymes (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Klinke *et al.*, 2004; Boukari *et al.*, 2011; Ximenes *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2016; Jönsson and Martín, 2016).

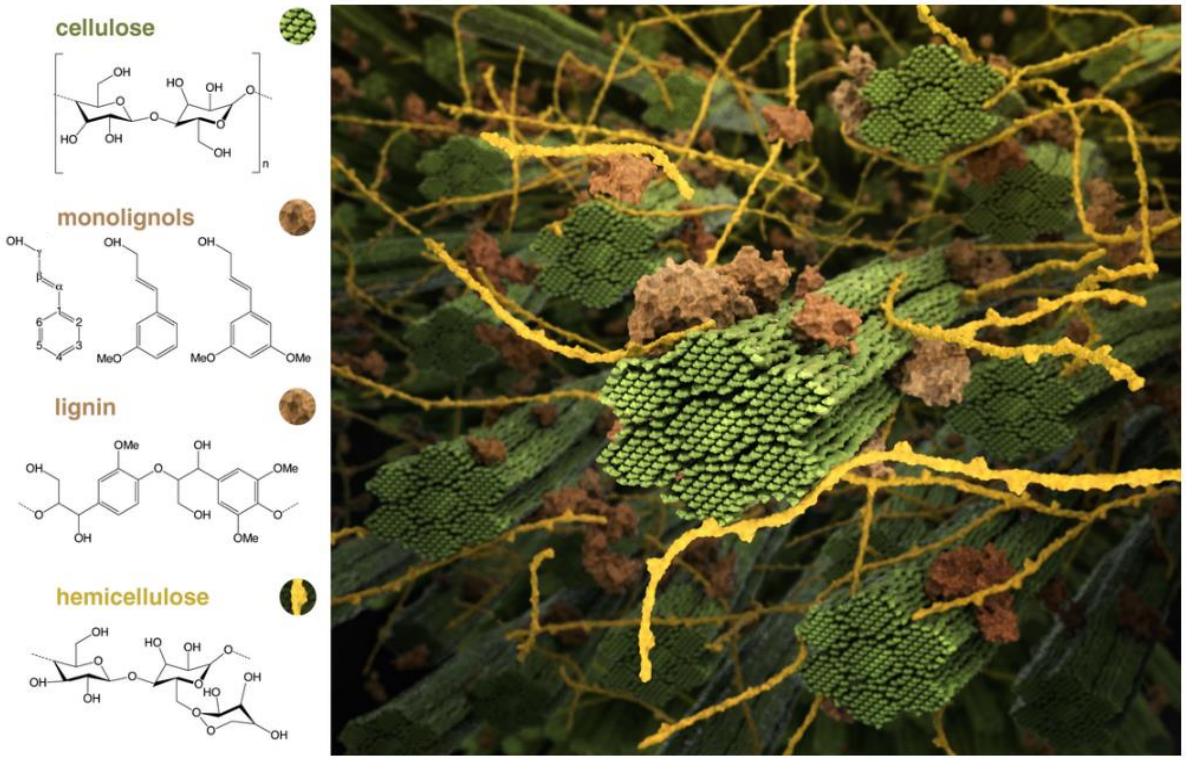


Figure 8 : Représentation de la structure complexe de la biomasse lignocellulosique (*https://cmb.ornl.gov/index.php/research/plant-cell-wall/structure-and-dynamics*; Consulté le 03/12/19).

II. Lignines industrielles et leurs valorisations

De nombreux procédés à l'échelle industrielle ou pilote sont mis en œuvre pour valoriser la biomasse lignocellulosique. Ces procédés consistent à extraire la lignine pour libérer les polysaccharides et faciliter leurs transformations. Cette lignine, longtemps considérée comme un déchet ou au mieux un coproduit, fait l'objet d'un intérêt croissant en tant que ressource alternative aux matières pétro-sourcées, pour la production non seulement d'énergie mais aussi de matériaux et de molécules phénoliques (Zakzeski *et al.*, 2010; Azadi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). Cet intérêt récent s'inscrit depuis une dizaine d'années dans le contexte de la bioraffinerie, pour la production de bioéthanol et s'étend également aux co-produits de l'industrie papetière (Ragauskas *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018). Actuellement, les lignines industrielles ou « techniques » proviennent majoritairement de l'industrie papetière, les unités de production de bioéthanol sont généralement au stade pilote (Rocha *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015; Tribot *et al.*, 2019).

II.1. Les lignines techniques

II.1.1. Lignines isolées issues de l'industrie papetière

Actuellement, l'utilisation de la cellulose est prédominante dans la fabrication des textiles et du papier (Zhou *et al.*, 2011). C'est pourquoi, les lignines isolées correspondent aux fractions obtenues par des procédés non sélectifs, dont l'objectif est d'éliminer le maximum de lignine de la biomasse lignocellulosique (Vishtal and Kraslawski, 2011). Ces coproduits industriels sont principalement issus des papeteries (papiers et pâtes à papier; Hu *et al.*, 2018). Les procédés de délignification sont : le procédé kraft actuellement majoritaire (90 %), le procédé lignosulfonate (5 %), le procédé à la soude ou encore le procédé organosolv (Chakar and Ragauskas, 2004; Li and Takkellapati, 2018; Schutyser *et al.*, 2018). Le marché des lignines issues de l'industrie papetière représente actuellement le plus gros marché des lignines disponibles, avec 130 millions de tonnes par an, rien que pour la lignine kraft (De Wild *et al.*, 2014; Tribot *et al.*, 2019). Ces coproduits sont le plus souvent valorisés uniquement par combustion pour la production d'énergie dans les papeteries et seuls les 2% restants sont répartis sur l'ensemble des autres voies de valorisation (Davis *et al.*, 2016; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2019). Or, dans le cas des bioraffineries en développement, moins de 50% de la quantité de lignine co-produite serait nécessaire pour alimenter en énergie le procédé, ce qui permettrait d'accroitre la lignine disponible pour de nouveaux usages (Ragauskas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, les lignines techniques ont une structure très variable selon l'espèce et le lieu de production, la méthode de délignification et la sévérité du traitement (Li and Takkellapati, 2018; Schutyser *et al.*, 2018). De plus, l'extraction des lignines s'accompagne généralement d'une modification structurale de la lignine native, notamment par la dépolymérisation mais également la formation de nouvelles liaisons C-C liées à des réactions de repolymérisation/condensation (Anderson *et al.*, 2017; Schutyser *et al.*, 2018).

L'utilisation du procédé kraft est aujourd'hui prépondérante dans l'industrie papetière et consiste à traiter la biomasse végétale avec une solution concentrée d'hydroxyde de sodium et de sulfure de sodium, pendant quelques heures à 170°C (Gierer, 1980). La présence de sulfure qui est un agent nucléophile puissant, permet de faciliter la décomposition des hémicelluloses et de la lignine en fragments solubles. Cette cuisson papetière produit des fibres cellulosiques en générant un volume considérable d'effluents, également appelés « liqueur noire » qui contient des hémicelluloses et la lignine (Chakar and Ragauskas, 2004). La lignine dissoute dans ces liqueurs peut être précipitée par acidification avec un acide fort (Asina *et al.*, 2017). Les lignines kraft renferment du soufre (1 à 3 % en masse), ce qui peut limiter les applications ultérieures. La

combustion de la lignine contenant du soufre produit des oxydes de soufre, et nécessite une purification coûteuse de l'air.

Du point de vue de la structure chimique, la lignine kraft est fortement modifiée par rapport à la lignine naturelle. Différentes réactions et modifications de structure de la lignine ont lieu durant le procédé kraft. Les principales réactions de dépolymérisation de la lignine résultent de la rupture des liaisons β-aryle éther, (**Figure 9A**). Ces réactions entraînent la formation de radicaux phénoxyles ou formes anioniques réactives qui vont se réassocier, induisant une recondensation/réticulation de la lignine (**Figure 9B**). Les liaisons carbone-carbone, plus stables énergétiquement, sont plus résistantes au procédé kraft (Chakar and Ragauskas, 2004; Asina *et al.*, 2017).

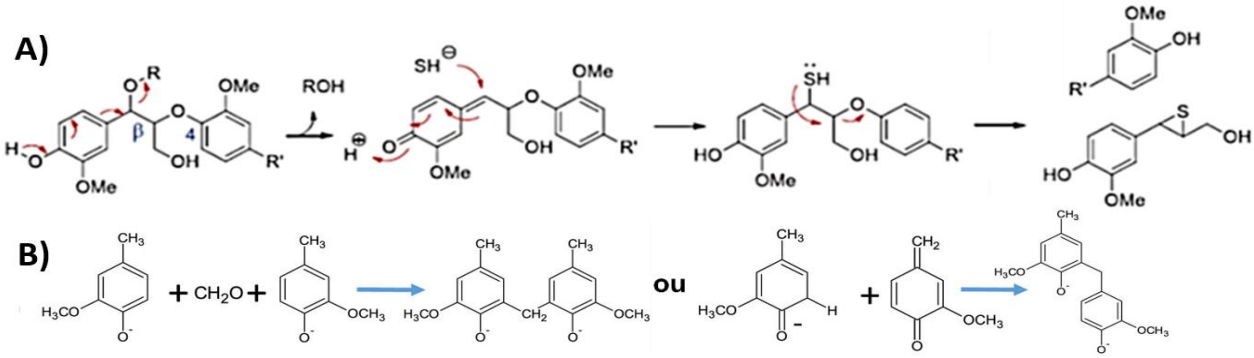


Figure 9 : Réactions de modifications des structures de la lignine pendant le procédé kraft. A) Réactions des structures β-aryle éthers (adaptée de Li and Takkellapati, 2018). B) Réactions de recondensation (adaptée de Asina *et al.*, 2017).

II.1.2. Les lignines de bioraffinerie des lignocelluloses

Les lignines prétraitées ou fractionnées, correspondent à des coproduits de procédés de prétraitement de la biomasse lignocellulosique, ayant pour objectif de lever la récalcitrance et de faciliter l'hydrolyse enzymatique des glucides pour la production de biocarburants par fermentation (Sun *et al.*, 2018a). L'efficacité du prétraitement dépend de la réduction de la taille des particules de biomasse et de la formation limitée de produits de dégradation, empêchant la croissance des micro-organismes fermentaires (De Bhowmick *et al.*, 2018). Ces prétraitements permettent la rupture des liaisons interpolymères pour séparer la lignine des glucides. Cette dissociation repose le plus souvent sur la dépolymérisation de la lignine native en fractions plus petites facilitant sa solubilisation et son extraction (Chen *et al.*, 2017). Ces prétraitements peuvent être physique, chimique, biologique ou encore une combinaison de plusieurs procédés (Mosier *et al.*, 2005; Alvira *et al.*, 2010; Haghighi Mood *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019).

L’explosion à la vapeur est l’un des procédés physico-chimiques les plus efficaces et les plus étudiés pour prétraiter la biomasse lignocellulosique afin d’améliorer la saccharification enzymatique de la cellulose, en laissant un résidu riche en cellulose et lignine (Li *et al.*, 2007; Galbe and Zacchi, 2012; Heikkinen *et al.*, 2014). Dans ce prétraitement, la biomasse broyée est rapidement chauffée avec de la vapeur saturée à haute pression, puis la pression est rapidement réduite. L'explosion de vapeur est généralement déclenchée à une température comprise entre 160-260°C, pendant plusieurs secondes à quelques minutes avant que la biomasse ne soit exposée à la pression atmosphérique (Sun and Cheng, 2002). La biomasse subit une décompression explosive par expansion de la vapeur dans la matrice lignocellulosique, qui entraine la séparation et la réduction de taille des fibres et une déstructuration de la paroi cellulaire (Alvira *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2015).

D'un point de vue chimique, ce prétraitement provoque des changements structuraux importants, avec la dépolymérisation des hémicelluloses, la rupture des liaisons hémicellulose-lignine, ainsi que des réactions de dépolymérisation/repolymérisation de la lignine entrainant une diminution des liaisons β-O-4 et une augmentation des structures condensées C-C (**Figure 10**). Ces réactions facilitent la solubilisation des hémicelluloses dans l'eau et une augmentation de la solubilité de la lignine dans les solvants alcalins ou organiques, ainsi qu’une diminution du degré de polymérisation de la cellulose (Li *et al.*, 2007). A la suite de ce prétraitement, les résidus solides sont riches en celluloses et en lignines. La rupture de liaisons hémicellulose-lignine et la dépolymérisation des hémicelluloses sont les principaux facteurs expliquant une meilleure accessibilité de la cellulose aux cellulases des résidus explosés à la vapeur. De plus, les modifications de la lignine entraîneraient une redistribution du polymère, ce qui favoriserait également l’accessibilité de la cellulose (Auxenfans *et al.*, 2017). Néanmoins, certaines liaisons hémicellulose-lignine subsisteraient au procédé qui génère par ailleurs des produits de dégradation comme le furfural, l'hydroxyméthylfurfural issus de l’hémicellulose ou des composés phénoliques solubles issus de la lignine, qui peuvent empêcher la croissance microbienne (Jørgensen *et al.*, 2007; Chiaramonti *et al.*, 2012). Après saccharification par des cellulases, les résidus explosés à la vapeur sont enrichis en lignine; jusqu’à 30 % de lignine en plus ont été quantifiés dans le cas de la paille de blé (Paës *et al.*, 2019).

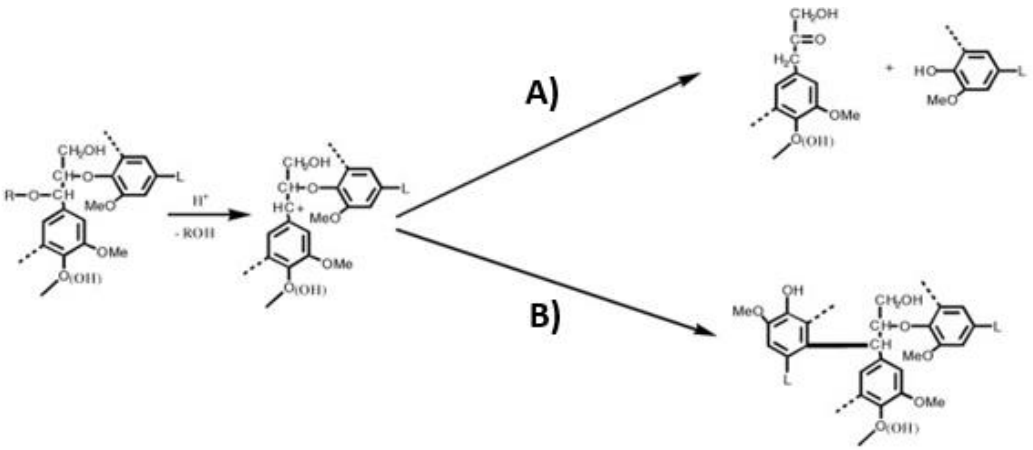


Figure 10 : A) Réactions de dépolymérisation d'une structure β-O-4. B) Réactions de repolymérisation sous forme de structure condensée C-C (adaptée de Li *et al.*, 2007).

II.1.3. Complexité et diversité des lignines techniques

Les lignines techniques se divisent en deux catégories : les lignines issues d'un traitement papetier au soufre sont déjà présentes à l'échelle commerciale (Kraft et lignosulfonates), les lignines obtenues par des procédés sans soufre, relèvent de l'échelle pilote ou laboratoire (organosolv, explosion à la vapeur…). Les lignines issues des procédés papetiers, possèdent un peu de soufre résiduel (1-5 % dans la lignine kraft et 3-8 % dans la lignosulfonate), et présentent des altérations structurales importantes, au niveau de la masse moléculaire et des liaisons dans la lignine (Vishtal and Kraslawski, 2011). Pour les lignines prétraitées, ces modifications structurales sont moindres et des sucres restent encore associés aux résidus. Par exemple, la lignine kraft a une masse moléculaire et une teneur en sucre inférieure à celle de la lignine issue de l'explosion à la vapeur (**Tableau 3**) et celle-ci possède des hydroxyles phénoliques et aliphatiques libres deux fois supérieures issues de l'importance du clivage des liaisons β-O-4 (El Mansouri and Salvadó, 2006; El Mansouri and Salvadó, 2007).

Tableau 3 : Caractérisation au niveau de la masse moléculaire et composition de deux types de lignines industrielles différentes (adaptée de El Mansouri and Salvadó, 2006).

	M_w ($g.mol^{-1}$)	M_n ($g.mol^{-1}$)	M_w/M_n	Sucres (%)	Lignine (%)
Lignine kraft	1100	550	2,0	1,5	94
Explosion à la vapeur*	2100	800	2,6	3,5	88

* La lignine issue du procédé explosion à la vapeur, a subi une saccharification ; M_w = Masses moléculaires moyens en masse; M_n = Masses moléculaires moyens en nombre; (Mw/Mn) = Polydispersité.

II.2. Valorisation de la lignine

Les lignines industrielles sont actuellement brûlées en grande majorité pour produire de l'énergie au sein des bioraffineries, mais de nouveaux usages et preuves de concepts sont en cours de développement pour une valorisation plus diverse et pertinente pour la bioéconomie (Gosselink *et al.*, 2004). Les biocarburants ont longtemps été considérés comme le principal facteur de développement des bioraffineries (Chandel *et al.*, 2018). Mais, récemment, ce paradigme a été remis en question suite à la fermeture de plusieurs usines de biocarburants à travers le monde, faute de compétitivité vis-à-vis du pétrole (Cherubini, 2010; Clark *et al.*, 2012; Dale, 2018). La lignine étant fonctionnalisée, les combustibles issus de sa conversion sont de faible qualité. En revanche, sa conversion en bioproduits sous forme de biomatériaux ou molécules aromatiques permettrait de mieux utiliser leurs fonctions intrinsèques (Strassberger *et al.*, 2014; Gillet *et al.*, 2017).

II.2.1. Les bioénergies

Les lignines issues de procédés industriels peuvent être utilisées comme sources de bioénergies sous différentes formes de combustibles, notamment la lignine solide, les hydrocarbures, les gaz de synthèse et l'hydrogène (Azadi *et al.*, 2013). Les principaux procédés d'obtention de combustibles commencent par un traitement thermochimique (Pandey and Kim, 2011). La décomposition pyrolytique est généralement réalisée entre 450-700°C, pour la production de lignine liquide et d'hydrocarbures utilisés comme substituts aux combustibles classiques (Li *et al.*, 2015; Chio *et al.*, 2019). Les conditions de pyrolyse déterminent la composition chimique et le rendement des produits solides, par exemple la pyrolyse peut être une pyrolyse rapide pour obtenir des hydrocarbures ou une pyrolyse lente pour obtenir du biochar (Figueiredo *et al.*, 2018). La production de chaleur et d'électricité par combustion du biochar est actuellement la principale voie de conversion des lignines issues de procédés industriels (Azadi *et al.*, 2013). La gazéification, réalisée entre 250-400°C, représente une autre voie de valorisation des lignines (Li *et al.*, 2015). Ces gaz de synthèse peuvent aussi être brûlés pour produire de la chaleur et de l'électricité ou être transformés en hydrogène, utilisé comme combustible (Azadi *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2018). Bien que la pyrolyse et la gazéification aient l'avantage d'être applicables à une vaste gamme de lignines différentes, la variabilité des produits obtenus par ces procédés est limitée et ces procédés sont très énergivores (Gillet *et al.*, 2017). Enfin, la bioconversion microbiologique de la lignine issue de procédés industriels ou de monomères de lignines comme source de carbone en lipides peut aussi conduire à la production de biocarburant (Kosa and Ragauskas, 2013; Becker and Wittmann, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

II.2.2. Les biomatériaux

Les lignines issues de procédés industriels peuvent être utilisées directement pour des applications telles que les fibres de carbone, le charbon actif ou les matériaux absorbants car ces lignines ont une teneur élevée en carbone (Nguyen *et al.*, 2018). Mais, leur utilisation comme polymères est plus délicate et reste limitée malgré de nombreux groupes hydroxyles phénoliques ou aliphatiques car ceux si sont souvent dissimulés ou encombrés par la densité de réticulation élevée de la lignine (Duval and Lawoko, 2014; Kai *et al.*, 2016; Upton and Kasko, 2016). En revanche, après fonctionnalisation par modification chimique pour ajouter ou améliorer des groupes fonctionnels réactifs sur la matrice de lignine, celles-ci peuvent être utilisés comme liants pour créer des macromonomères à base de lignine qui serviront à la synthèse de polyuréthanes, de polyesters ou de résines (Stewart, 2008; Laurichesse and Avérous, 2014; Upton and Kasko, 2016). Les macromonomères à base de lignine possèdent de meilleures propriétés, thermiques et mécaniques avec des applications respectivement dans les thermoplastiques ou dispersant pour le ciment (Figueiredo *et al.*, 2018; Grossman and Wilfred, 2019). En ce qui concerne des biomatériaux à partir de composés aromatiques issus de la dépolymérisation de la lignine, comme l'acide muconique, l'acide pyridine-2,4-dicarboxylique, le polyhydroxyalcanoate et l'acide lactique, ils peuvent être utilisés dans les bioplastiques comme le nylon, le polyuréthane et le polyéthylène (Ten and Vermerris, 2013; Palazzolo and Kurina-Sanz, 2016).

II.2.3. Les biomolécules

Au-delà de sa valorisation en tant que biomatériaux et bioénergies, la lignine peut subir des réactions de dépolymérisation vers de plus petites molécules à haute valeur ajoutée. En effet, la lignine étant la principale et la plus abondante ressource renouvelable composée de groupements aromatiques, sa dépolymérisation permettrait de fournir des molécules aromatiques et se substituer à la pétrochimie (Gillet *et al.*, 2017). Les transformations en aval de la dépolymérisation de la lignine sont regroupées sous le terme de mise à niveau (Upgrading) et comprennent des approches chimio-catalytiques et biocatalytiques. L'approche chimio-catalytique pour la transformation de la lignine et ces dérivés est plus énergivore et non sélective, et vise principalement à obtenir un combustible plutôt que des molécules aromatiques et nécessite de grandes quantités d'hydrogène (Linger *et al.*, 2014; Strassberger *et al.*, 2014; Schutyser *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2018b). C'est pourquoi, l'approche biocatalytique est aujourd'hui considérée comme le moyen le plus approprié, notamment en raison d'une meilleure sélectivité, d'une plus grande diversité de substrats et de meilleures conditions d'utilisation plus propres et plus respectueuses de l'environnement (Sena-Martins *et al.*, 2008; Schutyser *et al.*, 2018). Cependant,

à ce jour, aucun système biocatalytique enzymatique ne s'est montré suffisamment efficace pour la production de molécules aromatiques à partir de la lignine avec des rendements pouvant permettre leur commercialisation (Crestini, Crucianelli, *et al.*, 2010; Zakzeski *et al.*, 2010). La biocatalyse enzymatique reste encore un défi, avec notamment le choix de la bonne combinaison d'enzymes pour la valorisation des lignines à grande échelle (Gillet *et al.*, 2017).

En revanche, les progrès dans la compréhension du fonctionnement des microorganismes ligninolytiques, ainsi que leurs modes d'action enzymatique pour la conversion de la lignine suscitent actuellement un regain d'intérêt comme approche biocatalytique (Bugg *et al.*, 2011a; Asina *et al.*, 2017; López-Mondéjar *et al.*, 2019; Wilhelm *et al.*, 2019). Grâce aux avancées dans les domaines du génie génétique et de la biologie synthétique, des usines cellulaires microbiennes efficaces ont été obtenues à l'échelle laboratoire pour la production de molécules aromatiques à partir de lignine ou dérivé de la lignine (Salvachúa *et al.*, 2015; Barton *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019; McCarty and Ledesma-Amaro, 2019; Singh *et al.*, 2019). Il existe déjà de nombreuses preuves de concept de valorisation de la lignine sous la forme de plate-formes de molécules aromatiques à haute valeur ajoutée (**Tableau 4**) par conversion microbienne à l'échelle laboratoire, pour diverses applications dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et pétrochimiques (Palazzolo and Kurina-Sanz, 2016; Tinikul *et al.*, 2018; Becker and Wittmann, 2019a).

Tableau 4 : Molécules aromatiques issues de la bioconversion de la lignine et leurs applications.

Application	Molécules	Références
Alimentaire et cosmétique	Vanilline	(Sainsbury *et al.*, 2013a; Yan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018)
Bioplastique	Acide muconique Acide pyridine-2,4-dicarboxylique Polyhydroxyalcanoate Acide lactique	(Chen and Wu, 2005; Linger *et al.*, 2014; Mycroft *et al.*, 2015; Johnson and Beckham, 2015; Lin *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Kohlstedt *et al.*, 2018; Salvachúa *et al.*, 2018; Sonoki *et al.*, 2018; Becker *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019)
Pétrochimie	Acide adipique Pyrogallol Acide pyruvique Catéchol	(Vardon *et al.*, 2015) (Wu *et al.*, 2017) (Johnson and Beckham, 2015) (Wu *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018)
Biocarburant	Lipide	(Kosa and Ragauskas, 2012; Wei *et al.*, 2015)

III. Conversion biologique de la lignine

III.1. La dégradation biologique de la lignine

Dans la nature, la biodégradation de la lignine est un processus complexe mettant en œuvre des microorganismes appartenant à des communautés microbiennes complexes. La dégradation complète de la lignine est probablement due à une succession de processus abiotiques et biologiques dont certains sont liés aux actions de champignons et de bactéries (Seigle-Murandi *et al.*, 1996; Paliwal *et al.*, 2012; Asina *et al.*, 2017; Kamimura *et al.*, 2019).

Ces processus font intervenir de nombreuses enzymes (enzymes ligninolytiques) fonctionnant en synergie et se font en deux étapes : la dépolymérisation de la lignine polymérique et la minéralisation des composés aromatiques hétérogènes issus de cette dépolymérisation (**Figure 11**). Il semblerait que les champignons et les bactéries utilisent des stratégies similaires dans l'utilisation de la lignine (Brzonova *et al.*, 2014; Asina *et al.*, 2016). En effet, généralement, les oxydoréductases extracellulaires, comme les peroxydases et les laccases (très connues chez les champignons du fait de l'efficacité des enzymes fongiques), sont sécrétées dans le milieu par les microorganismes, ce qui permet la dépolymérisation de la lignine polymérique dans un premier temps. Quelques bactéries, peuvent potentiellement, elles aussi, dépolymériser la lignine en utilisant ces enzymes ligninolytiques (exemple les Dyp peroxydases) mais, leurs activités restent nettement plus faibles et moins efficaces par rapport aux champignons (Lotfi, 2014; Brzonova *et al.*, 2014; Asina *et al.*, 2016). Dans un deuxième temps, les molécules aromatiques issues de la lignine sont internalisées par les microorganismes et peuvent être utilisées comme source d'énergie. Elles feraient alors intervenir de nombreuses autres oxydoreductases intracellulaires. Ce processus de minéralisation des composés aromatiques dérivés de la dépolymérisation de la lignine est bien étudiée chez les bactéries, avec notamment la capacité d'assimiler les composés dimériques (β-aryl éther, biphényle, phénylcoumarane…) ou les monomères phénoliques (acide férulique, acide syringique, acide vanillique, vanilline et syringaldéhyde) (Masai *et al.*, 2007; Bugg *et al.*, 2011b; Jung *et al.*, 2016; Kamimura *et al.*, 2017b; Barnhart-Dailey *et al.*, 2019).

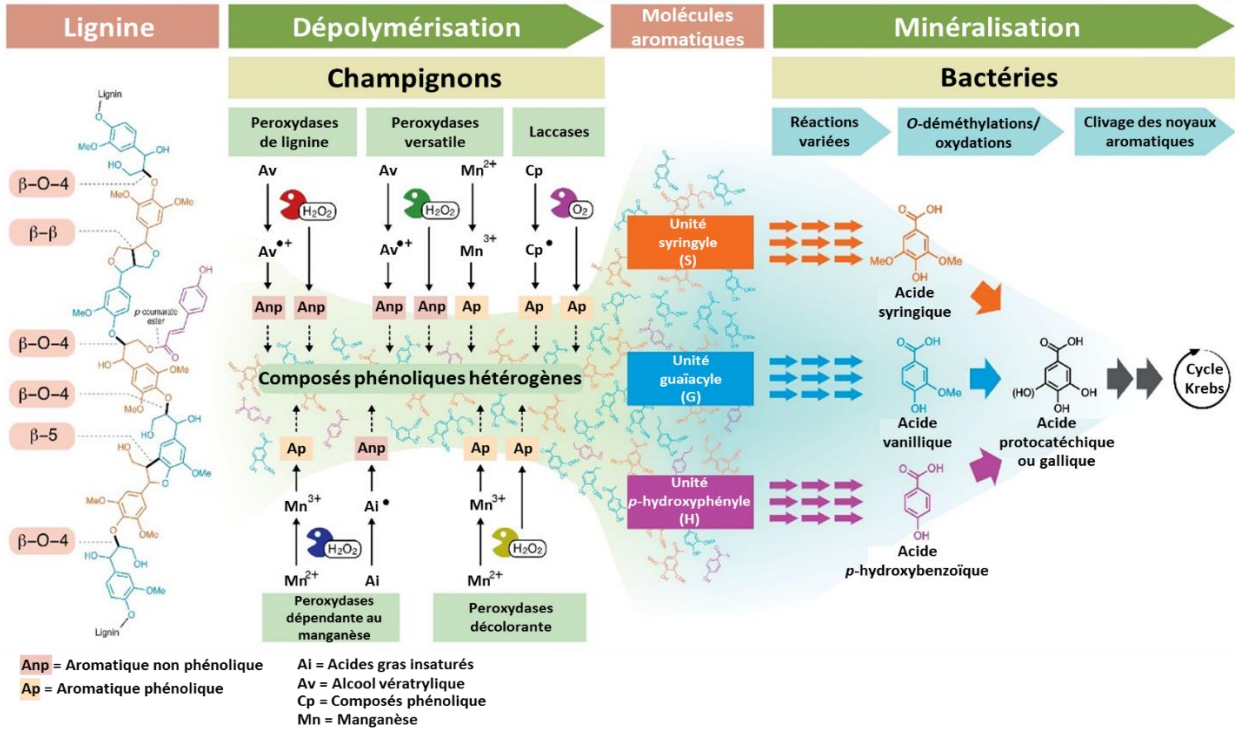


Figure 11 : Représentation schématique du système de dégradation microbienne de la lignine (adaptée de Kamimura *et al.*, 2019).

III.2. Conversion enzymatique de la lignine

III.2.1. Le catabolisme extracellulaire de la lignine

Les enzymes capables de dépolymériser la lignine polymérique sont présentées sur la **Figure 12A**. Ces enzymes proviennent de la famille des oxydoréductases et sont classées en tant qu'activités auxiliaires (AA) dans la base de données CAZy (Levasseur *et al.*, 2013). Les deux grandes familles d'enzymes qui catalysent la déconstruction de la lignine par oxydation sont les laccases et les peroxydases. Au lieu de cibler des substrats ou des liaisons spécifiques, elles attaquent la lignine par interaction directe ou par diffusion de molécules oxydantes appelés radicaux et clive la lignine de manière non spécifique (Pollegioni *et al.*, 2015; **Figure 12BC**). On trouve également des enzymes accessoires qui génèrent le peroxyde d'hydrogène nécessaire au fonctionnement des peroxydases ou qui réduisent les radicaux générés par les laccases et peroxydases (Pollegioni *et al.*, 2015).

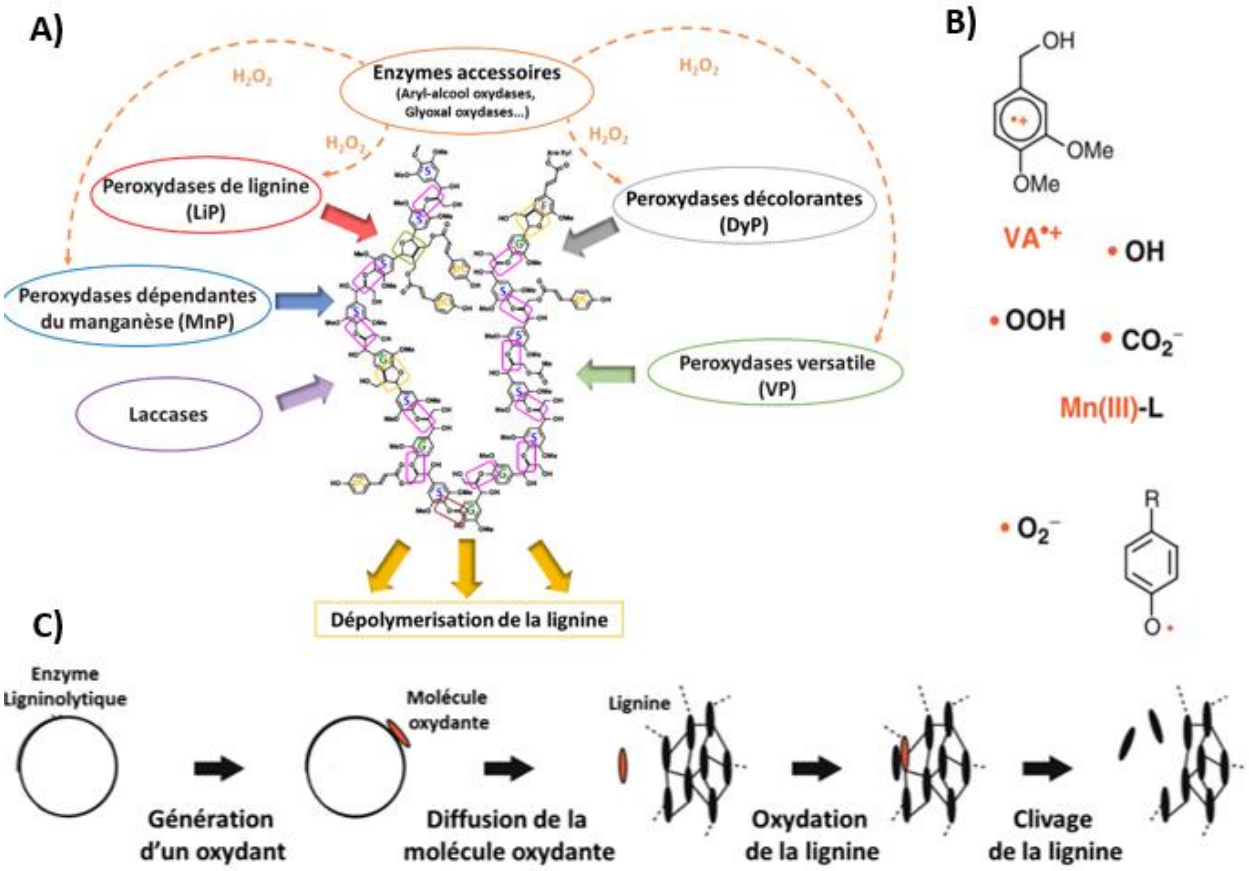


Figure 12 : A) Présentation des enzymes capables de dépolymériser la lignine polymérique (adaptée de Abdelaziz *et al.*, 2016). B) Exemple de molécules oxydantes. C) Diffusion des molécules oxydantes dans la lignine (adaptée de Brown and Chang, 2014).

III.2.1.1. Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes qui appartiennent à la famille AA1 des activités auxiliaires. Elles ont été découvertes pour la première fois, chez *Rhus vernicifera* un arbre à laque japonais (Gianfreda *et al.*, 1999; Baldrian, 2006). Ces enzymes sont des biocatalyseurs représentant un intérêt biotechnologique considérable sur le plan industriel, car leur mode de fonctionnement catalytique ne nécessite pas l'ajout de cofacteurs. De plus, elles utilisent l'oxygène atmosphérique en tant qu'accepteur final d'électrons et libèrent de l'eau. Elles sont donc considérées comme des biocatalyseurs verts (Martínez *et al.*, 2005). Leurs activités consistent à catalyser la réduction de l'O_2 en H_2O, en oxydant des composés phénoliques (**Figure 13**). Cette catalyse est garantie par la présence dans leur site actif de quatre ions cuivre (Riva, 2006; Giardina *et al.*, 2010). Les laccases peuvent oxyder des aromatiques phénoliques, mais leurs potentiels rédox relativement faibles les empêchent d'oxyder les aromatiques non

phénoliques, qui représentent souvent plus de 80% du polymère de lignine *in planta*. Les aromatiques phénoliques de la lignine ou des produits de dégradations de la lignine peuvent être oxydés en radicaux phénoxyles, qui sont des intermédiaires instables, qui peuvent pénétrer dans le réseau complexe des lignines pour le déconstruire (Martínez *et al.*, 2005). Les laccases ont également de fortes activités de polymérisation qui sont en compétition avec les activités de dépolymérisation de la lignine, il est donc essentiel de déplacer sa performance catalytique vers le clivage de la lignine en optimisant les conditions d'utilisations (Bourbonnais *et al.*, 1995; Roth and Spiess, 2015). Bien que les activités laccases soient normalement limitées aux composés phénoliques, celle-ci peut coopérer avec un médiateur jouant le rôle de navette d'électrons entre le substrat et l'enzyme, ce qui permet la dégradation des composés non phénoliques, c'est ce qu'on appelle le système médiateur-laccase (LMS). Ces médiateurs sont des molécules qui sont oxydés en continu par les laccases et ensuite réduits par le substrat comme présenté dans la **Figure 13**. En raison de leur taille, certains substrats ne peuvent pas pénétrer dans le site actif de la laccase et le médiateur agit donc comme un transporteur d'électrons entre l'enzyme et le substrat, surmontant ainsi les obstacles stériques qui existent entre eux. Ces médiateurs peuvent notamment être des produits phénoliques issus de la dégradation de la lignine, (le syringaldéhyde, l'acide *p*-coumarique, la vanilline, l'acétovanillone, l'acide 4-hydroxybenzoïque et l'alcool de vanillyle; Christopher *et al.*, 2014). Des médiateurs synthétiques comme l'ABTS ou l'HBT sont les plus utilisés dans les travaux de dépolymérisation de la lignine (Bourbonnais *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

Ces enzymes ont de nombreuses applications dans différents domaines (**Figure 14**) comme la bioremédiation et l'industrie du textile pour la dégradation de polluants et colorants environnementaux persistants ou la production de composés phénoliques (Grandclément *et al.*, 2017). Les laccases sont également utilisées le blanchiment de pâte papetière et pourraient contribuer à la délignification de la biomasse lignocellulosique destinée à la production de sucres fermentescibles (Bourbonnais and Paice, 1992; Camarero *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010).

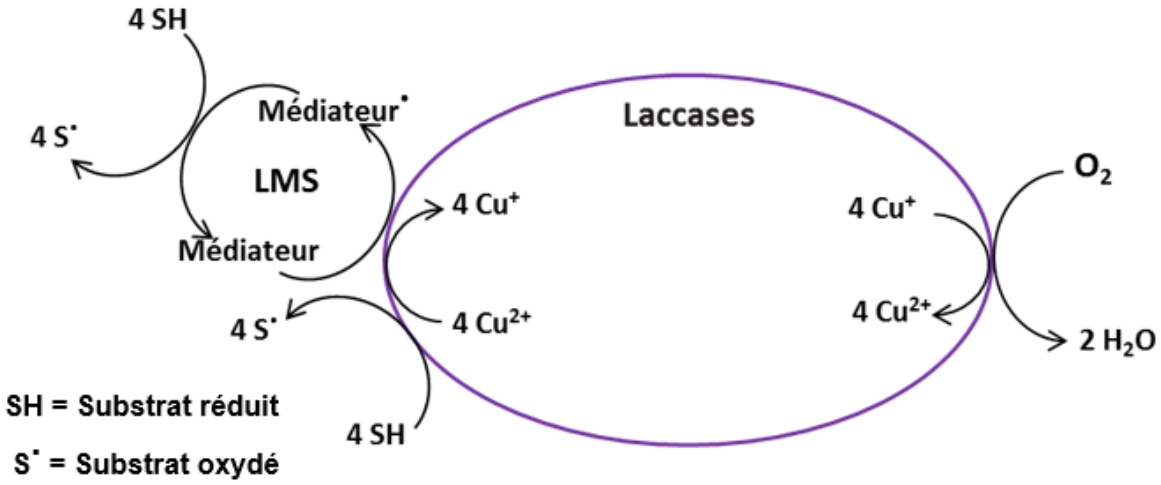


Figure 13 : Activité enzymatique d'une laccase et son mécanisme d'oxydoréduction. Le substrat est un aromatique phénolique, sauf en présence du mécanisme LMS, ou le substrat peut être un aromatique phénolique ou non (adaptée de Baldrian, 2006; Abdelaziz *et al.*, 2016).

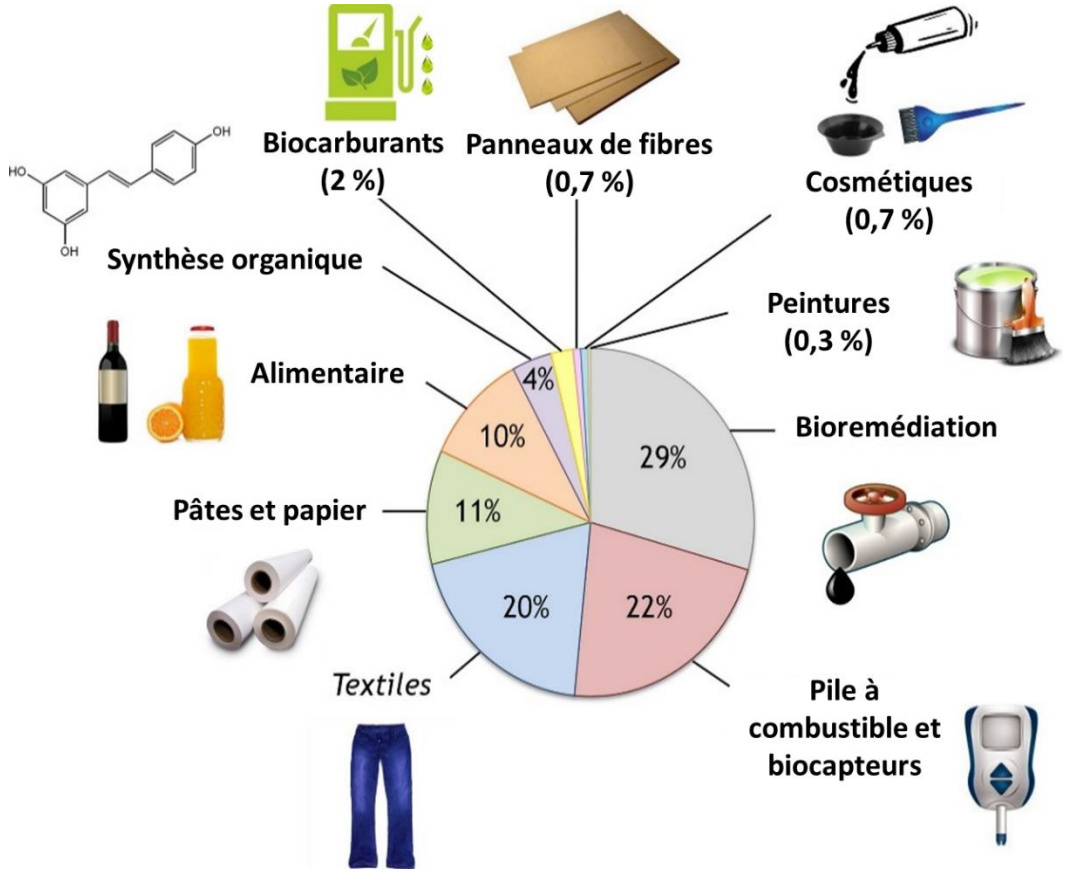


Figure 14 : Applications industrielles des laccases en pourcentage d'utilisation (adaptée de Mate and Alcalde, 2017).

III.2.1.2. Les peroxydases

Les peroxydases à hèmes, contenant un cofacteur métallique (souvent du fer), forment une superfamille d'enzymes responsables de nombreuses fonctions de biosynthèse et de dégradation. Les peroxydases (EC 1.11.1) appartiennent à la famille des AA2 des enzymes auxiliaires (CAZY) et font partie de la famille des peroxydases-catalases (Levasseur *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2017). Toutes les peroxydases ont un cycle de fonctionnement comprenant l'oxydation de deux électrons de l'hème contenant du Fe^{3+} par l'H_2O_2, formant un complexe cationique oxo-ferryl (Fe^{4+}=O) porphyrine qui oxyde successivement deux molécules substrats par une extraction d'électrons. Il existe plusieurs types de peroxydases selon leurs substrats préférentiels : les peroxydases de lignine (LiP), les peroxydases dépendantes du manganèse (MnP), les peroxydases versatiles (VP) et les peroxydases décolorantes (DyP) (Dashtban *et al.*, 2010; Asina *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2017; de Gonzalo *et al.*, 2016; Janusz *et al.*, 2017).

III.2.1.2.1. Peroxydases de lignine (LiP)

Les peroxydases de lignine (EC 1.11.1.14) ont un potentiel rédox exceptionnellement élevé, ce qui leur permet d'oxyder les aromatiques non phénoliques en produisant des radicaux cations (Glenn *et al.*, 1983). Les LiP peuvent oxyder directement les lignines ou des produits intermédiaires. Ces derniers, tels que les radicaux phénoxyles issus de phénols, ou radicaux cations, issus de l'alcool vératrylique, sont oxydés lors de transferts d'électrons en plusieurs étapes. Ils agissent ensuite comme des médiateurs diffusibles qui oxydent la lignine à distance, par des réactions non enzymatiques, ce qui entraine des clivages de chaînes latérales et des déméthylations (Kersten *et al.*, 1985; Dashtban *et al.*, 2010; Brown and Chang, 2014a). Les LiPs sont également capables de cliver directement des chaînes alkyles dans la lignine. La plupart de ces clivages se produisent entre le Cα et Cβ de la chaîne latérale (Chen and Wan, 2017). Le mécanisme d'action des LiP est présenté dans la **Figure 15A**, avec un début de réaction par l'oxydation du Fe^{3+}, par l'H_2O_2 pour donner un intermédiaire oxydé par deux électrons dans lequel le fer se retrouve sous forme de Fe^{4+} avec un radical libre. La LiP, oxyde à son tour un premier substrat pour se retrouver sans radical libre et oxyde ensuite, un deuxième substrat, pour revenir à son état ferrique naturel, tout en produisant une molécule d'eau (Hammel and Cullen, 2008).

III.2.1.2.2. Peroxydases dépendantes du manganèse (MnP)

Les peroxydases dépendantes du manganèse (EC 1.11.1.13), sont des peroxydases qui peuvent oxyder indirectement les aromatiques phénoliques de la lignine à l'aide du manganèse comme intermédiaire (Glenn *et al.*, 1985). Le mécanisme des MnP est similaire au mécanisme d'action des LiP, mais au lieu d'oxyder directement le substrat, elles oxydent le Mn^{2+} en tant que donneur d'électrons, pour former du Mn^{3+} (**Figure 15B**; Hammel and Cullen, 2008). Celui-ci est stabilisée via la chélation avec des acides dicarboxyliques, tels que l'oxalate, le malonate, le malate, le tartrate ou le lactate. Le Mn^{3+} chélaté agit comme un médiateur rédox de faible masses moléculaire, qui attaque uniquement les aromatiques phénoliques de la lignine (Dashtban *et al.*, 2010; Z., H., Liu *et al.*, 2019). C'est cette stabilisation qui augmente la densité électronique du Mn^{3+} et en fait un oxydant plus faible, incapable d'oxyder les structures non phénoliques prédominantes de la lignine (Hammel and Cullen, 2008). Néanmoins, il a été démontré que les MnP étaient capables de cliver les aromatiques non-phénoliques par l'intermédiaire de chaines aliphatiques d'acides gras insaturés dont l'oxydation conduit à des radicaux plus puissants tels que l'acide acétique, les hydroperoxydes, les superoxydes ou les méthanoates (Bao *et al.*, 1994; Moen and Hammel, 1994; Hofrichter, 2002).

III.2.1.2.3. Peroxydases versatiles (VP)

Les peroxydases versatiles (EC 1.11.1.16) peuvent oxyder les aromatiques non phénoliques à potentiel redox élevé comme les LiP ainsi que les aromatiques phénoliques par l'intermédiaire du manganèse (Mn^{2+}) comme les MnP (**Figure 15C**; Camarero *et al.*, 1999; Pérez-Boada *et al.*, 2005). Ces VP sont capables d'oxyder efficacement les aromatiques phénoliques en l'absence de médiateurs oxydants ou d'oxyder les aromatiques non phénoliques en l'absence de Mn^{2+} (Rodríguez *et al.*, 2004). Cette polyvalence lui permet d'avoir une plus grande diversité de substrats et leur confère un rôle actif dans l'oxydation des aromatiques à potentiel redox faible et élevé (Dashtban *et al.*, 2010; Janusz *et al.*, 2017). Cependant, ses activités catalytiques sont plus faibles en comparaison aux LiP mais sont comparables aux activités des MnP (Pérez-Boada *et al.*, 2005; Hammel and Cullen, 2008). Une VP de *Pleurotus ostreatus* a récemment permis la dégradation d'un dimère β-O-4 et de la lignine synthétique (Fernández-Fueyo *et al.*, 2014).

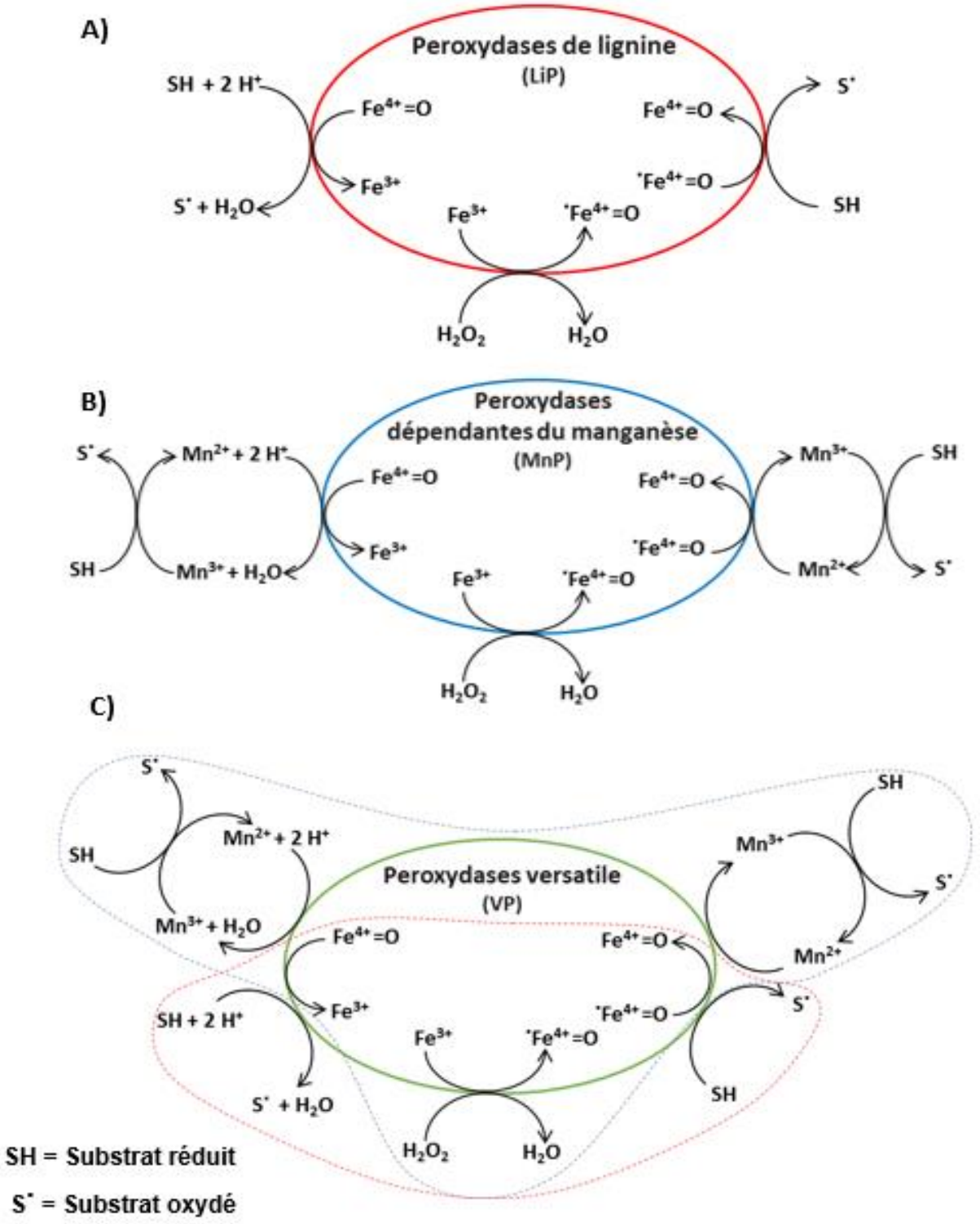


Figure 15 : Mécanisme d'action des différentes peroxydases. A) LiP, B) MnP et C) VP. Le substrat est un aromatique non phénolique pour la LiP, un aromatique phénolique pour la MnP et un aromatiques phénolique ou non pour la VP (adaptée de Hofrichter, 2002; Abdelaziz *et al.*, 2016; Chen and Wan, 2017).

III.2.1.2.4. Peroxydases décolorantes (DyP-type)

Les peroxydases décolorantes (EC 1.11.1.19) révèlent une origine phylogénétique différente des peroxydases décrites ci-dessus et ont été nommées DyP en raison de leur capacité à catalyser efficacement la décoloration d'une large gamme de colorants industriels, en particulier les dérivés de l'anthraquinone (Reactive Blue 5, Remazol Brilliant Blue R…) (Kim and Shoda, 1999; Martínez *et al.*, 2017). Bien que les substrats naturels de ces enzymes ne soient pas nécessairement des colorants, toutes les peroxydases de type DyP présentent une activité peroxydase apparente plus élevée vis-à-vis de ces colorants que celle des autres peroxydases (Brown *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014). Les DyP ont été divisées en 4 classes sur la base de leurs séquences protéiques. Les protéines appartenant aux classes A, B et C sont principalement présentes chez les bactéries. Les Dyp A sont généralement sécrétées, contrairement à celles des classes B et C qui ne possèdent pas de peptide signal de sécrétion, ce qui suggère qu'il s'agit d'enzymes intracellulaires. Les DyP de classe D, sont des protéines extracellulaires issues de champignons (Fawal *et al.*, 2013; Singh and Eltis, 2015; Yoshida and Sugano, 2015). Les Dyp ont le même mode d'action global que les autres peroxydases avec un besoin en peroxyde d'hydrogène pour former les intermédiaires qui oxydent ensuite le médiateur ou le substrat. Cependant, les mécanismes exacts du fonctionnement catalytique des DyP sont encore mal connus (de Gonzalo *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2017).

Plusieurs de ces enzymes ont été caractérisées et étudiées pour leurs capacités à dégrader la lignine avec notamment les aromatiques phénoliques ou non dans la lignine, ainsi que le clivage des liaisons inter-unités β-O-4 à travers des composés modèles de la lignine (Van Bloois *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Lončar *et al.*, 2016). Plusieurs Dyp bactériennes ont été identifiées dans la littérature. Une DyP de *Saccharomonospora viridis* a notamment permis d'améliorer le blanchiment biologique de la pâte kraft d'eucalyptus (Yu *et al.*, 2014). Chez *Thermobifida fusca*, une DyP a montré une réactivité vis-à-vis de la lignine Kraft, et s'est avérée oxyder un composé modèle de lignine β-aryl éther pour former un dimère oxydé (Rahmanpour *et al.*, 2016). Enfin, l'utilisation de technique de mutagenèse aléatoire suivie d'un criblage à haut débit, a permis d'identifier et de sélectionner une DyP de *Pseudomonas putida* qui présente une efficacité catalytique 100 fois supérieure sur du 2,6-diméthoxyphénol, ainsi qu'une efficacité améliorée pour un certain nombre de phénols, de molécules aromatiques, le dimère de modèle phénolique de lignine β-O-4 et la lignine Kraft (Brissos *et al.*, 2017).

III.2.1.2.5. Applications des peroxydases

Les perspectives d'applications industrielles pour les peroxydases couvrent de vastes secteurs, avec notamment la bioraffinerie, le textile, la bioremédiation (Falade *et al.*, 2017). Dans la bioraffinerie, l'étape de délignification de la biomasse lignocellulosique est importante pour la production de biocarburants. Ces peroxydases pourraient permettre d'améliorer les prétraitements biologiques avec une action en amont de l'utilisation de microorganismes non ligninolytiques (Wang *et al.*, 2013b). Dans le domaine de la bioremédiation avec la dépollution des eaux usées ou encore pour l'industrie du textile qui produit un nombre considérable de colorants et polluants industriels (Karam and Nicell, 1999; Singh *et al.*, 2015). En effet, l'utilisation de peroxydases s'est avérée efficace pour le traitement de colorants industriels seul ou en complément d'un traitement à la laccase qui dans ce cas améliore de 25 % la décoloration (Abadulla *et al.*, 2000; Ferreira-Leitão *et al.*, 2007).

III.2.1.3. Activités enzymatiques accessoires

Les enzymes qui fonctionnent en complémentarité avec les enzymes ci-dessus et qui favorisent la dégradation de la lignine sont appelées enzymes accessoires (**Tableau 5**). Celles-ci regroupent des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que des réductases et des déshydrogénases qui réduisent les radicaux dérivés de la dégradation de la lignine (quinones, méthoxyle et phénoxyle) par les peroxydases et les laccases (Dashtban *et al.*, 2010; **Figure 16**). Ces enzymes ont principalement été identifiées et caractérisées chez les champignons. Par ailleurs, il a été montré que ces enzymes agissent en synergie avec les autres enzymes ligninolytiques et améliorent la dégradation de la lignine ou des biomasses lignocellulosiques (Kersten, 1990; Henriksson *et al.*, 1995; Dashtban *et al.*, 2010).

Tableau 5 : Enzymes accessoires, favorisant la dégradation de la lignine.

Nomenclature EC	Nomenclature CAZy	Nom des enzymes	rôles	Références
EC 1.1.3.7	AA3_2	Aryl alcool oxydases (AAO)	H_2O_2	(Guillén *et al.*, 1992)
EC.1.1.3.38	AA4	Alcool Vanillique oxydase (VAO)	H_2O_2	(de Jong *et al.*, 1992)
EC 1.2.3.15	AA5_2	Glyoxal oxydases (GLX) ou Méthanol oxydase (MOX)	H_2O_2	(Daou *et al.*, 2016)
EC 1.1.3.10	AA3_4	Pyranose 2-oxydase (P2O)	H_2O_2	(Volc and Erikkson, 1988)
EC 1.1.3.9	AA5_2	Galactose oxydase	H_2O_2	(Avigad *et al.*, 1962)
E.C.1.1.3.4	AA3_2	Glucose oxydase (GOD)	H_2O_2	(Swoboda and Massey, 1965)
EC.1.6.5.6	AA6	1,4-Benzoquinone ou Quinone réductase	Radicaux	(Guillén *et al.*, 1997)
EC 1.1.99.18	AA3_1	Cellobiose déshydrogénase (CDH)	Radicaux	(Turbe-Doan *et al.*, 2013)
EC 1.1.1.90	/	Aryl-alcool déshydrogénase (AAD)	Radicaux	(Gutierrez *et al.*, 1994)
EC 1.1.99.35	/	Glucose déshydrogénase (GDH)	Radicaux	(Piumi *et al.*, 2014)

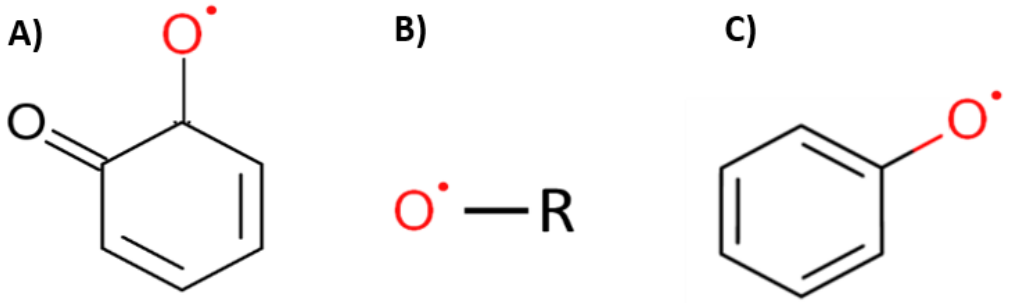


Figure 16 : Radicaux : A) Quinone, B) Méthoxyle et C) Phénoxyle.

III.2.2. Le catabolisme intracellulaire des composés aromatiques

Les premières études sur le catabolisme intracellulaire des composés aromatiques (substances contaminants et polluantes dans l'environnement) ont initialement été réalisées pour la compréhension des voies métaboliques associées à la bioremédiation et la détoxification des écosystèmes (Díaz, 2004; Arora *et al.*, 2014; Fuentes *et al.*, 2014). De nombreux microorganismes possèdent différentes voies métaboliques impliquant de nombreuses enzymes, leur permettant d'utiliser les molécules aromatiques comme sources de carbone et d'énergie pour leur croissance. Ces molécules peuvent être issues de contaminants environnementaux ou de la dégradation de la lignine polymérique ainsi que des molécules aromatiques issues de la biomasse lignocellulosique (Bugg *et al.*, 2011; Fuchs *et al.*, 2011; Kamimura *et al.*, 2017b).

Les voies métaboliques intracellulaires impliquent de nombreuses oxydoréductases qui dégradent des dimères aromatiques contenant les différentes liaisons inter-unités de la lignine. Le catabolisme biologique des composés aromatiques dérivés de la lignine est divisé en plusieurs parties (**Figure 17**), avec les voies supérieures (Upper Pathways) ou entonnoir biologique (Biological Funneling) qui permettent la transformation d'une grande diversité de molécules aromatiques (monomères ou dimères issus de la lignine polymérique) internalisées en acides syringique, *p*-hydroxybenzoïque et vanillique. Les voies périphériques (Peripheral Pathways) permettent de transformer ces 3 acides en composés aromatiques de structure catécholique (acide protocatéchique, acide gallique et catéchol) principalement par des réactions d'*O*-déméthylation. Enfin les voies inférieures (Lower Pathways) concernent l'ouverture des noyaux aromatiques issus des voies périphériques, pour la métabolisation de leurs produits en énergie dans le cycle de Krebs (Linger *et al.*, 2014; Salvachúa *et al.*, 2015).

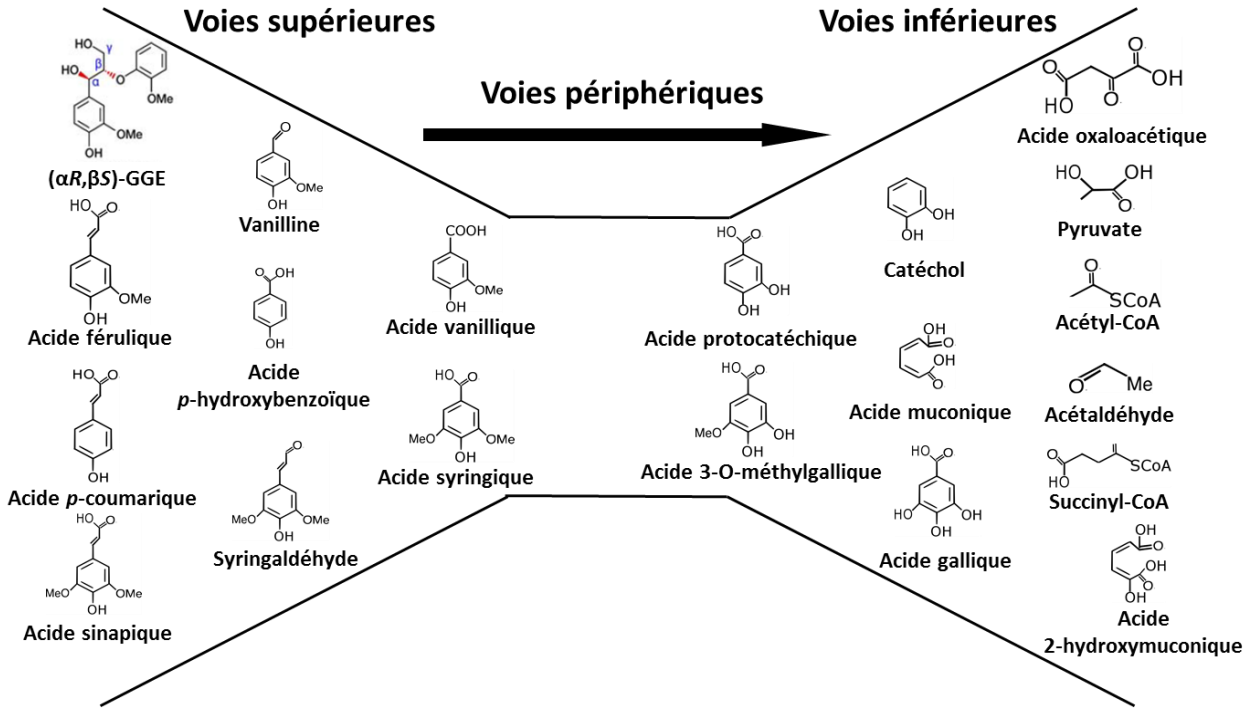


Figure 17 : Catabolisme intracellulaire des composés aromatiques (adaptée de Schutyser *et al.*, 2018).

III.2.2.1. Les voies cataboliques supérieures (Upper Pathways)

Les principales voies supérieures agissent comme des entonnoirs biologiques (Biological Funneling) qui convertissent les composés aromatiques (dimères ou monomères) dérivés des unités S, G et H ou encore les acides hydroxycinnamiques issus de la biomasse (acide férulique ou acide *p*-coumarique) en composés intermédiaires centraux qui sont l'acide vanillique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide syringique (Salvachúa *et al.*, 2015; Z., H., Liu *et al.*, 2019). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cet entonnoir biologique.

La dégradation des dimères (liaison β-O-4) par la voie des β-étherases

La liaison β-O-4 est la liaison inter-unité la plus représentée dans les lignines. La voie de dégradation de cette liaison (β-etherase Pathway) est aujourd'hui bien identifiée chez plusieurs bactéries, comme *Erythrobacter* sp, *Novosphingobium* sp ou *Sphingobium* sp. SYK-6 (Palamuru *et al.*, 2015; Kontur *et al.*, 2019; Perez *et al.*, 2019). La voie métabolique des β-étherases chez *Sphingobium* SYK6 permettant la dégradation du dimère guaïacylglycérol-β-guaïacyléther (GGE) est présentée dans la **Figure 18**.

Le composé dimérique GGE (guaiacylglycerol-β-guaicylether) qui possède la liaison β-aryl-éther existe sous deux formes isomériques (R et S), chacune ayant deux formes énantiomères (α et β). Une grande diversité d'oxydoréductases est nécessaire pour métaboliser ces différentes formes. Des alcools déshydrogénases (Lig D, O, L, N) convertissent les dimères en transformant la fonction alcool du Cα en C=O (Picart *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016). Ces dimères sont alors oxydés par les β-éthérases (LigF,E,P) en présence de gluthation rompant ainsi la liaison β-aryl-éther entre les monomères aromatiques et donnant une molécule de guaiacol et glutathion-hydroxypropionivanillone (GS-HPV; Tanamura *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2013)). Le GS-HPV est transformée en acide vanillique ou acide syringique *via* une succession de réactions d'oxydoréduction impliquant de nombreuses enzymes (Glutathion S-transferase, oxydases, aldéhydes déshydrogénases, des thioestérases; Higuchi *et al.*, 2018; Higuchi *et al.*, 2019).

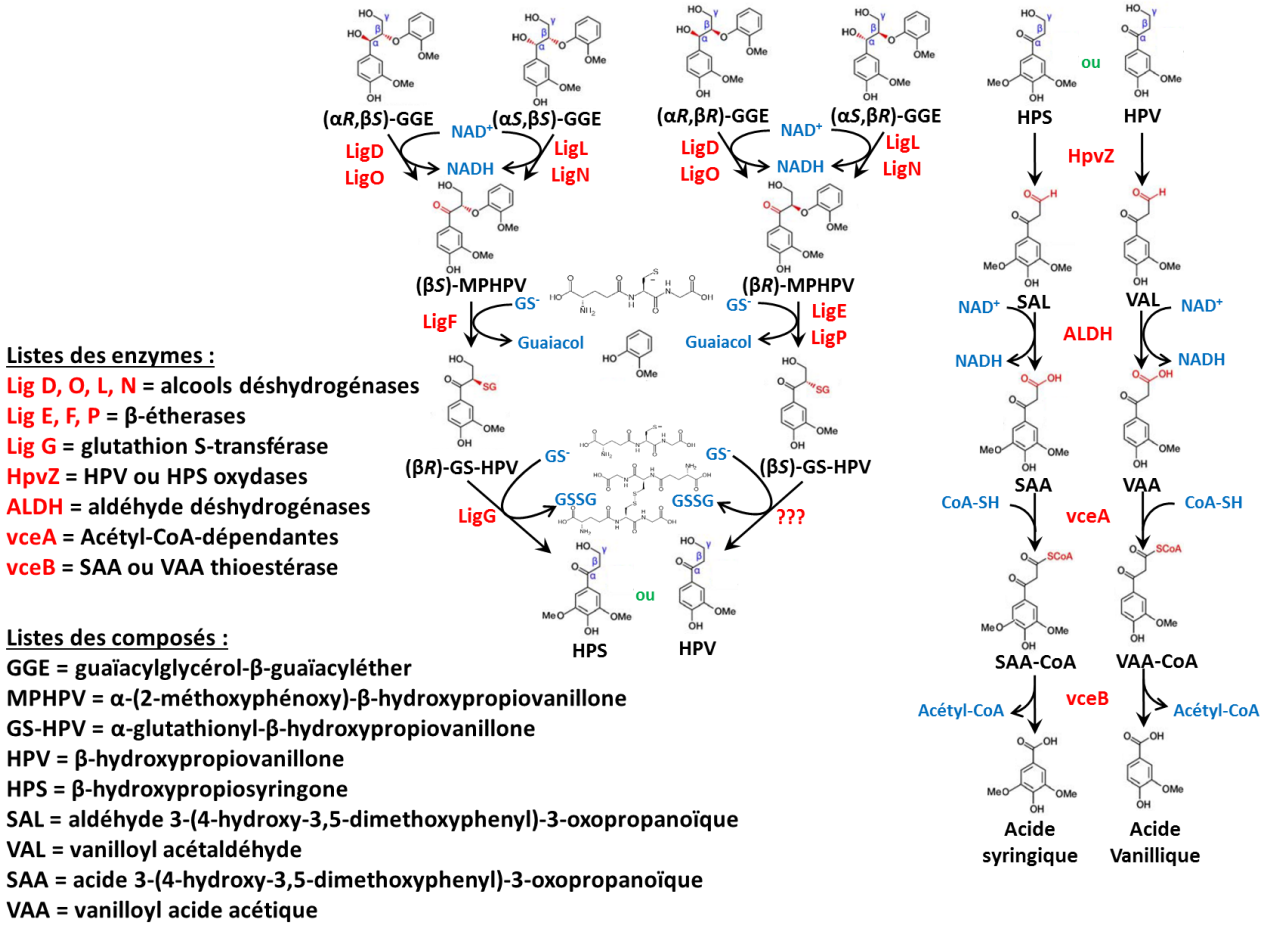


Figure 18 : Voie catabolique des β-éthérases chez *Sphingobium sp*. SYK-6 (adaptée de (Kamimura *et al.*, 2017b; Higuchi *et al.*, 2019).

La transformation des monomères aromatiques

De nombreuses enzymes sont impliquées dans la transformation des monomères issus des unités *p*-hydroxyphényle (H) (et l'acide *p*-coumarique), des unités guaïacyle (G) (et l'acide férulique) et des unités syringyle (S) de la lignine en acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique respectivement (Chen and Wan, 2017; Wang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019; Ravi *et al.*, 2019). Ces enzymes sont principalement des déshydrogénases, des décarboxylases, des réductases, des thiolases, des synthétases, des hydratases et des aldolases (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Enzymes des voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques.

Voie	Nom	Type d'enzyme	Substrats	Produits	Références
Catabolisme des unités H	***p*HCS**	synthétase	Acide *p*-coumarique	*p*-hydroxycinnamoyl-CoA	(Jung *et al.*, 2016)
	ECH	énoyl-CoA hydratase	*p*-hydroxycinnamoyl-CoA	*p*-hydroxyphényl-β-hydroxypropionyl-CoA	(Achterholt *et al.*, 2000)
	HADH	déshydrogénase	*p*-hydroxyphényl-β-hydroxypropionyl-CoA	*p*-hydroxybenzoyl-CoA	(Jung *et al.*, 2016)
	KAT	3-ketoacyl-CoA thiolase			(Jung *et al.*, 2016)
	TE	thiolase	*p*-hydroxybenzoyl-CoA	acide *p*-hydroxybenzoïque	(Jung *et al.*, 2016)
	***p*HCHL**	hydratase/lyase	*p*-hydroxyphényl-β-hydroxypropionyl-CoA	acide *p*-hydroxybenzaldhéyde	(Mitra *et al.*, 1999)
	BADH	déshydrogénase	acide *p*-hydroxybenzaldhéyde	acide *p*-hydroxybenzoïque	(Harayama *et al.*, 1986)
	***p*HBALS**	synthétase	Acide *p*-coumarique acide *p*-hydroxyphényl-β-hydroxypropanoïque	acide *p*-hydroxyphényl-β-hydroxypropanoïque acide *p*-hydroxybenzoïque	(Jung *et al.*, 2016)
Catabolisme des unités G	**RE**	aromatique réductase	acide férulique	acide dihydroférulique	(Priefert *et al.*, 2001)
	DCL	décarboxylase	acide dihydroférulique	acide vanillique	(Priefert *et al.*, 2001)
	FDC	decarboxylase	acide férulique	4-vinylguaïacol	(Zago *et al.*, 1995)
	VGDH	déshydrogénase	4-vinylguaïacol	Vanilline	(Achterholt *et al.*, 2000)
	FCS	synthétase	acide férulique	féruloyl-CoA	(Achterholt *et al.*, 2000)
	ECH/A	enoyl-CoA-hydratase/aldolase	féruloyl-CoA	Vanilline	(Achterholt *et al.*, 2000)
	VDH	déshydrogenase	vanilline	Acide vanillique	(Ding *et al.*, 2015)
	ECH	enoyl-CoA-hydratase	féruloyl-CoA	4-hydroxy-3methoxy-β-hydroxypropionyl-CoA	(Wang *et al.*, 2017)
	DHG	déshydrogénase	4-hydroxy-3methoxy-β-hydroxypropionyl-CoA	4-hydroxy-3methoxy-benzoyl actéyl-CoA	(Wang *et al.*, 2017)
	KTE	β-keto thiolase	4-hydroxy-3methoxy-benzoyl actéyl-CoA	vanillyl-CoA	(Wang *et al.*, 2017)
	TE	thiolase	vanillyl-CoA	acide vanillique	
unités S	**DesV**	aldéhyde déshydrogénase	syringaldéhyde	acide syringique	(Kamimura *et al.*, 2017b)
	LigV	vanilline déshydrogénase			(Masai *et al.*, 2007)

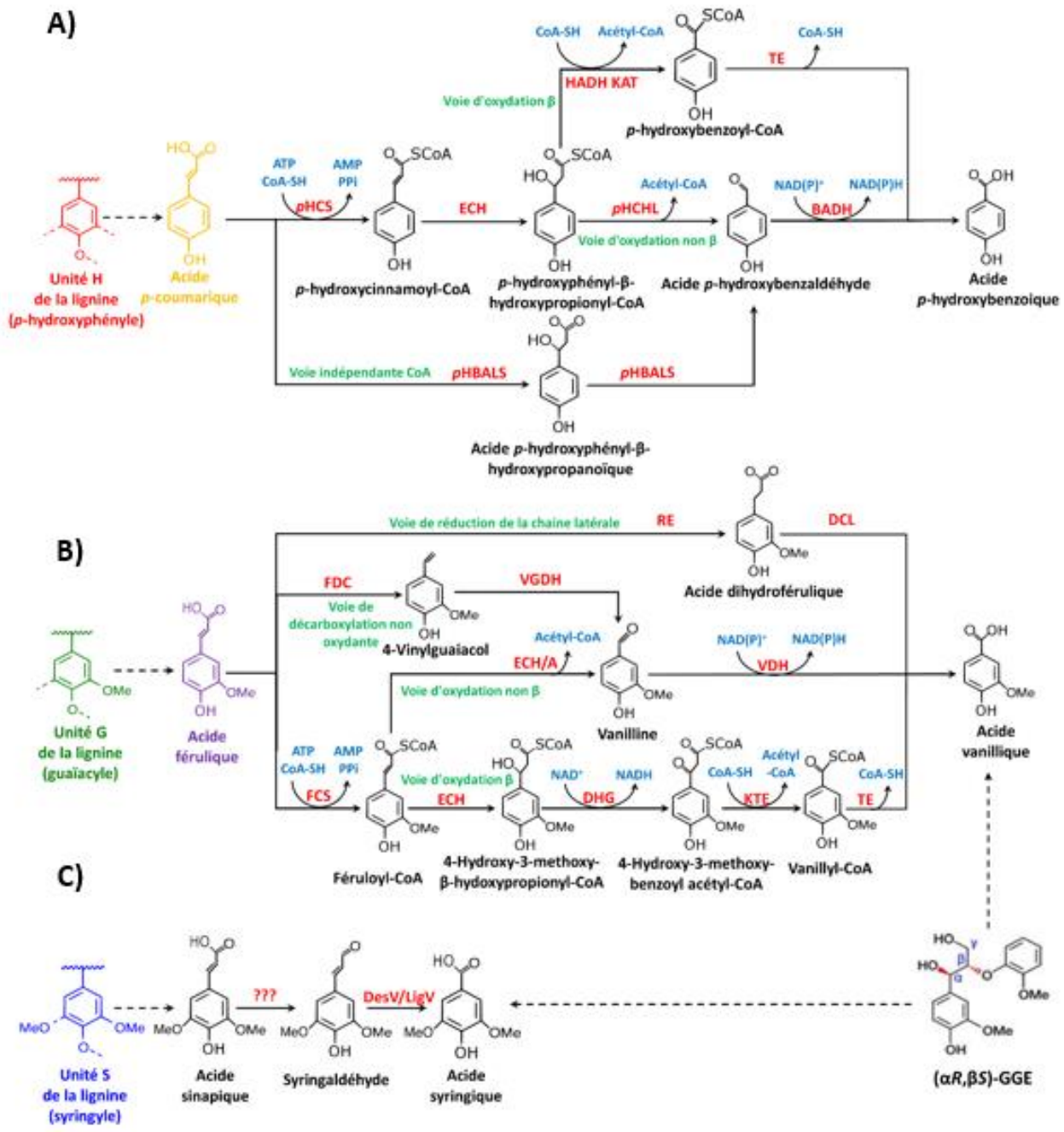


Figure 19 : Voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques. A) Voie de dégradation des composés issus de l'unité H de la lignine. B) Voie de dégradation des composés issus de l'unité G de la lignine. C) Voie de dégradation des composés issus de l'unité S de la lignine (adaptée de Wang *et al.*, 2017; Chen and Wan, 2017; Xu *et al.*, 2019; Ravi, Abdelaziz, *et al.*, 2019).

III.2.2.2. Les voies cataboliques périphériques (Peripheral Pathways)

Les voies périphériques transforment les composés intermédiaires issus des voies supérieures en composés aromatiques avec des structures catécholiques par l'intermédiaire d'une grande diversité d'oxydoréductases dont des dioxygénases, des monooxygénases, des O-déméthylases, des hydroxylases et des cytochromes P450 (**Tableau 7** et **Figure 20**). Elles permettent l'obtention des intermédiaires centraux comme l'acide protocatéchique, l'acide gallique et le catéchol (Kasai *et al.*, 2005; Kamimura *et al.*, 2017b; Ravi, Abdelaziz, *et al.*, 2019). Par exemple, l'acide caféique, l'acide 3-OH-benzoïque ou encore l'acide 4-OH-benzoïque sont transformés en acide protocatéchique alors que le toluène, le benzène, le phénol, l'acide benzoïque, l'acide cinnamique et le gaïacol sont transformés en catéchol (Fuchs *et al.*, 2011; Nešvera *et al.*, 2015; Mallinson *et al.*, 2018; Lubbers *et al.*, 2019). Ces composés aromatiques issus des voies cataboliques périphériques sont par la suite métabolisés par les microorganismes pour leur croissance dans les voies inférieures (Lower Pathways).

Tableau 7 : Enzymes des voies cataboliques périphériques des monomères aromatiques.

Nom	Type d'enzyme	Substrats	Produits	Références
VanAB	déméthylase	acide vanillique	acide protocatéchique	(Segura *et al.*, 1999)
***p*HB3H**	hydroxylase	acide *p*-hydroxybenzoïque	acide protocatéchique	(Suemori *et al.*, 1995)
PobA	hydroxylase			(Buchan *et al.*, 2000)
DesA	déméthylase	acide syringique	acide 3-O-méthylgallique	(Ravi *et al.*, 2019)
LigM	déméthylase	acide 3-O-méthylgallique	acide gallique	(Abe *et al.*, 2005)
***p*CADC/ AroY**	décarboxylase	acide protocatéchique	Catéchol	(Draths and Frost, 1994)

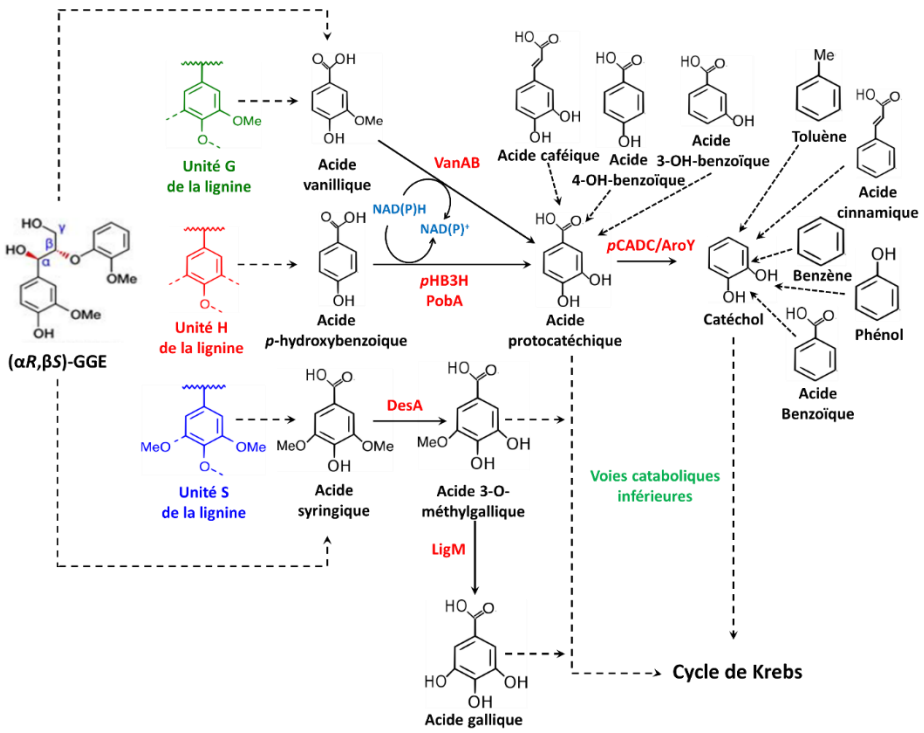


Figure 20 : Voies cataboliques périphériques (adaptée de Fuchs *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2019).

III.2.2.3. Les voies cataboliques inférieures (Lower Pathways)

Les voies inférieures concernent le clivage des noyaux aromatiques issus des intermédiaires centraux (l'acide gallique, le catéchol et le pyrocatéchol), pour donner des intermédiaires centraux comme l'acétyl-CoA, le succinyl-CoA ou encore le pyruvate utilisés dans différentes voies permettant la production d'énergie (Vaillancourt *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2013). Différentes familles de dioxygénases sont utilisées pour cliver les noyaux aromatiques ; les intradiol (ou ortho) et les extradiol (ou meta) dioxygénases. Les dioxygénases intradiol utilisent du Fe^{3+} pour cliver le noyau aromatique en position ortho, tandis que les extradiol dioxygénases utilisent du Fe^{2+} pour cliver le noyau aromatique en position méta (Sainsbury *et al.*, 2015). L'ensemble des enzymes et des mécanismes impliqués dans le catabolisme des différentes molécules des voies inférieures sont présentés dans le **Tableau 8** et la **Figure 21**. Ainsi par exemple, le cycle aromatique du principal intermédiaire, l'acide protocatéchique, peut être clivé selon plusieurs voies en fonction de la position des C où a lieu l'ouverture du cycle (voies 2-3, 3-4 ou 4-5; Kasai *et al.*, 2005). Les intradiol dioxygénases (PcaHG) sont impliquées spécifiquement dans les voies 3,4 et convertissent l'acide protocatéchique en acide carboxymuconique. Les extradiol dioxygénases (LigAB, PraA, DmpB) sont spécifiques des voies 2-3 et 4-5 (Vaillancourt *et al.*, 2006; Barry and Taylor, 2013; Xu *et al.*, 2019; Lubbers *et al.*, 2019).

Tableau 8 : Enzymes des voies cataboliques supérieures des monomères aromatiques, avec en gras les dioxygénases.

Nom	Type d'enzyme	Substrats	Produits	Références
LigAB	**4,5 dioxygénase**	**acide protocatéchique**	**acide 4-carboxy-2-hydroxymuconique-6-semialdéhyde**	(Kasai *et al.*, 2007)
LigC	déshydrogénase	acide 4-carboxy-2-hydroxymuconique-6-semialdéhyde	acide 2-pyrone-4,6-dicarboxylique	(Masai *et al.*, 2000)
DesZ	3,4-dioxygénase	acide 3-O-méthylgallique	acide 2-pyrone-4,6-dicarboxylique	(Kasai *et al.*, 2004)
LigL	hydrolase	acide 2-pyrone-4,6-dicarboxylique	acide 2-hydroxy-4-oxobutane-1,2,4-tricarboxilique	(Masai *et al.*, 1999)
LigU	tautomérase	acide 2-hydroxy-4-oxobutane-1,2,4-tricarboxilique	acide 4- oxalomesaconique	(Ravi *et al.*, 2019)
DesB/GalA	**dioxygénase**	**acide gallique**	**acide 4-oxalomesaconique**	(Kasai *et al.*, 2004)
LigJ	4 hydratase	acide 4-oxalomesaconique	acide 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipique	(Hara *et al.*, 2000)
LigK	aldolase	acide 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipique	acide oxaloacétique + Pyruvate	(Ravi *et al.*, 2019)
PraA	**2,3 dioxygénase**	**acide protocatéchique**	**acide 5-carboxy-2-hydroxymuconique-6-semialdehyde**	(Cerdan *et al.*, 1994)
PraH	décarboxylase	acide 5-carboxy-2-hydroxymuconique-6-semialdehyde	acide 2-hydroxymuconique-6-semialdehyde	(Kasai *et al.*, 2009)
XylG/PraB	déshydrogénase	acide 2-hydroxymuconique-6-semialdehyde	acide 2-hydroxymuconique	(Kasai *et al.*, 2009)
XylH/PraC	tautomérase	acide 2-hydroxymuconique	acide 4-oxalocronique	(Kasai *et al.*, 2009)
XylL/PraD	décarboxylase	acide 4-oxalocronique	acide 2-hydroxypenta-2,4-dienoique	(Kasai *et al.*, 2009)
XylJ	hydratase	acide 2-hydroxypenta-2,4-dienoique	acide 4-hydroxy-2-oxovalerique	(Lau *et al.*, 1994)
XylK	aldolase	acide 4-hydroxy-2-oxovalerique	pyruvate + acétaldhéyde	(Shingler *et al.*, 1992)
XylQ	déshydrogénase	acétaldhéyde	acétyl-CoA	(Aemprapat and Williams, 1998)
PcaHG	**3,4 dioxygénase**	**acide protocatéchique**	**acide β-carboxymuconique**	(Buchan *et al.*, 2000)
PcaB	cycloisomérase	acide β-carboxymuconique	γ-carboxymuconolactone	(Buchan *et al.*, 2000)
PcaC	décarboxylase	γ-carboxymuconolactone	acide β-cétoadipique énol-lactone	(Buchan *et al.*, 2000)
PcaD	enol-lactonase	acide β-cétoadipique énol-lactone	acide β-cétoadipique	(Buchan *et al.*, 2000)
PcalJ	Succinyl-CoA transférase	acide β-cétoadipique	acide β-cétoadipique-CoA	(Buchan *et al.*, 2000)
PcaF	thiolase	acide β-cétoadipique-CoA	Succinyl-CoA + Acétyl-CoA	(Buchan *et al.*, 2000)
CatA	**1,2 dioxygénase**	**catéchol**	**acide muconique**	(Kukor *et al.*, 1988)
CatB	cycloisomérase	acide muconique	Acide muconolactone	(Aldrich *et al.*, 1987)
CatC	isomérase	Acide muconolactone	acide β-cétoadipique énol-lactone	(Kukor *et al.*, 1988)
DmpB	**2,3 dioxygénase**	**catéchol**	**acide 2-hydroxymuconique-6-semialdehyde**	(Shu *et al.*, 1999)
DmpC	tautomérase	acide 2-hydroxymuconique-6-semialdehyde	acide 2-hydroxymuconique	(Shingler *et al.*, 1992)
DmpH	décarboxylase	acide 4-oxalocronique	acide 2-oxopent-4-énoïque	(Shingler *et al.*, 1992)
DmpD	hydrolase	acide 2-hydroxymuconique-6-semialdehyde	acide 2-oxopent-4-énoïque	(Shingler *et al.*, 1992)
DmpE	hydratase	acide 2-oxopent-4-énoïque	acide 4-hydroxy-2-oxovalerique	(Shingler *et al.*, 1992)

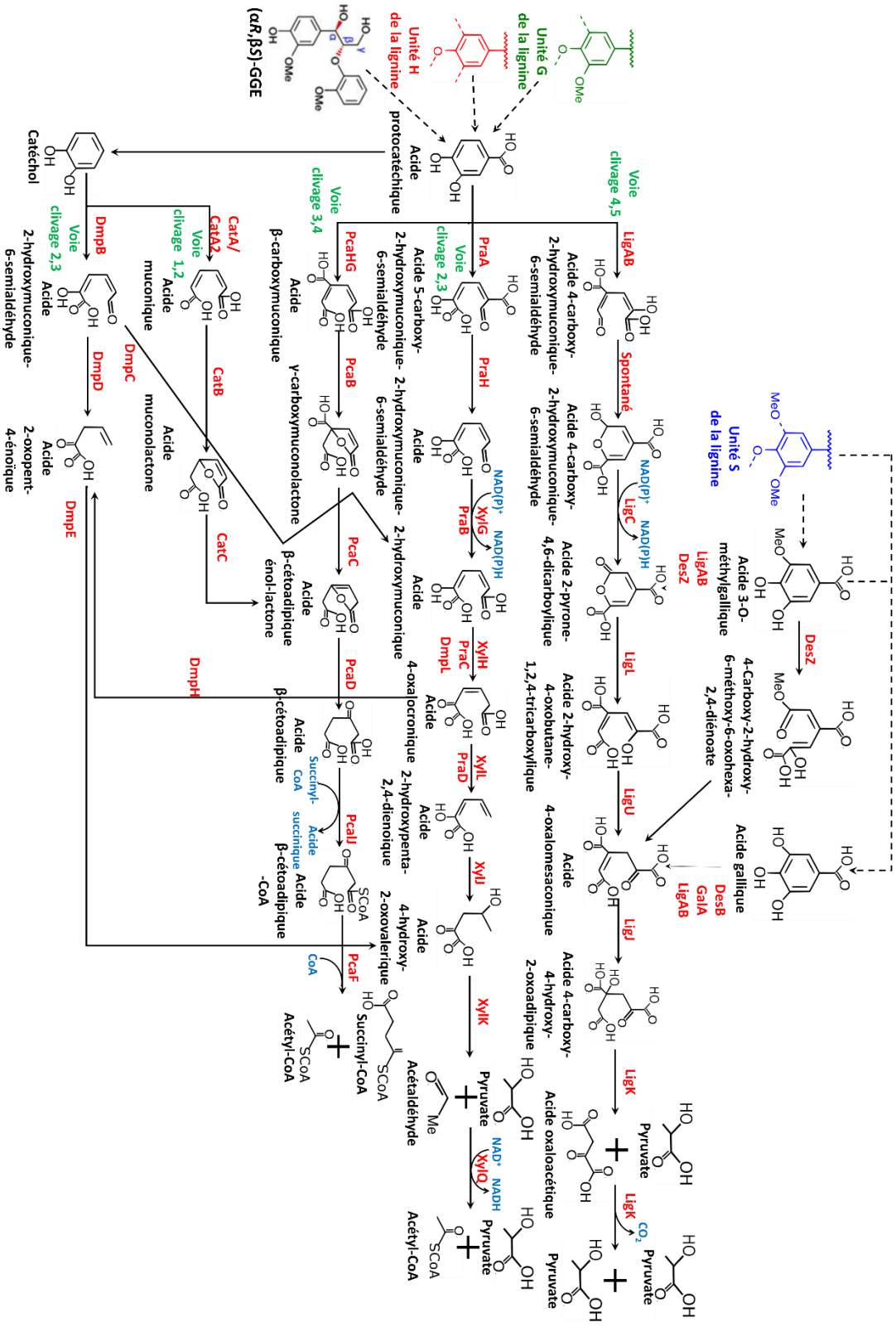


Figure 21 : Voies cataboliques inférieures avec le clivage des intermédiaires centraux (adaptée de Lubbers *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019).

III.2.2.4. Applications des enzymes du catabolisme des molécules aromatiques

Les différentes enzymes impliquées dans les voies de catabolisme des molécules aromatiques peuvent constituer des réservoirs d'enzymes intéressantes pour dégrader les lignines industrielles ou lignines des biomasses lignocellulosiques et produire des molécules chimiques à haute valeur ajoutée soit en utilisant directement les enzymes identifiées soit en modifiant génétiquement des microorganismes pour les rendre capables de cataboliser la lignine et d'accumuler des molécules d'intérêt (Beckham *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019; Kamimura *et al.*, 2019). Ces molécules d'intérêt seront par la suite valorisées dans différents secteurs industriels. Des travaux ont décrit la production de monomères de β-hydroxypropiovanillone, β-hydroxypropiosyringone ou α-(2-méthoxyphénoxy)-β-hydroxypropiovanillone par *Sphingobium* sp. et *Novosphingobium* sp. à partir de dimère de lignine (GGE) (Ohta *et al.*, 2015; Gall *et al.*, 2018). Une approche biocatalytique combinant successivement un système laccase-médiateur, et des β-éthérases a permis la libération de coniferaldéhyde et d'acide syringique à partir de dimère de lignine (Picart *et al.*, 2017).

D'autres études sont plus axées sur la valorisation des monomères dérivés de la lignine, avec par exemple la production d'acide muconique à partir d'acides syringique, vanillique ou *p*-hydroxybenzoïque par *Pseudomonas putida.* L'introduction d'une dioxygénase et d'une O-déméthylase conduisent à des rendements de conversion jusqu'à 75 % (Sonoki *et al.*, 2018; Shinoda *et al.*, 2019). La modification d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* a permis l'accumulation d'acide muconique avec des rendements de 85 $g.l^{-1}$ et 1,8 $g.l^{-1}$ à partir de catéchol et de phénols respectivement (Becker *et al.*, 2018). Une souche de *Pseudomonas putida*, modifiée avec les enzymes issues de *Shingobium* sp. et *Paenibacillus* sp. accumule une quinzaine de composés différents à partir de dérivés de lignine (Johnson *et al.*, 2019). Enfin, l'utilisation d'une approche biocatalytique sans cofacteur avec l'utilisation d'une décarboxylase et d'une dioxygénase a permis la production de vanilline et 4-vinylphénol à partir d'acides férulique et *p*-coumarique (Ni *et al.*, 2018).

IV Microorganismes ligninolytiques et leurs aptitudes à croître sur la lignine

IV.1. Les microorganismes impliqués dans la ligninolyse

La capacité ligninolytique des microorganismes est basée sur plusieurs critères dont l'utilisation des lignines ou des produits aromatiques dérivés de lignines pour leur croissance, la production des enzymes ligninolytiques ou la libération des molécules aromatiques dans le milieu de culture.

La dépolymerisation et la minéralisation microbienne de la lignine ont été largement étudiées chez les champignons responsables de la pourriture blanche et de la pourriture brune (Kirk and Farrell, 1987; Sánchez, 2009; Floudas *et al.*, 2012). D'ailleurs, ces microorganismes ont longtemps été considérés comme les seuls ou les plus aptes à décomposer complètement la lignine dans différents environnements. Leurs actions portent aussi bien sur les lignines natives (présentes dans les biomasses lignocellulosiques) que sur des lignines issues de différents procédés de transformation (Ten Have and Teunissen, 2001; Camarero *et al.*, 2014). De nombreuses espèces de champignons ont démontré des compétences ligninolytiques. Ainsi les taux de délignification chez ces champignons sont importants et varient de 10 à 90 % en fonction des substrats et des conditions (**Tableau 9**). Les enzymes identifiées précédemment, ont un rôle important dans la dépolymérisation. Ainsi, un mutant de *Sporotrichum pulverulentum* sans phénol-oxydases, n'est plus capable de croître sur le bois ou la lignine kraft en comparaison avec la souche sauvage, ce qui souligne l'importance de ces enzymes pour la croissance de ces microorganismes sur les substrats lignifiés (Ander and Eriksson, 1976).

Tableau 9 : Champignons ligninolytiques et leurs substrats.

Champignons	Biomasse	Perte poids ou lignine	Références
Phanerochaete chrysosporium	Lignine kraft	90 %	(Ulmer *et al.*, 1983)
Chrysonilia sitophila	Bois	25 %	(Ferraz and Durán, 1995)
Fusarium proliferatum	Lignin organosolv	10 %	(Regalado *et al.*, 1997)
Pleurotus ostreatus	Liqueur Noire	70 %	(Wu *et al.*, 2005)
Aspergillus sp.	Lignine Kraft	65 %	(Yang *et al.*, 2011)
Phanerochaete chrysosporium	Paille de riz explosé à la vapeur	58 %	(Zhang *et al.*, 2012)
Neurospora discreta	Bagasse de canne à sucre	16 %	(Pamidipati and Ahmed, 2017)

Depuis plusieurs années, l'accent a été mis sur les capacités des bactéries à dégrader ou utiliser la lignine comme source de carbone. En effet de nombreuses bactéries capables de métaboliser les lignines ont été isolées (Ahmad *et al.*, 2010; Bandounas *et al.*, 2011; Z., Xu *et al.*, 2018b). Les technologies de séquençage à haut débit ainsi que les études de biodiversités fonctionnelles ont permis d'identifier des bactéries possédant des potentiels ligninolytiques et de les isoler à partir de divers écosystèmes comme le sol, le bois pourri, les boues activées, les stations d'épuration, les intestins d'animaux, le compost et bien d'autres (Tuomela *et al.*, 2000; Davis and Sello, 2010; R., Xu *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2018). Ces bactéries isolées possèdent un fort potentiel et une grande diversité génétique pour la production d'enzymes ligninolytiques (Strachan *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014; Armstrong *et al.*, 2015; Picart *et al.*, 2015). Les bactéries présentent également d'autres avantages comme des opportunités de culture aisée (une tolérance importante aux métabolites toxiques, au manque de nutriments, au manque d'oxygène et aux fortes densités cellulaires). Certaines bactéries ont également la capacité de résister aux conditions de cultures inhabituelles (hautes températures, pH, concentration élevée en sels…) ce qui confère aux enzymes bactériennes, une meilleure, thermostabilité et halotolérance (Ruijssenaars and Hartmans, 2004; Singh *et al.*, 2007; Niladevi *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2014). Enfin, l'expression des protéines recombinantes et les manipulations génétiques peuvent être plus faciles à mettre en œuvre chez les bactéries (Brown and Chang, 2014b; Ceballos *et al.*, 2017; Brissos *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

IV.2. Physiologie bactérienne en présence de lignines et biomasses lignifiées

IV.2.1. Capacité de croissance des bactéries

La dégradation bactérienne de la lignine a été étudiée chez de nombreuses bactéries principalement issues du sol comme les actinomycètes, les *Pseudomonadaceae*, et les *Bacillaceae* (Zimmermann, 1990; Kirby, 2005; Tian *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2019). Les études de la dégradation des lignines par les bactéries ont été menées en utilisant des lignines natives ou isolées de biomasses lignocellulosiques (graminées, bois) ainsi que des lignines industrielles comme la lignine Kraft (Sainsbury *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Asina *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018b). De nombreux substrats synthétiques (DHP, lignines modèles) possédant les structures et liaisons trouvées au sein des lignines polymériques ont également été utilisées (Kirk and Farrell, 1987; Větrovský *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Gall *et al.*, 2018). Cette dégradation se fait essentiellement en condition aérobie.

La capacité des bactéries à métaboliser les monomères aromatiques a été largement démontrée dans la littérature (Mohan and Phale, 2017; Araki *et al.*, 2019). Par exemple, la bactérie *Sphingobacterium* sp. utilise les acides vanillique, syringique et *p*-coumarique pour sa croissance et *Bacillus subtilis* est capable de produire de la vanilline à partir d'acide férulique avec un rendement molaire supérieur à 60 % (Wang *et al.*, 2018a). Plusieurs études montrent la minéralisation de lignines marquées au ^{14}C en $^{14}CO_2$ (Crawford, 1978; Kerr *et al.*, 1983; McCarthy and Broda, 1984). Ainsi, des espèces de *Nocardia* sp. assimilent des DHP marqués au ^{14}C (Trojanowski *et al.*, 1977). *Pseudomonas* sp. dégrade 20 à 40 % de lignine marquée tout en produisant du $^{14}CO_2$ (Odier *et al.*, 1981).

De nombreuses études ont permis d'identifier des bactéries capables de croître en présence de lignine seule comme source de carbone (Abd-elsalam and El-hanafy, 2009; Chai *et al.*, 2014; Hooda *et al.*, 2015; Mathews *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018b). Ainsi, *Pandorea norimbergensis*, *Pseudomonas* sp et *Bacillus* sp ont été isolées après enrichissement en présence de lignine Kraft. Ces isolats sont capables de se développer en présence de lignine Kraft mais également en présence de monomères phénoliques comme le phénol, et les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique (Bandounas *et al.*, 2011). D'autres espèces de bactéries comme *Bacillus* sp, *Paenibacillus* sp. *Aneurinibacillus aneurinilyticus* dégradent jusqu'à 37, 33 et 30 % respectivement de lignine kraft (Chandra *et al.*, 2007). *Pandorea sp* B6 est aussi capable de croître en présence de lignine Kraft et de décolorer la lignine avec un taux de 41,6% après 7 jours de croissance. Elle produit en même temps de nombreuses molécules aromatiques dans le milieu de culture après croissance (Shi *et al.*, 2013).

Pour certaines souches bactériennes, une source de carbone supplémentaire est requise pour dégrader la lignine ou améliorer sa dégradation. De nombreux sucres, comme le glucose ou le xylose, permettent la croissance de ces bactéries sur des substrats riches en lignine (Sainsbury *et al.*, 2013b; DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Casciello *et al.*, 2017). *Anerinibacillus aneurinilyticus* est capable de réduire le contenu en lignine kraft du milieu de culture de 43 % après 6 jours d'incubation mais uniquement quand la culture est complémentée avec du glucose (Raj *et al.*, 2007).

Cependant, la dégradation bactérienne des lignines polymériques reste limitée comparativement à la dégradation fongique, et la relation entre les activités « ligninolytiques » produites et la dégradation de la lignine reste incertaine et mal comprise (Brown *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014; Z., H., Liu *et al.*, 2019). En effet, la présence de composés phénoliques issus de la lignine dans les milieux de cultures peut aussi être attribuée à la libération de ces produits par

dégradation thermique de la lignine durant la stérilisation nécessaire à la mise en œuvre de ces études physiologiques. Par conséquent, les bactéries peuvent maintenir leur croissance en utilisant ces composés phénoliques disponibles dans le milieu au lieu d'utiliser la lignine polymérique comme source de carbone et d'énergie (Asina *et al.*, 2017).

IV.2.2. Production d'enzymes ligninolytiques en présence de substrats lignifiés

L'étude du potentiel de production d'enzymes ligninolytiques des microorganismes est également un point clé pour évaluer la capacité ligninolytique des bactéries. Des approches de dosage direct des activités ligninolytiques ou des études indirectes permettant d'identifier des enzymes ligninolytiques exprimées (protéomiques, transcriptomiques) sont réalisées après croissance des microorganismes en présence de lignines natives ou de lignines industrielles (Taylor *et al.*, 2012a; DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Jackson *et al.*, 2017; Mathews *et al.*, 2019). De nombreux substrats lignocellulosiques riches en lignines (bois, coproduits agricoles) sont utilisés pour étudier la production microbienne d'enzymes ligninolytiques. La paille de blé par exemple est un excellent inducteur d'enzymes ligninolytiques pour les bactéries (Godden *et al.*, 1989). En effet, de nombreuses bactéries sont capables de croitre sur ce substrat avec des productions d'activités ligninolytiques plus ou moins importantes. Mercer *et al.,* (Mercer *et al.*, 1996), identifie deux souches de *Streptomyces* produisant des activités peroxydases extracellulaires de 0,6 à 1,7 $UI.ml^{-1}$ en présence de paille de blé. Une autre souche de *Streptomyces* a été identifiée avec une activité peroxydase de 0,6 $UI.ml^{-1}$ sur ce même substrat. Cette enzyme a une activité spécifique de 6,2 $UI.mg^{-1}$ après 72 h d'incubation à 30°C sur 0,8 $g.l^{-1}$ de paille de blé (Tuncer *et al.*, 2009).

En présence de ces substrats complexes, une co-production d'enzymes ligninolytiques et lignocellulolytiques (cellulases et hémicellulases comme les endoglucanases, les endoxylanases, les β-glucosidases, les β-xylanases, les β-xylosidases, les arabinofuransidases, les acétyl-estérases, …) est souvent observée. Par exemple, *Cellulomonas* sp. produit des endoglucanases, β-glucosidases et manganèse peroxydases (Emtiazi and Nahvi, 2000). De même, des activités endoxylanases, endoglucanases et peroxydases sont détectées après croissancede *Streptomyces sp*. sur paille de blé par (Tuncer *et al.*, 2004a). Plusieurs de ces études ont également rapporté une relation entre ces activités et la libération d'acides hydroxycinnamiques et de composés aromatiques après croissance bactérienne sur paille de blé (Ball *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 2001; Tuncer and Ball, 2002; Tuncer *et al.*, 2004a).

En ce qui concerne les activités enzymatiques ligninolytiques, elles peuvent aussi être induites par des molécules aromatiques ou d'autres oligomères et polymères aromatiques comme les DHP et la lignine kraft (Chai *et al.*, 2014; Asina *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2016). Ainsi, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, produit des activités lignine peroxydase, manganèse peroxydase et laccase en présence de différents composés aromatiques tels que l'acide férulique, *p*-coumarique et sinapique (Aston *et al.*, 2016). Des activités laccase, lignine peroxydase et manganèse peroxydase de 0,6; 6 et 0,6 $UI.ml^{-1}$ respectivement sont produites en présence de lignine kraft par la bactérie *Pseudomonas putida* (Xu *et al.*, 2018b). *Cupriavidus basilensis* et *Pandoraea* sp. *B-6* produisent respectivement des peroxydases et des laccases à hauteur de 1,7 et 0,8 $UI.ml^{-1}$ (*C. basilensis*) et 2,2 et 1,1 $UI.ml^{-1}$ (*Pandoraea* sp.) en présence de lignine kraft (Shi *et al.*, 2013a; Shi *et al.*, 2013b).

IV.2.3. Approches omiques et identification de nouvelles enzymes ligninolytiques

Pour identifier les enzymes ayant un impact sur la ligninolyse bactérienne, plusieurs stratégies basées sur l'utilisation des outils « omiques » ont été utilisées. L'essor du séquençage des génomes de bactéries capables de croître ou d'utiliser la lignine ont permis d'identifier de nombreux gènes candidats potentiels pour l'utilisation efficace des lignines (McLeod *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2014; Armstrong *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018). Plusieurs séquençages de souches bactériennes ligninolytiques comme *Pantoea ananatis*, *Anoxybacillus* sp., *Pandoraea* sp. ou encore *Tolumonas lignolytica,.* ont permis récemment d'enrichir les bases de données en enzymes ligninolytiques (Billings *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Alkahem Albalawi *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Par la suite, l'utilisation de méthodes de transcriptomiques ou protéomiques permettent d'identifier plus spécifiquement les gènes ou des protéines impliqués dans la ligninolyse issus des génomes annotés (Pan *et al.*, 2008; Adav *et al.*, 2010; D'haeseleer *et al.*, 2013; DeAngelis *et al.*, 2013; Zurawski *et al.*, 2015; Raut *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017; Alessi *et al.*, 2017; Alessi *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2019). Ainsi, de nombreuses oxydoréductases comme des peroxydases, des laccases sont exprimées par les bactéries cultivées en présence de nombreux substrats lignifiés (Brown *et al.*, 2011; DeAngelis *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2017; Mathews *et al.*, 2019). D'autres oxydoréductases pouvant présenter des intérêts pour la dégradation et le catabolisme intracellulaire des molécules aromatiques ou de la lignine sont également identifiées et sur-exprimées en présence de substrats lignifiés, comme des catalase/peroxydases, des déshydrogénases, des cytochromes c oxydases… (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Enzymes surexprimées identifiées par des analyses « Omics ».

Bactéries	Substrat	Protéines d'intérêts	Références
Amycolatopsis sp. 75iv2 ATCC	Miscanthus	Catalase/peroxydase	(Brown *et al.*, 2011)
Enterobacter lignolyticus SCF1	Lignine kraft	Catalase/peroxydase NADH-quinone-oxydoréductase Glutathion S-transférase	(DeAngelis *et al.*, 2013)
Clostridium acetobutylicum	Lignine kraft	Aldéhyde-alcool déshydrogénase Thioredoxin Thiolase Glutathion peroxydase Thioredoxin réductase	(Raut *et al.*, 2016)
Pantoea ananatis	Paille de riz	Catalase/peroxydase NADH-quinone-oxydoréductase	(Ma *et al.*, 2016)
Microbiote de Compost de séquoia	Copeaux de bois de sapin	Catalase/peroxydase Hydroperoxyde d'alkyle réductase Glutathion peroxydase	(Ceballos *et al.*, 2017)
Bacillus ligniniphilus	Lignine kraft	Peroxiredoxin Ferredoxin Cytochrome c oxydase	(Zhu *et al.*, 2017)
Pandoraea sp.	Lignine kraft ou acide vanillique	Hydroperoxyde d'alkyle réductase NADH-quinone-oxydoréductase Cytochrome c oxydase Glutathion peroxydase Thioredoxin	(Kumar *et al.*, 2018)
Cedecea lapagei	Liqueur noire	Alcool Deshydrogénase Hydroperoxyde d'alkyle réductase Thioredoxin Catalase/peroxydase	(Mathews *et al.*, 2019)

V. *Thermobacillus xylanilyticus*, une bactérie d'intérêt pour la ligninolyse

V.1. Origine et caractéristiques de la bactérie

La bactérie *Thermobacillus xylanilyticus* (*TX*) a été isolée à partir d'un échantillon de sol prélevé sous un tas de fumier dans le nord de la France (Samain *et al.*, 1991a). Cette bactérie est déposée à la Collection Nationale de Cultures Microbiennes (CNCM I-1017). Au niveau morphologique, les cellules sont sous forme de bâtonnets mesurant de 0,5 à 2,5 µm, et sont souvent isolées, par paires ou parfois en chaînette (**Figure 22**). Après croissance, les cellules de *TX* forment des spores ellipsoïdales terminales ou subterminales (Samain *et al.*, 1991b; Touzel *et al.*, 2000). *TX* est strictement aérobie, Gram-positive et non mobile, avec une activité catalase positive, contrairement aux activités oxydases et uréases. Le CO_2 ainsi que le bicarbonate se sont révélés être nécessaires pour sa croissance, en effet leur absence entraîne une augmentation de la phase de latence et une croissance globale plus faible. *TX* est capable d'assimiler un grand nombre de sucres dont le xylose, le glucose et les polymères comme le xylane. C'est une bactérie modérément thermophile avec une température optimale de croissance de 55°C (Touzel *et al.*, 2000).

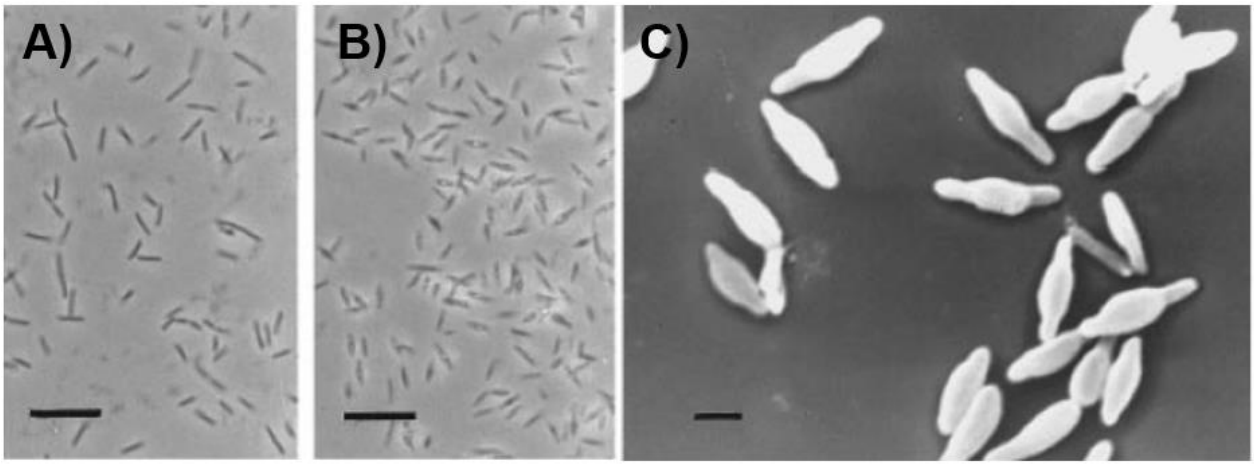


Figure 22 : Images de microscopie optique de la souche *Thermobacillus xylanilyticus* (Barre = 2 mm). A) Cellules à l'état végétatif. B) Cellules en cours de sporulation. C) Cellules en phase de croissance exponentielle tardive observées en microscopie électronique à balayage (adaptée de Touzel *et al.*, 2000).

V.2. Potentiel enzymatique de *TX* et fractionnement des biomasses lignocellulosiques

T. xylanilyticus est une bactérie hémicellulolytique. Elle excrète une grande quantité d'activité xylanase sans produire d'activité cellulase (Samain *et al.*, 1997). *TX* est capable de fractionner les arabinoxylanes des biomasses lignocellulosiques grâce à plusieurs catégories d'activités et d'enzymes hémicellulolytiques (glycoside hydrolases GH ou Carbohydrate Esterases CE). Ces enzymes peuvent être utilisées soit dans des cocktails complexes soit sous forme d'enzymes pures (Remond-Zilliox *et al.*, 1997; Zilliox and Debeire, 1998; Lequart *et al.*, 1999; Benamrouche *et al.*, 2002; Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Les xylanases réduisent la chaine principale de xylane en oligomères de faibles degrés de polymérisation (xylobiose, xylotriose, xylotétraose et xylopentose) en clivant les liaisons β-1,4 entre les unités xyloses. Les xylanases appartiennent aux familles 10 et 11 des Glycosyde Hydrolases principalement (Henrissat, 1991). Les enzymes débranchantes peuvent cliver d'autres liaisons plus spécifiques des sucres substituant la chaine principale des arabinoxylanes (Sunna and Antranikian, 1997; Lagaert *et al.*, 2014). Les arabinofuranosidases coupent les liaisons α 1,3 ou α 1,5 entre les D-xyloses et les L-arabinoses. Les estérases comme les acétyle-xylane estérases déacétylent les xylooligosides. Les féruloyl-estérases sont capables de couper les liaisons ester entre les acides phénoliques et des résidus arabinoses. Les xylosidases convertissent en xyloses les extrémités non réductrices des xylanes, ou les xylooligosides produits par l'action des xylanases. La xylanase de la famille des GH11 de *TX* (Tx-xyn11) est secrétée dans le milieu extracellulaire et possède une haute thermostabilité (à 60°C, l'activité résiduelle est de 60 à 70 % après 24 heures d'incubation, alors qu'à 75°C et 80°C, les demi-vies sont de 40 et 25 minutes respectivement), ainsi qu'une bonne résistance à l'alcalinité (Debeire-Gosselin *et al.*, 1992; Samain *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1997; Connerton *et al.*, 1999). Ces caractéristiques sont intéressantes pour des applications en particulier dans l'industrie de la pâte à papier où le blanchiment de la pâte nécessite des xylanases hautement spécifiques et pures (Viikari *et al.*, 1994; Beg *et al.*, 2001; Haki and Rakshit, 2003). Cette enzyme très efficace a été utilisée dans plusieurs études de fractionnement de la biomasse lignocellulosique seule ou en association avec différents prétraitements. Tx-xyn11 est capable de libérer 49 % des arabinoxylanes du son de blé (Beaugrand *et al.*, 2004a; Rakotoarivonina *et al.*, 2014). Des combinaisons de prétraitements à l'ammoniaque ou aux liquides ioniques avec Tx-xyn11 sur la paille de blé ont permis d'optimiser la libération des sucres, avec des rendements d'hydrolyse de 56 et 97.6 % respectivement (Rémond *et al.*, 2010; Husson *et al.*, 2018).

Par ailleurs, *TX* dispose de plusieurs enzymes hémicellulolytiques telles qu'une endoxylanase de la famille des GH10, une arabinofuranosidase AbfD3 Txyl-Abf51 (GH51) et une féruloyl-estérase Tx-est1 (CE1) qui ont été purifiées et caractérisées (Debeche *et al.*, 2000; Rakotoarivonina *et al.*, 2011). Les enzymes débranchantes de *TX* seules sont peu actives sur les biomasses lignocellulosiques. L'arabinofuranosidase AbfD3 présente une faible activité débranchante sur le son de blé, moins de 1% de l'arabinose total est libéré. Par contre, elle est très active en présence de xylooligosides (Rémond *et al.*, 2008). Tx-est1 libère moins de 1% des acides férulique et *p*-coumarique du son de blé (Rakotoarivonina *et al.*, 2011). L'association des différentes enzymes pures (xylanases, arabinosidases et estérases) ou sous forme de cocktails complexes sont efficaces pour fractionner la paille et son de blé sans d'autres prétraitements, et permet de libérer des pentoses (xylose et arabinose) en quantité importante (Rakotoarivonina *et al.*, 2011; Rakotoarivonina *et al.*, 2014; Rakotoarivonina *et al.*, 2016). L'utilisation des cocktails complexes de *TX* permet également d'hydrolyser le son de blé et de libérer de l'acide férulique qui peut être récupéré par différents procédés de séparation (Dupoiron *et al.*, 2017; Dupoiron *et al.*, 2018).

L'arsenal enzymatique de *TX* est fortement dépendant du substrat de croissance utilisé (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Cette bactérie est capable de croître sur glucose, xylane, son et paille de blé non pré-traitée avec des taux de croissance aussi importants en présence de biomasse lignocellulosique (son de blé) qu'en présence de xylane. Les biomasses lignocellulosiques induisent la production d'enzymes hémicellulolytiques mais les activités qui sont produites par la bactérie varient en fonction du substrat en présence (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2016). L'activité xylanase est toujours la principale activité détectée, mais il a été observé des changements au niveau de la production d'enzymes débranchantes. Les activités estérases sont importantes dans les cultures en présence de paille de blé, alors qu'en présence de son de blé, les activités arabinosidases sont prédominantes. On observe également une dynamique dans la production temporelle de ces différentes activités hémicellulolytiques. Les activités xylanases sont maximales en début de phase stationnaire de croissance alors que les activités débranchantes sont détectées dès le début de la phase exponentielle de croissance en présence de son et paille de blé. Ce profil de production d'activité est corrélé avec l'expression des gènes codant les deux xylanases, l'arabinosidase et l'esterase de *TX* pendant la croissance sur ces deux substrats.

Le séquençage du génome de la bactérie ainsi que son annotation a permis de mettre en évidence 90 gènes codant pour des Glycosyde Hydrolases, 32 gènes codant pour des Carbohydrate Estérases, 44 gènes codant pour des Glycosyl Transférases et 3 gènes codant pour des Polysaccharides Lyases (**Tableau 11**). Par ailleurs, 155 oxydoréductases ont été annotées et parmi lesquelles on retrouve des peroxydases, plusieurs « multicopper oxidases », des enzymes accessoires putatives (aryl alcool oxydases, alcool déshydrogénase, quinone déshydrogénase,…) ou encore des enzymes qui pourraient être impliquées dans les métabolismes intracellulaires des molécules aromatiques (comme les dioxygénases). Certaines de ces enzymes portent les signatures d'activités auxiliaires (**Tableau 12**). Une étude transcriptomique par séquençage des ARN messagers de *TX* cultivée en présence de xylane, paille de blé et son de blé a révélé la surexpression de 24 oxydoréductases en présence de paille de blé un substrat riche en lignine (Meline *et al.,* en préparation).

Tableau 11 : Gènes codant pour des enzymes d'intérêt chez *TX* (adaptée de Meline *et al.,* en préparation)

Enzymes	Nombre	Caractérisée
Glycosyl hydrolases	90	3
Carbohydrate estérases	32	1
Glycosyl transférases	44	/
Polysaccharides lyases	3	/
Oxydoréductases	155	/

Tableau 12 : Gènes codant pour des oxydoréductases d'intérêt chez *TX* (adaptée de Meline *et al.,* en préparation)

Gène identifiés	Identifiant protéine	Activités Auxiliaires (AA)	Annotation Actuelle
TXYL_03575	Txyl#0563	AA6	1-4 Benzoquinone reducatse
TXYL_05065	Txyl#1179	AA6	FMN-dependante azoréductase
TXYL_06510	Txyl#1364	AA1	Multicopper-oxydase
TXYL_17475	Txyl#3231	AA2	Peroxydase
TXYL_19475	Txyl#3577	AA3	Amine oxydase
TXYL_19190	Txyl#3719	AA4	Vanilyl-alcool oxydase
TXYL_10985	Txyl#2182	AA12	

Problématique

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de la valorisation totale de la biomasse lignocellulosique dans les bioraffineries. La récalcitrance de ces biomasses nécessite des procédés drastiques pour permettre la séparation des constituants et/ou leur dépolymérisation et ainsi la valoriser. Actuellement, les procédés industriels que ce soit pour la production de biocarburants ou de papier consistent à délignifier la biomasse pour récupérer les fibres cellulosiques et/ou les sucres qui seront transformés en éthanol. Ces procédés nécessitent des traitements thermiques, chimiques ou mécaniques qui sont énergivores, polluants et non spécifiques. De plus ils génèrent des coproduits fortement lignifiés, notamment la lignine kraft dans l'industrie papetière et la biomasse explosée à la vapeur dans les unités de bioéthanol actuellement en développement. Ces coproduits sont généralement brulés pour la production d'énergie. Or, cette valorisation n'est pas optimale car ces coproduits, riches en lignine, pourraient fournir une large gamme de molécules aromatiques qui sont actuellement produites par l'industrie pétrochimique. C'est pourquoi, aujourd'hui, de nombreuses études cherchent à déconstruire la biomasse lignocellulosique ou dépolymériser les lignines industrielles pour les valoriser par des voies biologiques qui sont moins énergivores, plus spécifiques et plus respectueuses de l'environnement.

Ces traitements biologiques sont différenciés en deux voies, la dégradation microbiologique et la biocatalyse qui consistent à utiliser les enzymes produites par les microorganismes capables d'utiliser la biomasse lignocellulosique ou la lignine et ses dérivés comme source d'énergie pour leur croissance. En l'état actuel des connaissances, de nombreux verrous technologiques empêchent leurs applications industrielles, notamment l'identification de microorganismes (isolés ou consortia) capables de délignifier les biomasses lignocellulosiques en épargnant ou en limitant l'utilisation des sucres, ou encore l'identification d'une enzyme ou de cocktails enzymatiques capables de déconstruire/dépolymériser efficacement les biomasses ou les lignines industrielles issues des bioraffineries. C'est pourquoi, les études actuelles se concentrent sur l'exploration de nouveaux microorganismes capables de métaboliser la lignine ou ses constituants; ces microorganismes pourront par la suite servir de réserve génétique pour l'identification et la production d'enzymes pour la biocatalyse. Dans un même temps, les voies microbiennes de catabolisme interne des composés aromatiques impliquent de nombreuses oxydoréductases qui peuvent être exploitées pour permettre d'identifier de biocatalyseurs efficaces pour dépolymériser les biomasses lignocellulosiques et les lignines.

Objectifs

Thermobacillus xylanilyticus (*TX*) est une bactérie hémicellulolytique capable de croître sur un certain nombre de biomasse lignocellulosique. Le séquençage du génome a récemment permis d'identifier un grand nombre d'oxydoréductases ayant un potentiel ligninolytique. Ses capacités hémicellulolytiques couplées à son potentiel ligninolytique en font donc un candidat naturel pour la valorisation de la biomasse et de la lignine dans le cadre de la bio-raffinerie du futur.

C'est pourquoi, le projet LIGNOFRAC avait pour ambition d'évaluer le potentiel ligninolytique de cette bactérie pour la dépolymérisation de la lignine et le catabolisme de celle-ci et de ses dérivés, la production de molécules aromatiques de faibles masses moléculaires à partir de divers substrats riches en lignine et ainsi contribuer plus largement à la valorisation de l'ensemble de la biomasse lignocellulosique aromatique.

Questions scientifiques

L'évaluation de ce potentiel ligninolytique se décline à travers plusieurs questions auxquelles nous essayerons de répondre dans ce mémoire :

1) *TX* est-elle capable de croître sur des substrats lignifiés ?

2) Cette croissance conduit-elle à la production d'activités oxydoréductases ?

3) Ces activités enzymatiques permettent-elles de dépolymériser les substrats lignifiés et de produire des molécules aromatiques ?

4) Quelles sont les oxydoréductases produites par *TX* en présence de substrats lignifiés ?

Matériel et Méthodes

I : Nature et caractérisation des substrats lignifiés

I.1. Nature des substrats

Trois substrats lignifiés sont utilisés dans cette étude (**Figure 23**) :

-Paille de blé (PB) : (variété Apache) fournie par la société ARD (Pomacle, France) sous forme de particules de taille variant de 0,5 mm à 2 mm. Elle est issue de différentes parties de la plante (feuilles, nœuds, entre-noeuds).

-Paille traitée par explosion à la vapeur (PBEV) : le traitement a été effectué à l'IFPEN (IFP Energie nouvelles) selon les conditions décrites précédemment (170 °C; 7,5 min; 0,35 % H_2SO_4) (Paës *et al.*, 2019). Les résidus ont été lavés à l'eau et séchés à 50°C (Auxenfans *et al.*, 2017) et sont sous forme d'une fine poudre de particules ; 90% des particules ont une taille inférieure à 100 µm (Paës *et al.*, 2019).

-Lignine kraft (LK) : commercialisée par Sigma Aldrich (471003; France). Selon la fiche technique du fournisseur, ce substrat a une faible teneur en sulfonates (< 3,6 %) et en eau (3 %) et ne contient pas de sucres.

Figure 23 : Présentation des substrats riches en lignine utilisés dans cette étude.

I.2. Composition en glucides

I.2.1. Hydrolyse acide

La composition en glucides est déterminée après hydrolyse acide des différents substrats lignocellulosiques. Les échantillons (10 mg) subissent une première étape de gonflement en présence de 125 µl d'acide sulfurique à 72 % (12 M) pendant 2 h sous agitation à 20°C. L'acide est ensuite dilué à 1 M et l'hydrolyse acide se poursuit pendant 2 h sous agitation magnétique à 100°C. Les tubes sont placés dans un bain de glace pour arrêter la réaction, puis les hydrolysats sont centrifugés 5 min à 10 000 tours.min^{-1} (Belmokhtar *et al.*, 2013). Le surnageant est prélevé pour l'analyse des sucres monomères par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'anions avec détection ampérométrique pulsée.

I.2.2. Analyse des monosaccharides par chromatographie liquide HPAE-PAD

Les sucres monomères libérés par hydrolyse acide sont séparés, identifiés et quantifiés par chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions avec détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD). La chromatographie HPAE-PAD utilise la nature faiblement acide des glucides (monosaccharides, oligosaccharides, sucres acides, sucres alcools) pour les séparer sélectivement en utilisant une phase stationnaire greffée avec des échangeurs d'anions forts. Les glucides sont détectés par ampérométrie en mesurant le courant électrique généré par leur oxydation à la surface d'une électrode en or.

Une fraction du surnageant (200 µl) issu de l'hydrolyse acide des substrats est additionnée d'eau ultra pure et 200 µl de solution de 2-déoxy-D-ribose (330 $\mu g.ml^{-1}$ en concentration finale) utilisée comme étalon interne pour un volume final de 1,5 ml. Le mélange est filtré sur filtre PTFE de porosité 0,45 µm et placé dans un flacon adapté au système analytique, avant d'être injecté sur une colonne CarboPac PA-1 échangeuse d'anions de 4 × 250 mm (Thermo Fisher Scientific, Dionex) maintenue à 22°C. L'élution est effectuée à un débit de 1,2 $ml.min^{-1}$ avec différents solvants (eau ultra pure, mélange de 300mM d'acétate de sodium et 300 mM d'hydroxyde de sodium, 300 mM d'hydroxyde de sodium) afin de séparer les sucres neutres et les acides uroniques. Les sucres monomères sont détectés en sortie de colonne à l'aide du 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 $ml.min^{-1}$. Les sucres monomères sont identifiés et quantifiés sur la base de leur temps de rétention par l'analyse de solutions standards de concentrations croissantes contenant l'étalon interne (2-déoxy-D-ribose) et différents sucres de référence (D-fucose, D-arabinose, L-rhamnose, D-galactose, D-glucose, D-xylose, D-mannose, acide D-galacturonique, acide D-glucuronique). Ceci permet de définir un coefficient de réponse pour chaque composé (Herbaut *et al.*, 2018).

Les potentiels en glucanes (cellulose) et en hémicelluloses des substrats sont calculés à partir des teneurs en sucres monomères mesurés par HPAE-PAD (Sluiter *et al.*, 2008). Ce calcul tient compte de la perte d'une molécule d'eau liée aux liaisons glycosidiques:

Potentiel en glucane = teneur en glucose x 0,90

Potentiel en hémicellulose = teneur en (xylose + arabinose) x 0,88

I.3. Composition en composés phénoliques

Les acides phénoliques des substrats lignocellulosiques sont quantifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) après un traitement alcalin de sévérité croissante permettant de libérer soit les formes liées en esters soit l'ensemble des formes associées en liaisons esters et éthers (Iiyama *et al.*, 1990; Belmokhtar *et al.*, 2013).

I.3.1 Hydrolyse alcaline douce

Les acides phénoliques liés en esters dans les substrats lignocellulosiques sont libérés après une hydrolyse alcaline de 40 mg à 35°C pendant 2 h sous agitation à 200 rpm et en présence de NaOH 2 M placé sous atmosphère azotée pour éliminer l'O_2 évitant l'oxydation des phénols libérés. Cette hydrolyse provoque la rupture des liaisons esters dans le substrat, permettant la libération des monomères phénoliques. L'hydrolyse est ensuite laissée 10 min au repos à température ambiante, avant ajout de l'étalon interne, l'acide 3,4,5-triméthoxycinnamique, à une concentration finale de 5 $\mu g.ml^{-1}$ et acidification à pH 1 à l'aide d'une solution d'HCl 6 M pour faciliter leur extraction en phase organique. Les monomères phénoliques sont extraits de la phase aqueuse par 3 extractions successives à l'éther diéthylique. Les phases organiques sont recueillies sur sulfate de sodium puis évaporées à sec à 40°C sous pression de 700 mbar. Le résidu est repris dans 1,5 ml de mélange méthanol/eau (50/50) avant d'être filtré à 0,45 µm et transféré en flacon adapté puis analysé en CLHP en phase inverse.

I.3.2 Hydrolyse alcaline sévère

Les acides phénoliques liés en éthers et en esters des substrats lignocellulosiques sont analysés de la même manière que les acides phénoliques liés en esters sauf que les substrats subissent une hydrolyse de 2 h à 170°C en présence de NaOH 4 M dans une gaine en téflon placée dans un réacteur de minéralisation (Parr). Les solutions de soude sont préalablement placées sous atmosphère azotée. Après refroidissement des milieux réactionnels à 4°C, les acides phénoliques sont isolés comme précédemment avant analyse en CLHP. Les monomères phénoliques liés en éthers sont quantifiés par différence entre les teneurs en acides phénoliques totaux et estérifiés.

I.3.3 Quantification des monomères phénoliques par chromatographie liquide en phase inverse

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse est une technique analytique permettant de séparer les molécules en fonction de leur polarité. La phase mobile (mélange eau solvant) va entrainer l'échantillon dans la colonne qui est la phase stationnaire. Au cours de l'analyse, la composition de la phase mobile est modifiée selon un gradient qui permet d'éluer progressivement les molécules. Les composés phénoliques sont détectés en sortie de colonne par un détecteur UV.

Les échantillons sont analysés comme décrit par Beaugrand *et al* (2004b). Brièvement, ils sont injectés sur une colonne Sphérisorb S5 ODS2, 4,6 x 250 mm, 5µm (Waters, Life Sciences) maintenue à 30°C (Beaugrand *et al.*, 2004b). L'élution est réalisée à un débit de 1 $ml.min^{-1}$ avec le solvant A (eau ultra pure à 90 %, acétonitrile 10 % et acide orthophosphorique 1 ‰), le solvant B (méthanol 80 %, eau ultra pure 20 % et acide orthophosphorique 1 ‰), le solvant C (acétonitrile 80, Eau ultra pure 20 % et Acide orthophosphorique 1 ‰) et le solvant D (Eau ultra pure 95 % et acétonitrile 5 %). Les composés élués sont détectés en sortie de colonne entre 200 et 380 nm avec une résolution de 1,2 nm à l'aide d'un détecteur à barrette de diode Waters 996. Les composés phénoliques sont identifiés et quantifiés sur la base de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption par l'analyse en CLHP de solutions de phénols de référence (Beaugrand *et al.*, 2004b).

I.4. Teneurs en lignine

La teneur en lignine des échantillons est déterminée par une méthode spectrophotométrique après solubilisation des échantillons par le bromure d'acétyle en milieu acide (Johnson *et al.*, 1961). Le bromure d'acétyle en présence d'acide acétique conduit à des réactions d'acétylation et bromination des résidus lignocellulosiques, provoquant la rupture de liaisons covalentes au sein des polymères et leur solubilisation. Les échantillons (10 mg) sont solubilisés pendant 30 min à 70°C par 5 ml de réactif (bromure d'acétyle à 25 % v/v dans l'acide acétique). Après refroidissement, une fraction du milieu réactionnel (1 à 3 ml selon la teneur en lignine) est transférée dans un tube gradué contenant 5 ml de soude 2 M et 6 ml d'acide acétique. Le volume est ajusté à 20 ml puis les solutions sont placées à l'obscurité pendant 45 minutes avant mesure de l'absorption à 280 nm au spectrophotomètre (Belmokhtar *et al.*, 2013). La teneur en lignine est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de lignine de graminée (20 $l.g^{-1}.cm^{-1}$) (Iiyama and Wallis, 1988).

II : Cultures de *TX* en présence de substrats lignifiés

II.1. Mise en culture de la bactérie

II.1.1. Milieu de culture de la bactérie

La bactérie *Thermobacillus xylanilyticus* (*TX*) est cultivée sur un milieu de base (MB) contenant des macro- et micro-minéraux, des traces minérales, des vitamines, une source d'azote (NH_4Cl 1 g.l^{-1}) et de l'extrait de levures (2 g.l^{-1}) comme décrit par Touzel *et al.,* 2000 (**Tableau 13**). Ce milieu est tamponné avec du bicarbonate de potassium ($KHCO_3$, 5 g.l^{-1}). La composition des différents constituants du milieu de base est présentée dans le **Tableau 13**. Les cultures sont effectuées dans des bouteilles de 100 ml ou 500 ml scellées contenant 10 ml ou 50 ml de volume utile de MB respectivement et complémenté avec les différentes sources de carbone (C) (glucose, PB, PBEV, LK, xylane) à 5 g.l^{-1} ou 2,5 g.l^{-1} ou 1 g.l^{-1} selon les expérimentations. Pour finir, 10 % (v/v) de CO_2 sont ajoutés pour permettre une croissance optimale des bactéries et le contenant est scellé avec un septum avant autoclavage à 121°C pendant 20 min (Touzel *et al.*, 2000).

Tableau 13 : Composition macro-minéraux, vitamines et en traces minérales du milieu de culture.

Macro-minéraux (mg.l^{-1})		Vitamines (µg.l^{-1})		Traces minérales (mg.l^{-1})	
KH_2PO_4	300	Acide Folique (B9)	2	$C_6H_9N_1O_6$	128
NaCl	600	Acide Lipoïque	5	$FeCl_3$, $6H_2O$	13,5
$MgSO_4$, $7H_2O$	120	Biotine (B8)	2	$MnCl_2$, $4H_2O$	1
$CaCl_2$, $2H_2O$	80	Pyridoxine (B6)	10	$CoCl_2$, $6H_2O$	0,24
		Thiamine (B1)	5	$CaCl_2$, $2H_2O$	1
		Riboflavine (B2)	5	$ZnCl_2$ anhydre	1
		Acide nicotinique (B3)	5	$CuCl_2$, $2H_2O$	0,25
		Acide pantothénique (B5)	5	H_3BO_3	0,1
		Cobalamine (B12)	0,1	Na_2MoO_4	0,24
		Acide 4-aminobenzoïque	5	NaCl	10
				Na_2SeO_3, $5H_2O$	0,26
				$NiCl_2$, $6H_2O$	1,2

II.1.2. Croissance microbienne en présence de substrats complexes

La bactérie *TX* est stockée sous forme de spores à 4°C. Dans un premier temps, il faut effectuer une culture de régénération qui consiste à ensemencer à 1 % (vol/vol) trois milieux MB contenant du glucose (5 g.l^{-1}) comme source de carbone, avec des dilutions entre 10^{-4} et 10^{-6} des spores. (**Figure 24A**). La culture est incubée une nuit à 50°C et sous agitation à 150 rpm. La régénération de cette bactérie conduit à des cellules en phase végétative (non sporulées) permettant d'ensemencer une pré-culture (MB – glucose) à 1 % (v/v) pendant 2 à 5 h. Pour vérifier l'état de la pré-culture (forme végétative et phase exponentielle), un suivi de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) au spectrophotomètre (Uvikon 9X3 W) est réalisé et les cellules sont observées au microscope optique avec un grossissement X 100 en immersion (5 µl de milieu de culture

déposés entre une lame en verre et une lamelle). Ces observations visent à évaluer l'état des cellules, en particulier si elles sont en sporulation ou sous forme végétative. La pré-culture est arrêtée quand une DO_{600nm} est obtenue entre 1,5 et 2 et que les cellules ne sporulent pas.

La pré-culture de *TX* en phase exponentielle de croissance sert à ensemencer en triplicat les milieux de culture contenant les différents substrats (xylane, substrats lignifiés 5 $g.l^{-1}$) ou les cultures complémentées avec du xylane 2,5 $g.l^{-1}$ (50 %) ou 1 $g.l^{-1}$ (20 %) en utilisant un inoculum de 1 % (vol/vol). Ces cultures sont incubées 30 h à 50°C et 150 rpm, avec des prélèvements de 1 ml toutes les 5 h pour permettre les suivis de croissance de la bactérie ainsi que leur état physiologique (présence de spores et forme végétative) (**Figure 24B**). Des milieux de culture contenant les sources de carbone adéquates mais non inoculés sont incubés dans les mêmes conditions. Ces milieux sont utilisés comme témoins (blancs) pour toutes les expérimentations (**Figure 24B**).

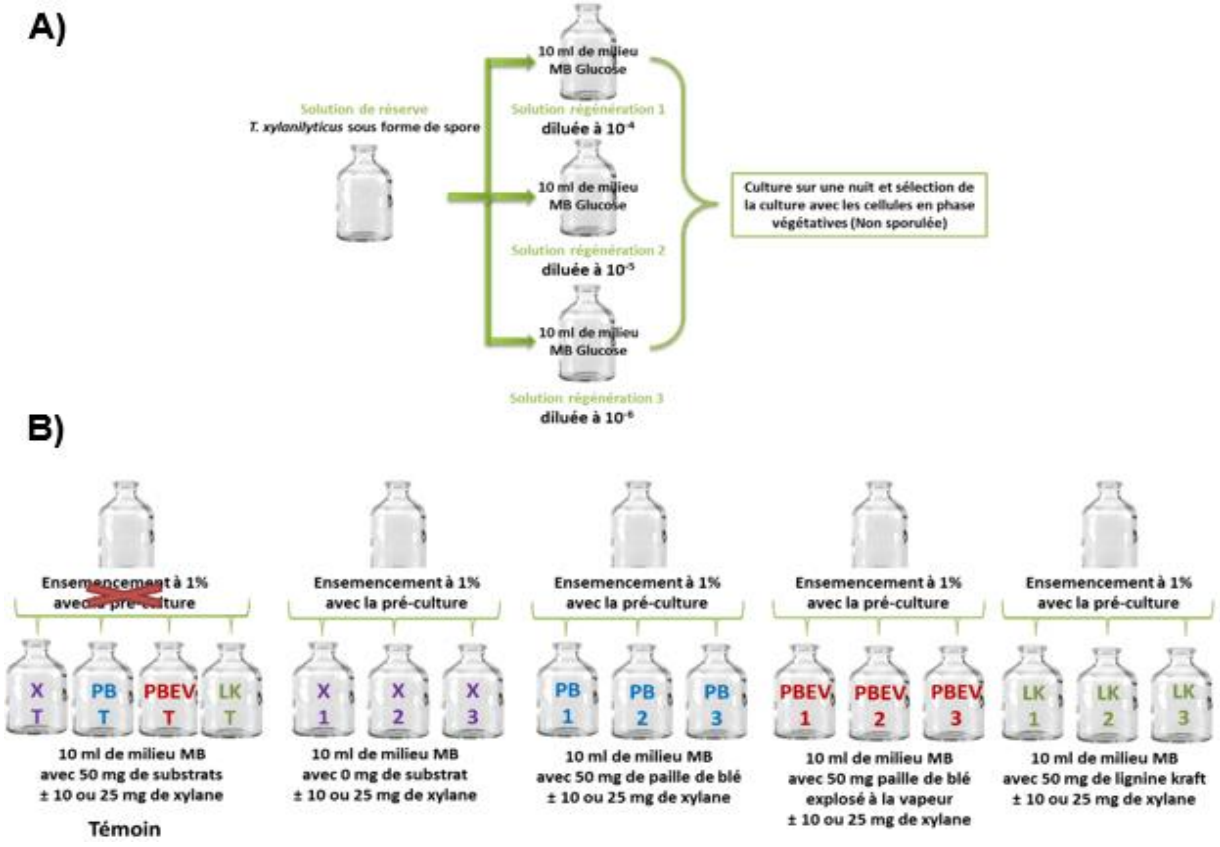


Figure 24 : A) Régénération de la souche XE de *TX* pour la pré-culture. B) Culture de *TX* en présence des substrats lignifiés : témoins (T), xylane (X), paille de blé (PB), paille de blé explosée à la vapeur (PBEV) et lignine kraft (LK).

II.1.3. Préparation des différents échantillons issus des cultures microbiennes

II.1.3.1. Récupération des résidus issus des milieux de culture

Une fois les cultures arrêtées (après 30 h de croissance), les phases liquides (milieux de culture + bactéries) sont transférées dans des tubes de 15 ou 50 ml pour laisser les résidus PB et PBEV dans les bouteilles de milieux de culture. Les résidus sont remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée et transvasés dans des tubes de centrifugation. Après trois lavages successifs dans 5 ml d'eau distillée puis centrifugation 5 min à 5500 rpm, les résidus sont séchés dans une étuve ventilée à 45°C pendant 24 à 48 h puis conservés à 4°C dans des récipients.

Les résidus de LK étant en partie solubles dans le milieu de culture, il est nécessaire pour les analyser, de passer par une étape de lyophilisation. Pour cela, 3 ml de milieu de culture sont centrifugés à 5500 rpm pendant 10 min pour éliminer les bactéries et ensuite, le surnageant est lyophilisé pendant 24 h pour récupérer les résidus. Une fois déshydratés, ces résidus sont conservés à 4°C.

II.1.3.2. Préparation des extraits intracellulaires et extracellulaires

Ces extraits ont été préparés avec les différents prélèvements effectués (toutes les 5 h). Le milieu de culture correspondant à 500 µl, toutes les 5 h, puis 7 ml en fin de culture, est centrifugé à 5500 rpm pendant 10 min pour séparer le culot cellulaire du milieu extracellulaire. Ces extraits extracellulaires sont directement stockés à -20 °C. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans 1ml de tampon Tris-HCl 25 mM à pH 7. Les cellules sont cassées mécaniquement pour libérer les protéines intracellulaires, à l'aide d'un homogénéiseur FastPrep-24™ 5G (MP biomedicals). Pour cela, 600 mg de billes de verres de diamètre 0,25 mm de diamètre (MP biomedicals) sont placés dans un tube de 2 ml avec bouchon à vis. Puis, les cellules subissent une lyse comportant 4 cycles de broyage de 40 sec à 6,5 $m.sec^{-1}$ avec des pauses de 5 min entre chaque cycle pour éviter la dégradation des protéines par échauffement. Les lysats sont centrifugés à 8000 rpm pendant 5 min. La fraction intracellulaire récupérée dans le surnageant est stockée à -20°C. Pour l'analyse protéomique, des extraits intracellulaires et extracellulaires ont été obtenus à partir de 50 ml de cultures microbiennes après 30 h de cultures sur les différents substrats.

II.2. Analyse des différents échantillons obtenus (milieu de culture et résidus de culture)

II.2.1. Croissance bactérienne

La production de biomasse bactérienne et la vérification de l'état des cellules sont réalisées comme décrit précédemment. Les mesures de DO_{600nm} des milieux de cultures avec

substrats lignifiés sont effectuées en utilisant comme référence un milieu de culture avec le substrat adéquat non ensemencé.

II.2.2. Quantification des protéines

Les quantités de protéines contenues dans les extraits sont mesurées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) ou par dosage d'azote élémentaire.

La méthode de dosage de Bradford permet de quantifier la concentration en protéine par spectroscopie en mesurant un changement d'absorbance à 595 nm après incubation entre 5 et 20 min à température ambiante de 100 µl d'échantillon (dilué ou non) mélangé avec 1 ml de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée au moyen d'une gamme étalon de différentes concentrations (0 à 500 $\mu g.ml^{-1}$), obtenue avec de l'albumine de sérum de bœuf (BSA; bovine serum albumine; Sigma Aldrich) (**Figure 25**).

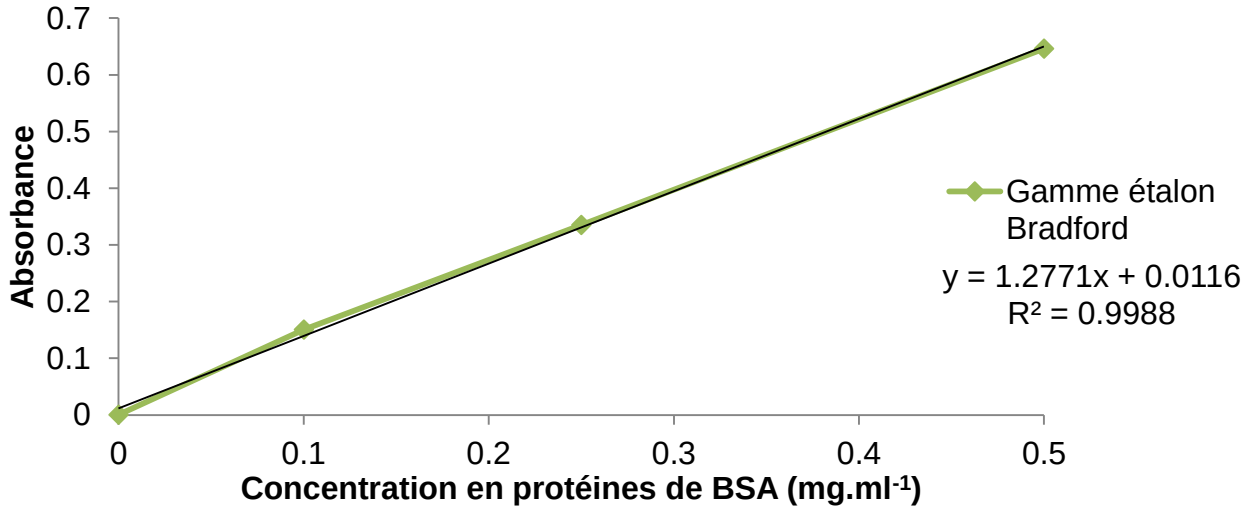


Figure 25 : Gamme étalon de la BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Le dosage de l'azote élémentaire a été utilisé afin d'estimer la quantité de protéines présente dans les échantillons contenant des substances pouvant perturber le dosage de Bradford. C'est un dosage isotopique par analyse de la quantification de l'abondance relative du ^{15}N et du ^{13}C, après combustion catalytique des composés organiques, par l'intermédiaire d'un spectromètre de masse isotopique. Il permet de déterminer la quantité d'azote total présente au sein d'un échantillon. Les extraits extracellulaires ou intracellulaires (50 µl) sont placés dans une capsule d'aluminium en les mélangeant avec 200 µl de l'eau ultra pure. L'ensemble est ensuite congelé durant une nuit à -80°C avant d'être lyophilisé. Le principe consiste à chauffer à 1000°C l'échantillon dans un four à oxydation en présence d'O_2 pur. L'oxydation totale libère tout l'azote

de l'échantillon sous forme de N_2, et tout le carbone sous forme de CO_2. Les gaz de combustion traversent ensuite plusieurs fours qui piègent l'excès d'oxygène. Le gaz N_2 est ensuite séparé dans une colonne chromatographique puis détecté par un détecteur TCD (Thermal Conductivity Detector). L'analyseur élémentaire utilisé est EURAVECTOR EuroEA 3000 qui est connecté au spectromètre de masse isotopique (Delat Plus Advantage, Thermo Electron). Le spectromètre de masse permet de mesurer très précisément les faisceaux d'ions issus des différents isotopes. Ces signaux, permettent de calculer la proportion des différents isotopes (rapport $^{15}N/^{14}N$) et de calculer les concentrations en azote dans les échantillons.

II.2.3. Dosage des activités xylanases

Cette activité est mesurée par dosage des sucres réducteurs issus de l'hydrolyse enzymatique des xylanes (Kidby and Davidson, 1973). Ce dosage repose sur la réduction du ferricyanure de potassium par la fonction réductrice des xylooligosides ou des xyloses issus de l'hydrolyse du xylane (Schales and Schales, 1945). A pH basique et à 100°C, les extrémités réductrices des sucres réduisent le ferricyanure de potassium (jaune, qui absorbe à 420 nm) en ion ferrocyanate incolore de manière linéaire. Le dosage des activités xylanases, est réalisé à l'aide d'une cinétique d'hydrolyse des xylanes de hêtre (Roth) à 50°C pendant 10 min. Pour cela, 100 µl des extraits intracellulaires ou extracellulaires dilués ou non sont mis en présence de 900 µl de xylane de hêtre (0,5 %) (p/v) dans du tampon Tris-HCl à 25 mM et pH 7. Des prélèvements de 100 µl sont effectués toutes les 2 min et placés dans 1,5 mL de réactif (composé d'une solution aqueuse de Na_2CO_3 (10 % (p/v)) et de $K_3Fe(CN)_6$ (3 % (p/v)) pour arrêter la réaction d'hydrolyse enzymatique. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 5 min pour la révélation. Les absorbances sont lues à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Uvikon 9X3 W).

Une gamme étalon avec des concentrations connues de xylose (0 et 400 $\mu g.ml^{-1}$) est réalisée dans les mêmes conditions que les cinétiques de dosage. La teneur en extrémités réductrices libérées est déterminée à l'aide de l'équation de la droite représentant l'absorbance du ferricyanure à 420 nm en fonction de la concentration en xylose (**Figure 26**). L'activité xylanase exprimée en $UI.ml^{-1}$ est calculée par l'équation ci-dessous, une unité internationale (UI) correspond à 1 µmole de substrat transformée en 1 minute (MM xylose = 150 $g.mol^{-1}$).

$$\text{Activité}\left(\frac{\text{UI}}{\text{ml}}\right) = \frac{\text{Pente de la réaction}}{\text{Masse molaire du xylose}} \text{X Dilution de l'échantillon}$$

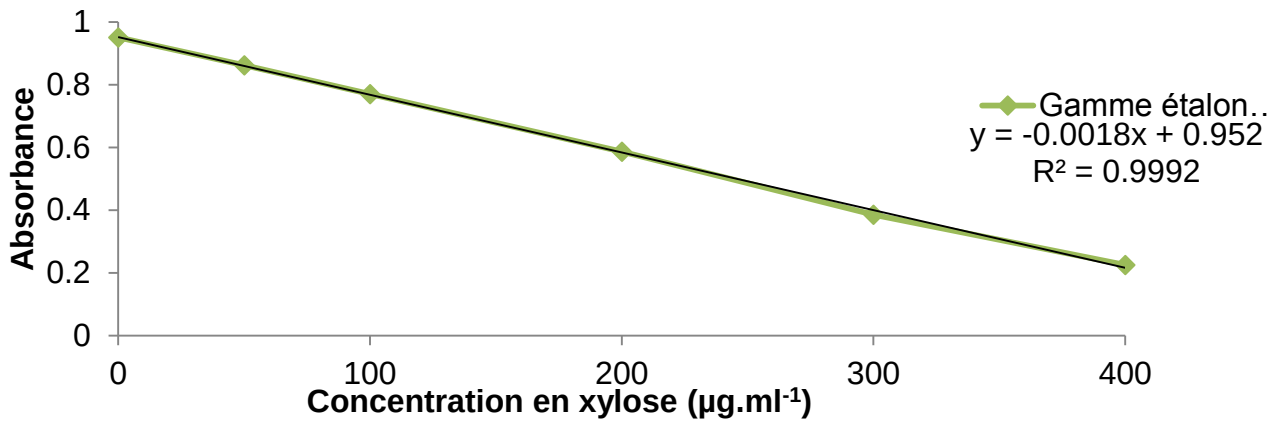


Figure 26 : Gamme étalon du xylose par la méthode de Kidby et Davidson pour le dosage de l'activité xylanase.

II.2.4. Activités ligninolytiques

Ce dosage permet de déterminer les activités phénol oxydases (laccases + peroxydases) par l'oxydation d'un substrat phénolique, le pyrogallol (PYGL) en purpurogalline (Tauber, 1953; Bach *et al.*, 2013). Ce substrat est choisi car il permet un dosage de l'activité à un pH neutre et alcalin contrairement à d'autres substrats comme l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) (German *et al.*, 2011). L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) est ajouté dans le milieu réactionnel comme agent chélatant permettant de réduire l'autohydrolyse du pyrogallol (Allison, 2006). L'activité phénol oxydase est déterminée par le suivi de la libération du produit oxydé (purpurogalline), à 420 nm toutes les 30 secondes pendant 5 min à l'aide du mode cinétique du spectrophotomètre thermostaté (Uvikon 9X3 W) à 50°C. Le milieu réactionnel (volume total 2 ml), est constitué par le tampon Tris-HCl à 25 mM et pH 7, le substrat PYGL 8 mM (concentration finale), l'EDTA 1 mM, l'H_2O_2 0,5 mM et 100 µl d'extraits intracellulaires ou extracellulaires. Afin de limiter les interférences dues à l'auto-oxydation du substrat et des composés oxydés résiduels présents dans le milieu, des cinétiques avec des milieux de culture non ensemencés sont réalisées dans les mêmes conditions que les essais. La quantité de purpurogalline libérée est déterminée selon la gamme étalon obtenue à l'aide de concentrations croissantes en purpurogalline (0 - 0,3 mM) (**Figure 27**). Cette gamme de purpurogalline est obtenue avec une oxydation totale du pyrogallol en présence d'une laccase de *Trametes versicolor* (8 UI.mg^{-1}) à 30°C. Deux gammes étalon sont réalisées, une première en présence de milieu MB, pour les extraits extracellulaires et une deuxième en présence uniquement du tampon Tris-HCl à 25 mM et pH 7, pour les extraits intracellulaires (Gamme étalon sans MB). Les activités

ligninolytiques exprimées en mUI.ml^{-1} sont calculées par l'équation ci-dessous, avec une unité internationale (UI) correspond à 1 µmole de substrat transformée en 1 minute.

$$\text{Activité}\left(\frac{\text{mUI}}{\text{ml}}\right) = \frac{(\text{Pente réaction} - \text{Pente témoin})}{\text{Pente gamme étalon}}$$

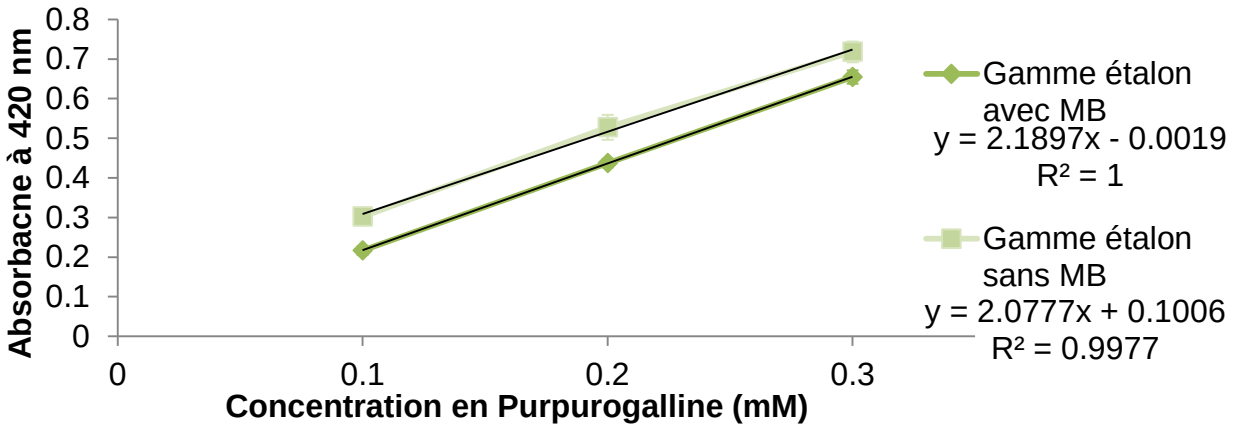


Figure 27 : Courbe d'étalonnage de la purpurogalline pour le dosage des activités phénol oxydases.

II.3. Caractérisation chimique des résidus solides et liquides des cultures bactériennes

II.3.1. Analyse du milieu de culture avec et sans croissance

II.3.1.1. Analyse des sucres

Les surnageants de culture (extraits extracellulaires, 750 µL) sont décongelés avant hydrolyse acide avec l'acide sulfurique 1 M (par addition de 750 µL H_2SO_4 2M) pendant 2 h sous agitation magnétique à 100°C. Les sucres monomères libérés sont analysés comme précédemment par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'anions avec détection ampérométrique pulsée

II.3.1.2. Analyse des composés phénoliques

Les surnageants de fin de culture (extraits extracellulaires, 5 ml) sont décongelés avant l'ajout de l'étalon interne (acide 3,4,5-tri méthoxycinnamique) à une concentration finale de 5 µg.ml^{-1}, puis ils sont acidifiés à pH 1 avec HCl 6 M. Trois extractions avec 3 ml d'éther diéthylique sont ensuite réalisées avant évaporation de la phase organique à 40°C. Les composés phénoliques sont repris dans une solution de méthanol/eau (50/50 %), avant d'être filtrés à 0,45 µm et analysés en CLHP comme décrit précédemment.

II.3.2. Analyse des résidus lignifiés

II.3.2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Le principe de l'IRTF est basé sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau IR est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va l'absorber induisant une diminution de l'intensité émise. Cette technique analytique consiste à faire interagir une onde d'interférence avec l'échantillon. Cette onde d'interférence est produite dans un interféromètre, le plus commun étant l'interféromètre de Michelson. Chaque variation de l'intensité émise sera analysée puis transcrite sous forme de spectre obtenu après transformée de Fourier (Faix and Bottcher, 1992). La spectroscopie en moyen infrarouge correspond à la région spectrale de 4000 cm^{-1} (2,5 µm) à 400 cm^{-1} (25 µm).

L'analyse en spectroscopie infrarouge à transmission est effectuée sur des échantillons solides dispersés au sein d'une structure vitrifiée de bromure de potassium (sel n'absorbant pas dans l'infrarouge) sous forme de pastilles. Le résidu sec (2-3 mg PB, PBEV, LK) est broyé finement à l'aide d'un pilon et d'un mortier en présence de KBr (environ 100 mg). Le broyat est placé sous vide au moyen d'une presse hydraulique pendant 1 à 2 min, puis soumis à une pression de 10 kg/m^2 pendant 3 min. Les spectres sont obtenus par spectroscopie à infrarouge (Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientifique) à partir de 16 scans réalisés entre 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1}.

II.3.2.2. Analyse des spectres

Les spectres sont traités et analysés par le logiciel The Unscrambler® X (Camo Analytics). Après correction de la ligne de base sur l'ensemble de la gamme moyen infrarouge (400-4000 cm^{-1}), les spectres sont normalisés afin de s'affranchir de la variation de masse entre les échantillons analysés. La normalisation consiste à fixer l'aire sous le spectre dans la région 800-2000 cm^{-1} à 1000 cm^{-1}. Le traitement statistique des spectres normalisés est réalisé par une analyse en composante principale (ACP). Ce traitement statistique est une méthode d'analyse multivariée exploratoire des données ayant un grand nombre de variables. L'ACP permet de visualiser les résultats dans un espace réduit, pour synthétiser l'information contenue dans le jeu de données. Concrètement, les individus ou échantillons sont représentés dans un tableau par une ligne (**Figure 28A**), qui elle-même sera translatée en point dans un espace vectoriel constitué par les variables initiales (**Figure 28B**). Des composantes principales (CP), vont venir redéfinir l'espace vectoriel pour mieux prendre en compte la forme du nuage de points. Le plan constitué des deux premières CP s'appelle une carte factorielle des individus, ou score plot et permet de

visualiser la proximité et les différences entre les individus (**Figure 28C**). Chaque CP représente un certain pourcentage de variance expliquée, par rapport aux 100 % de variance totale du jeu de données. Les CP sont toujours ordonnées en ordre décroissant du pourcentage de variance expliquée. Enfin, les distances entre la projection des variables initiales sur les CP correspondent au « loading » ou contribution factorielle, c'est-à-dire à leurs poids ou leurs contributions dans la construction des CP.

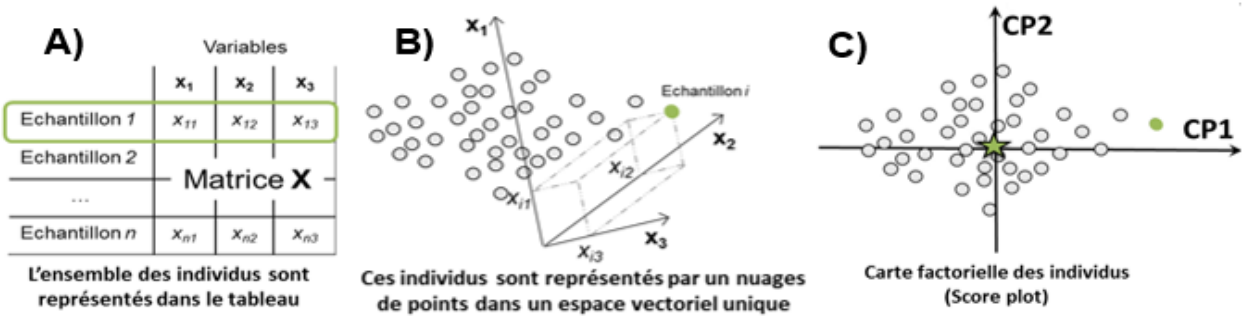


Figure 28 : Principe de l'ACP, avec l'ensemble des individus représentés sous forme de tableau (A), ou sous forme d'espace vectoriel (B) et la carte factorielle des individus (C).

II.3.2.3. Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire) est basée sur la propriété de certains noyaux à absorber l'énergie du rayonnement lorsqu'ils sont placés dans un champ électromagnétique puis à la relâcher lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet d'observer les propriétés magnétiques de certains noyaux comme ^{1}H, ^{13}C et renseigne sur la structure chimique des molécules.

La RMN 2D permet d'observer la corrélation entre un proton et un carbone directement lié. Cette technique consiste, à l'aide de séquences d'impulsions adaptées, à établir entre le spectre RMN du proton (représenté sur l'axe des x) et le spectre RMN du carbone ^{13}C (représenté sur l'axe des y) des tâches de corrélation associant à un déplacement chimique du proton un déplacement chimique du ^{13}C. Les spectres HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) permettent d'associer un carbone protoné aux atomes d'hydrogène qu'il porte et de renseigner sur les groupements et les liaisons chimiques. Pour la caractérisation en RMN en phase liquide, les échantillons solides sont au préalable ultra-broyés. Le broyage des résidus lignifiés (environ 200 mg) est réalisé dans des jarres de dioxyde de Zirconium ZrO_2 au moyen du broyeur planétaire

MM 2000, contenant une bille en ZrO_2 de 10 mm de diamètre. Quatre cycles de broyages de 20 min sont entrecoupés de pauses de 10 min.

Pour cette étude, les échantillons ultra-broyés sont préparés selon deux méthodes en vue de l'analyse RMN-2D. La première consiste à solubiliser directement l'échantillon ultra-broyé dans un mélange de solvants deutérés de DMSO-d_6 et de Pyridine-d_5. Pour cela, l'échantillon (60 mg) est solubilisé dans un volume (600 µl) d'un mélange de DMSO/Pyr (4v/1v) une nuit à température ambiante (Kim and Ralph, 2014) dans un tube RMN de 5 mm de diamètre. La seconde méthode est utilisée lorsque l'échantillon reste insoluble ou partiellement insoluble dans le mélange de DMSO-d_6/Pyr-d_5. Elle consiste à acétyler tous les groupements hydroxyles libres afin de solubiliser l'échantillon dans un solvant deutéré approprié. L'acétylation est réalisée en ajoutant du DMSO (3,6 ml) et du N-méthylimidazole (1,8 ml) à l'échantillon (100 mg). L'anhydride acétique (1,8 ml) est ajouté après incubation du mélange une nuit à température ambiante puis la réaction d'acétylation se poursuit pendant 4 h à température ambiante (Hedenström *et al.*, 2009). L'addition du milieu réactionnel dans un grand volume d'eau déminéralisé (600 ml) permet de faire floculer les échantillons acétylés. Les échantillons acétylés sont laissés à 4°C pendant une nuit, avant d'être centrifugés pendant 15 min, à 8000 rpm, à 10°C puis lavés à l'eau ultra-pure et centrifugés. Le culot est séché puis 60 mg sont transférés dans un tube RMN de 5 mm de diamètre avant d'être solubilisés dans du chloroforme deutéré ($CDCl_3$, 600 µl) pour analyse RMN (Kim and Ralph, 2014).

L'acquisition des spectres est réalisée par un spectromètre Bruker de 600 MHz équipé du logiciel TopSpin 3.1 (Plateforme PLANET, CNRS 7312). Pour les échantillons solubilisés dans le DMSO, les profils 2D sont calibrés sur le DMSO-d_6 : ^{1}H : 2,50 ppm ; 13C : 39,5 ppm. Pour les échantillons acétylés, les profils 2D sont calibrés sur le $CDCl_3$: ^{1}H : 7.26 ppm ; 13C : 77.2 ppm. Ces spectres sont normalisés sur la quantité d'unité G sur le carbone 2. Les unités S avec le carbone 2 et 6, ainsi que les liaisons β-O-4 (A), β-β (B) et β-5 (C) avec les atomes de carbone α et β sont quantifiées de manière relative et exprimées en pourcentage de l'unité G (Crestini *et al.*, 2011).

II.3.2.4. Analyse par RMN du phosphore

La spectroscopie RMN du phosphore permet de quantifier les groupements hydroxyles disponibles après phosphitylation. A partir d'un échantillon soluble dans un mélange pyridine/chloroforme deutéré (v/v : 1,6/1), une phosphitylation de l'ensemble des groupements hydroxyles libres (-OH) révèle l'existence d'hydroxyles aromatiques, d'hydroxyles aliphatiques et

les acides carboxyliques. La réaction de phosphitylation est réalisée dans du solvant pyridine/chlorofome deutéré (v/v : 1,6/1), avec des concentrations finales en cyclohexane (étalon interne) à 10,85 $mg.ml^{-1}$, un agent de relaxation (chromium (III) acétylacétone) à 5 $mg.ml^{-1}$, et un agent de phosphitylation (2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl 1,3,2-dioxophospholane marqué au ^{31}P) à 1,1 $g.ml^{-1}$. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel (1 ml) est transféré dans un tube RMN de 5 mm de diamètre pour sonde BBFO de 600 MHz. L'acquisition est réalisée sur un spectromètre Bruker de 600 MHz équipé du logiciel TopSpin 3.1 (Plateforme PLANET, CNRS 7312). Le profil RMN est obtenu à partir de 256 scans avec une séquence de découplage de délai *d1* de 6s. Les profils sont calibrés à 132.2 ppm. Les signaux, assignés et intégrés manuellement à partir de la base de données ^{31}P NMR Chemical Shifts Ranges, sont quantifiés par rapport au signal de l'étalon interne (cyclohexanol) et exprimés en µmol de OH / mg d'échantillon (Granata and Argyropoulos, 1995; Crestini *et al.*, 2010).

III. Protéomique

III.1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-Page)

Une électrophorèse des protéines en conditions SDS-PAGE permet la séparation des protéines dénaturées par le SDS (détergent anionique), selon leur taille, sous l'action d'un champ électrique. Le maillage du gel est choisi selon la taille attendue des protéines. Plus les protéines sont de petite taille, plus elles sont ralenties dans leur migration par la porosité du gel. Un premier gel de concentration permet de concentrer les échantillons de protéines avant leur séparation dans un gel de séparation. La concentration des gels de séparation est adaptée selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt étudiée : un gel de concentration avec entre 10 et 12 % d'acrylamide permet de séparer et visualiser les protéines dont les masses moléculaires varient de 15 kDa à 100 kDa. Les compositions des gels de séparation et de concentration sont données dans le **Tableau 14**. L'électrophorèse est réalisée avec l'appareil de Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad).

Pour les analyses des protéines intracellulaires et extracellulaires issues des cultures de *TX*, 5 µl de protéines extracellulaires ou protéines intracellulaires sont mélangées avec respectivement 2,5 µl de tampon de charge, puis concentrées 5 fois avant d'être dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines dénaturées sont déposées dans les puits en vue de leur migration, avec 5 µl de marqueurs de masse moléculaire déposé dans un puit du gel (Dual Color Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad) afin de pouvoir déterminer la taille des protéines. La migration dure entre une et deux heures, sous l'action d'un champ électrique 100 à 150 volts.

Après la migration, le gel est coloré avec une solution à 0,1 % (p/vol) de bleu de coomassie (R-250) dans de l'éthanol/acide acétique glacial (40/10 %) complété à 1 L avec de l'eau distillée pendant 1 h sous agitation, puis le gel est lavé trois fois 5 min sous agitation avec de l'eau distillée. Le gel est décoloré dans de l'acide acétique 10 % (vol/vol). Les gels sont ensuite photographiés (Biovision, Fisher Bioblock Scientific) et analysés avec le logiciel VisioCapt (Vilber Loumat).

Tableau 14 : Composition des solutions pour l'analyse des protéines par électrophorèse SDS-Page

Gel Concentration	Volume (ml)	Gel Séparation	Volume (ml)
H_2O	4,8	H_2O	7,3
Tampon Tris-HCl, pH 8,8 et 1,5 M	2,5	Tampon Tris-HCl, pH 6,8 et 1 M	2,5
Acrylamide 40%	2,5	Acrylamide 40%	1,25
Laurylsulfate de sodium 10% (SDS)	0,1	Laurylsulfate de sodium 10% (SDS)	0,1
Ammonium Persulfate 10%	0,1	Ammonium Persulfate 10%	0,1
TEMED pur	4 µl	TEMED pur	10 µl

III.2. Préparation des échantillons

Les analyses protéomiques ont été réalisées avec des extraits intracellulaires et extracellulaires traités comme décrit précédemment.

Les échantillons intracellulaires, sont utilisés après avoir été concentrés 10 fois dans du tampon Tris-HCl 25 mM à pH 7. Pour les échantillons extracellulaires (12,5 ml), après décongélation, une centrifugation à 5500 rpm pendant 10 min permet de récupérer le surnageant. Ce surnageant est ensuite filtré à l'aide d'un filtre 0,45 µm, puis concentré 35 fois et purifié à l'aide de filtres Amicon Ultra-15 (seuil de séparation 3 kDa) (Millipore). Les quantités de protéines concentrées sont estimées par dosage d'azote élémentaire. 50 µg de protéines concentrées sont utilisées pour être précipitées à l'acétone. Pour cela, 5 fois le volume des échantillons en acétone est ajouté à l'échantillon. Le mélange est incubé à -20 °C pendant une nuit. Le lendemain, l'acétone est éliminé après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 30 min et le précipité protéique est solubilisé dans 50 µl de tampon de charge (Laemmli, 1970). Une étape de chauffage à 95°C pendant 10 min est réalisée pour dénaturer les protéines. Des électrophorèses (SDS-PAGE) avec 10 µl pour les fractions EC brute ou après concentration Amicon, ou 10 µg après l'ensemble des étapes, de protéines sont réalisées afin de vérifier l'état des différents échantillons obtenus.

Des quantités identiques de protéines intracellulaires et extracellulaires (10 µg basé sur les dosages d'azote élémentaire) sont analysées pour pouvoir comparer l'effet des différents substrats (PB, PBEV, LK, Xylane). Les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE. Une migration lente à 70 V durant environ 1 h permet aux échantillons de pénétrer totalement dans le gel de séparation de quelques mm. La migration est arrêtée et chaque bande correspondant à un échantillon est découpée à l'aide d'un scalpel et placée dans un tube stérile.

Les protéines récupérées sur gel SDS-PAGE subissent des étapes de réduction et d'alkylation par incubations successives dans différentes solutions (Meienhofer *et al.*, 1971). La réduction consiste à incuber l'échantillon dans du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM dans 50 % d'éthanol (20 minutes à température ambiante). Ce tampon est éliminé et les bandes sont déshydratées avec de l'éthanol pur pendant 15 minutes. L'éthanol est à son tour retiré et un tampon dithiothréitol (DTT) 10 mM dissous dans une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM est ajouté pour réduire les ponts disulfures durant 1 heure. Le mélange est incubé à 56°C dans un incubateur HB-1D Hybridiser (Techne). Les protéines sont ensuite alkylées pendant 30 min à l'abri de la lumière avec un tampon contenant de l'iodoacétamide 55 mM dissous dans une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM. La solution d'alkylation est éliminée. Enfin, les bandes sont lavées avec du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pendant 15 min.

Après l'alkylation, les échantillons subissent une décoloration par des bains successifs de tampon bicarbonate d'ammonium et acétonitrile de 15 min (25 mM-5 % respectivement) et de 2 fois 30 min (25 mM-50 % respectivement), sous agitation afin d'accélérer la décoloration. Le tampon est retiré et le gel subit une étape de déshydratation par incubation durant 10 min dans l'acétonitrile 100%. L'acétonitrile est ensuite retiré et les échantillons sont centrifugés au speedVac (Labconco) 15 min à 50 °C pour éliminer l'acétonitrile et compléter la déshydratation. Les échantillons sont conservés à -20°C.

Les analyses protéomiques ont été effectuées à la Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme, composante protéomique (PFEMcp) INRA Clermont-Ferrand. Les gels protéiques subissent une étape d'hydrolyse à la trypsine (Promega) *in situ* durant 5 heures avec 600 ng d'enzyme par bande. L'extraction des peptides a été réalisée sous ultrasons pendant 15 min avec de l'acétonitrile/acide trifluoroacétique à 99,9-0,1% puis les surnageants sont concentrés sous vide au speedvac pendant 45 min. Ceux-ci sont repris dans une solution d'H_2O/acétonitrile/acide trifluoroacétique à 95-5-0,05 % puis après un passage au bain à ultrasons, les échantillons sont transférés dans un insert avant analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Les hydrolysats sont injectés dans une chaine nano HPLC

(Ultimate 3000, Dionex) sur une colonne de concentration permettant de retenir les peptides et d'éliminer les contaminants. Les peptides sont séparés selon leur hydrophobicité sur une colonne C18 (25 cm x 75 µm, SN75096). La nano HPLC est couplée à un spectromètre de masse de type LTQ velos Orbitrap (ThermoFisher).

III.3. Traitements des données

III.3.1. Conditions de l'analyse

Après analyse en LC-MS/MS, les protéines sont identifiées à l'aide du moteur de recherche Mascot v2.5.1 (Matrix Science). Ce moteur de recherche permet de faire le lien entre les spectres acquis durant l'ensemble des analyses et les protéines présentes dans la banque de données utilisée (génome de *TX* avec 3956 séquences). Les filtres de validation appliqués sont les suivants : Significance Threshold Mascot $p < 0.05$ et un taux de faux positif (FDR) ajusté autour de 3 %. Pour qu'un peptide soit validé, il faut que son score Mascot, issu des spectres MS/MS soit supérieur à 16 (Score limite de validation de distribution du peptide). Une fois les données brutes récupérées, les peptides identifiés une seule fois par protéine sont retirés, car ils sont considérés comme non significatifs.

III.3.2. Approche globale

L'approche globale permet d'identifier les protéines et leur abondance. L'analyse globale des protéines est réalisée à l'aide du logiciel Proteome Discoverer 1.4 (ThermoElectron), qui permet d'identifier et quantifier les protéines produites dans l'ensemble des conditions de culture et sur les différents substrats. Ce logiciel est couplé au moteur de recherche Mascot ($p < 0.05$). Cette analyse permet d'avoir l'abondance des protéines qui correspond au nombre de chaque protéine individuelle par rapport au nombre de protéines totales présentes dans l'échantillon (%), dans chacune des conditions de culture. Elle permet également d'identifier les protéines présentes uniquement sur un ou plusieurs substrats.

L'abondance est calculée à partir de l'indice d'abondance des protéines dans un mélange complexe (PAI). Il correspond au nombre de peptides observés divisé par le nombre de peptides observables par protéine. Pour la quantification absolue, le PAI a été converti en PAI modifié exponentiellement (emPAI). Ce dernier est proportionnel à la teneur en protéines dans un mélange de protéines (Ishihama *et al.*, 2005).

III.3.3. Approche comparative

L'analyse comparative des protéines dans les différentes conditions de culture est réalisée à l'aide du logiciel QI Progenesis (Nonlinear Dynamics, Waters), qui est couplé au moteur de recherche Mascot v2.5.1. Elle permet de quantifier le niveau d'expression des différents protéomes étudiés. Une comparaison de ces niveaux d'expression entre les différentes conditions, mais aussi la comparaison avec une condition témoin (xylane) sont effectuées grâce à une analyse ANOVA ($p < 0.05$ et faux positif <0,05)

IV : Clonage d'un gène d'intérêt

IV.1. Les bactéries utilisées

Les génotypes des bactéries d'*E.coli* d'amplifications (*XL1-Blue MRF'*) et les bactéries d'expressions *JM109 (DE3)* et *Tuner (DE3*), sont présentés dans le **Tableau 15**. Ces bactéries sont conservées à -80°C et remises en culture sur un milieu gélosé de Luria Bertani (lysogeny broth, LB), avec ou sans antibiotique. Les bactéries sont cultivées à 37°C une nuit sous agitation à 130 rpm.

Tableau 15 : Présentation des génotypes des bactéries d'amplification et d'expression.

Nom de la souche	Génotype
JM109 (DE3)	*end*A1, *rec*A1, g*yr*A96, *thi*, *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+), *rel*A1, *sup*E44, λ–, Δ(*lac-pro*AB), [F´, *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q}ZΔM15], lDE3.
XL1-Blue MRF'	*Δ(mcrA)183*, *Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac*[F'*proAB*, *lacI*^{q}*Z*Δ*M15*, Tn*10*(Tet^r)].
Tuner (DE3)	F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1*(DE3)

IV.2. Le vecteur

Le vecteur bactérien utilisé est le plasmide pET-28 (Novagen), (5368 paires de bases (pb)). Il possède une His-Tag®/thrombin/T7-Tag® en N-terminale ou une séquence His-Tag en C-terminale selon le cadre de lecture utilisé. Il possède un site de clonage multiple permettant l'insertion de gènes d'intérêt. Le plasmide contient aussi la présence du gène pour la production d'une aminoglycoside phosphotransférase (entre les pb 3995 et 4807) permettant de résister à l'antibiotique kanamycine. Enfin, la présence d'un opéron lactose permet d'induire la production du gène d'intérêt cloné en présence d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (**Figure 29**).

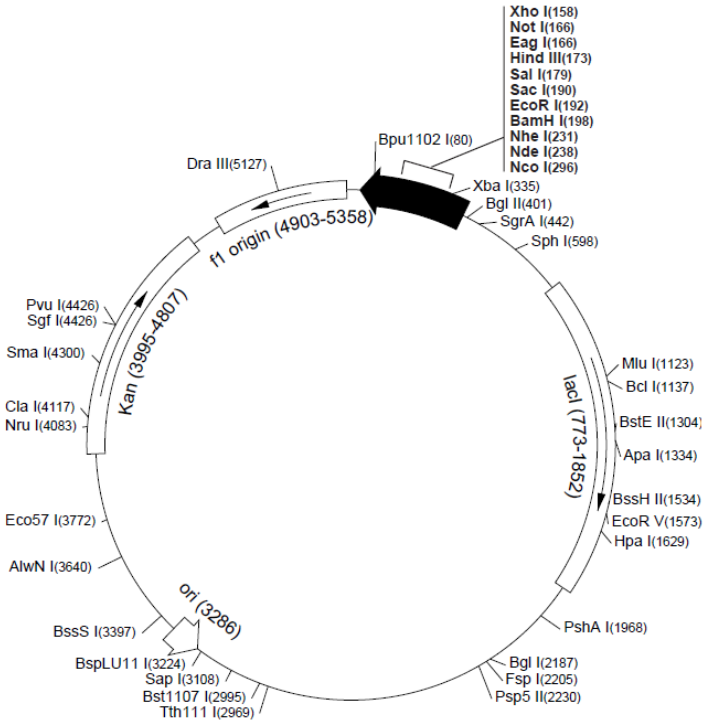


Figure 29 : Carte du vecteur pET-28b.

IV.3. Amplification du gène d'intérêt

IV.3.1. Les oligonucléotides

Les amorces ou oligonucléotides sont synthétisées chez Eurogentec. Les amorces spécifiques du gène codant la peroxydase Txyl-3231 ont été définies. L'amorce sens est préparée avec l'ajout du site de restriction NdeI. Pour les amorces anti-sens, le site de restriction XhoI est ajouté, car celui-ci est le plus proche du Tag-histidine et limite ainsi le nombre de nucléotide superflus ajoutés au gène. Pour permettre la présence du Tag-histidine en C terminale, le codon stop du gène codant Txyl-3231 est enlevé. Quelques nucléotides sont ajoutés en bout des amorces afin de permettre une bonne activité des enzymes de restrictions. Les amorces et leurs températures de fusion (Tm°C) sont présentées dans le **Tableau 16**, avec en rouge la séquence correspondant au site de restriction NdeI et en vert le site de restriction XhoI.

Tableau 16 : Amorces utilisés pour le clonage de Txyl-3231.

Amorces	Séquences des amorces	Tm°C	Pb
Txyl-3231_S	gcgc**catatg**gacacgacggcaagcac	67	27
Txyl-3231_AS1	g**ctcgag**atgcgataaagccaaatcgtagcgatccg	67	36

IV.3.2. Isolement du gène d'intérêt

IV.3.2.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) de *TX* est extrait par l'utilisation d'un Kit commercial PureLink® Genomic DNA (ThermoFisher) en suivant les recommandations du fournisseur. *TX* est cultivé sur milieu MB-glucose. Une culture de 10 ml en phase végétative est centrifugée à 7500 rpm pendant 10 min. Le culot est re-suspendu dans 180 µl de tampon de digestion à Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 2,5 mM, Triton X-100 1 % et complémenté avec du lysozyme 10 X (200 mg/ml). Le mélange est incubé 30 min à 37°C. Une solution de 20 µl de protéinase K et de 200 µl de tampon PureLink® Genomic lyse est ajoutée et le mélange est incubé 30 min à 55°C. Après une étape de centrifugation de 1 min à 13000 rpm, 200 µl d'éthanol 96°C sont ajoutés avant de transférer l'ensemble dans une colonne. La colonne remplie avec la solution de lyse est centrifugée à 13 000 rpm pendant 1 min. La colonne est lavée 2 fois par l'ajout de 500 µl de tampon de lavage avant de récupérer l'ADN par l'élution en présence d'eau MilliQ (50 µl).

L'état de l'ADNg extrait est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de tampon TBE 1X (Tris 89 mM, acide borique 89 mM, et 2 mM d'EDTA) en présence de 2 % de bromure d'éthidium. 5 µl d'ADNg mélangés avec 1 µl de tampon de charge sont déposés dans les puits. Afin d'évaluer la taille des ADN extraits, un marqueur de masse moléculaire Smart ladder (Eurogentec) est utilisé. La migration se fait dans du tampon TBE 0.5 X pendant 1 h à 75 V. Les ADNg sont visualisés sous UV à 365 nm avec l'appareil Biovision (Fisher Bioblock Scientific) et analysés avec le logiciel Visiocapt (Vilber Loumat). La concentration d'ADNg obtenue est quantifiée par un fluorimètre (Qubit ThermoFisher) à l'aide du kit Quant-iT™ dsDNA HS Assay (Invitrogen) et selon les recommandations du fournisseur.

IV.3.2.2. Isolement du gène codant la protéine Txyl-3231

Pour isoler le gène d'intérêt, une amplification par PCR est réalisée à l'aide d'un mélange réactionnel de 50 µl contenant une concentration finale de 350 ng d'ADNg de *TX*, des oligonucléotides 1 µM, du tampon 1x spécifique pour une bonne activité de la polymérase utilisée, des dNTP à 200 µM et 1 unité de Phusion HotStart II DNA polymerase (ThermoFisher). Le programme d'amplification est constitué de cycles d'amplification comprenant, une phase de dénaturation à 98°C pendant 10 sec, une phase d'hybridation à 62°C pendant 30 sec, une phase d'élongation à 72°C pendant 2 min. Ces trois phases sont répétées 25 fois pour permettre la multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. Puis 5 µl de gènes d'intérêt amplifiés sont déposés sur gel d'agarose comme décrit précédemment.

IV.3.2.3. Extraction et purification du gène isolé

La purification des produits d'amplification consiste à récupérer l'ADN après migration sur gel d'agarose à l'aide du kit GeneJET PCR Purification (ThermoFisher). Pour cela, le fragment de gel contenant la bande d'intérêt, visualisée aux UV, est découpé, puis incubé à 50°C avec 100 µl d'une solution de solubilisation fournie dans le kit. Après 10 min, l'ensemble est transféré dans une colonne permettant de fixer l'ADN. Un lavage avec 700 µl d'une solution de lavage du kit est effectué avant l'élution avec 40 µl de solution d'élution (eau stérile) qui permet de récupérer l'ADN purifié. La purification est vérifiée et l'ADN est quantifié par migration sur gel d'agarose.

IV.3.2.4. Extraction du vecteur plasmidique

Le plasmide pET-28b est extrait à partir de culot de culture de la bactérie *E. coli* XL1Blue cultivée sur LB complémenté avec de la kanamycine 50 $\mu g.ml^{-1}$ à 37°C et 120 rpm pendant une nuit. Le plasmide est extrait à l'aide du kit commercial QIAprep Miniprep (QIAGEN). Pour cela, 5 ml de la culture sont centrifugés pendant 3 min à 10 000 rpm, puis le culot est re-suspendu dans 250 µl de tampon (noté P1) avant d'ajouter 250 µl de tampon de lyse cellulaire (noté P2) pendant 5 min. Un tampon de neutralisation (350 µl, noté N3) permet d'arrêter la lyse, puis le mélange est centrifugé pendant 10 min à 13 000 rpm. Le surnageant est transféré dans une colonne fournie dans le kit et une centrifugation permet de faire passer le surnageant à travers la colonne. Deux lavages successifs sont réalisés avec 500 µl de tampon de lavage PB et 750 µl de tampon de lavage PE directement dans la colonne, avant que le plasmide ne soit élué avec 50 µl de tampon EB. Le plasmide extrait est vérifié par migration sur gel d'agarose et quantifié comme décrit précédemment.

IV.3.2.5. Double digestion du gène d'intérêt et du vecteur

200 ng de gène (produit PCR purifié) d'intérêt et 800 ng de plasmide sont digérés. Pour cela, ils sont placés dans un mélange contenant les enzymes de restriction XhoI et NdeI (1 U) ainsi que le tampon enzymatique adéquat CutSmart 1X concentré (New England Biolabs). Le volume réactionnel est de 20 µl, celui-ci est incubé à 37°C pendant 2 h. Après l'incubation, les enzymes de restriction sont inactivées par choc thermique à 65°C pendant 20 min. Ces produits de digestion sont purifiés et analysés comme décrits précédemment.

IV.3.3. Ligation du gène d'intérêt et du vecteur

L'étape de ligation entre le gène d'intérêt et le plasmide pET-28b est réalisée par l'intermédiaire du kit Rapid DNA Ligation (ThermoFisher), avec l'utilisation de l'enzyme T4 DNA ligase. Pour cela, un milieu réactionnel (20 µl) contenant une concentration finale de 1X de tampon

Rapid Liagtion, 5 U d'enzyme T4 DNA Ligase, ainsi que le plasmide pET-28b et le gène d'intérêt est préparé. Différents ratio plasmide/gène d'intérêt, (1/3 et 1/5) avec entre 50 et 100 ng de plasmide sont testés. La ligation s'effectue à 22°C pendant 20 min.

IV.3.4. Transformation

IV.3.4.1. Préparation des cellules compétentes

Les bactéries réceptrices chimio-compétentes sont préparées à partir de colonies isolées issues de milieu LB sans antibiotique. Après une nuit de culture à 37°C sous agitation à 130 rpm, cette pré-culture est utilisée pour ensemencer de nouveau du milieu LB à 1 %. La croissance est arrêtée quand une DO_{600nm} de 0,5 est obtenue. Les cultures sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min et à 4°C. Le culot des cultures est repris dans une solution de nettoyage qui contient une concentration finale de 16,8 mM en $NaCH_3COO$, de 5 mM en NaCl, de 50 mM en $MnCl_2$ à pH 5,6. Le mélange est laissé 20 min à 4°C puis de nouveau centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min et à 4°C. Enfin, le culot est repris dans une solution de reprise (10 mM en $NaCH_3COO$, 70 mM en $CaCl_2$, 5 % vol/vol glycérol, 5 mM en $MnCl_2$ à pH 5,6). Ces cellules compétentes sont aliquotées par 250 µl avant d'être conservées à -80°C.

IV.3.4.2. Transformation dans des bactéries d'amplification et d'expression

La transformation de bactéries d'amplification *E. coli* XL1-blue permet la multiplication des plasmides contenant le gène d'intérêt. Pour réaliser cette transformation, 5 µl de plasmide contenant le gène d'intérêt sont mis en contact avec 50 µl de cellules compétentes dans la glace pendant 30 min, pour favoriser l'adhésion des plasmides à la membrane des bactéries, puis un choc thermique à 42°C, pendant 1 min, permet une fragilisation momentanée des membranes bactériennes et ainsi facilite l'entrée des plasmides dans les bactéries compétentes. L'ensemble est ensuite placé dans la glace pendant 5 min. Ensuite, une étape de régénération des bactéries est réalisée avec un ajout de 250 µl de milieu LB placé à 37°C pendant 1 h avant d'étaler 150 µl de suspension microbienne sur une boîte de pétri contenant du LB (complémenté avec de la Kanamycine à 30 $\mu g.ml^{-1}$) pour permettre la sélection des transformants (cellules compétentes avec le plasmide d'intérêt contenant le gène d'intérêt et la résistance à l'antibiotique). Les milieux sont incubés une nuit à 37°C. Plusieurs colonies sont ensuite vérifiées. Pour cela, ces colonies sont repiquées dans du milieu LB Kanamycine à 30 $\mu g.ml^{-1}$ et placées sous agitation à 130 rpm et à 37°C pendant une nuit. Les clones identifiés comme positifs contenant le plasmide avec le gène d'intérêt, sont ensuite remis en culture dans du milieu LB Kanamycine 30 $\mu g.ml^{-1}$ et conservées à -80°C. Les plasmides sont ensuite extraits et validés par séquençage (Eurofins

Genomics) avant d'être transférés dans des bactéries d'expression JM109 DE3, Tuner DE3 avec le même mode opératoire que pour les bactéries d'amplification.

V : Production et purification de Txyl-3231-His

V.1. Conditions d'induction de la production de Txyl-3231-His par les bactéries d'expression

Les bactéries d'expression (Txyl-3231-TunerDE3, Txyl-3231-JM109DE3) sont mises en culture avec un inoculum de 1 % vol/vol dans 20 ml de milieu LB Kanamycine 50 $\mu g.ml^{-1}$. La culture est incubée à 37°C et 100 rpm. Pour induire l'expression de la protéine recombinante, de l'IPTG à 1 mM est ajoutée quand la culture atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,5. La culture est laissée à 30°C ou à 37°C et agitée à 100 rpm pendant une nuit. Des cultures non induites avec les bactéries recombinantes, et avec les bactéries Tuner DE3, JM109 DE3 seules sont effectuées dans les mêmes conditions et serviront de témoins de production. Des prélèvements réguliers de 2 ml (2 h, 6 h et 15 h) sont effectués dans les différentes conditions afin de vérifier les conditions de production de l'enzyme. Pour cela, les prélèvements sont centrifugés à 6000 rpm pendant 5 min et les culots cellulaires sont repris dans 200 µl d'eau. Par SDS-PAGE, 10 µl de culots cellulaires sont analysés (gel à 10 %) comme décrit précédemment.

Pour vérifier la présence de la protéine recombinante, une révélation au western blot avec un anticorps spécifique de la queue polyhistidine est effectuée (Sambrook *et al.*, 1989). Pour cela le gel de SDS-PAGE est incubé dans un tampon de transfert (Tris HCl 25 mM, Glycine 192 mM pH 8,3 et méthanol 15 % vol/vol) pendant 15 min. Les protéines sont transférées sur de la membrane de nitrocellulose avec l'appareil Trans-Blot SD Semi-Dry Transfert (Biorad). Le transfert a lieu pendant 15 à 30 min à 15 volts. Après transfert, la membrane est lavée à l'eau ultrapure puis incubée dans un tampon de saturation (10 % p/v de poudre de lait écrémé dans tampon phosphate sels 1X (PBS : 10 $g.l^{-1}$ de NaCl, 250 $mg.l^{-1}$ de KCl, 1,4 $g.l^{-1}$ de Na_2HPO_4 et 300 $mg.l^{-1}$ de KH_2PO_4.) pendant 1 h. Cette étape est suivie d'une incubation dans une solution du premier anticorps (Anti HisTag, Sigma Aldrich) préparée à une concentration de 1/1000ème (dans tampon 0,1 % v/v de Tween20 et 2 % poudre de lait écrémé dans PBS 1X) pendant 2 h. Après lavage de la membrane (PBS 0,1 % v/v Tween20 puis PBS 1 X). Le second anticorps à une concentration de 1/2500ème (Anti Mouse IgG (Sigma Aldrich)) est appliqué pendant 1 h. La membrane est lavée comme décrite ci-dessus avant d'être révélée en utilisant le kit de révélation "BCIP/NBT Color development substrate" selon les recommandations du fournisseur (Promega).

V.2. Production de Txyl-3231-His et purification

Des cultures en grand volume (500 ml) de Txyl-3231-His-Tuner DE3 sont effectuées à 30°C pendant 24 h, sans induction afin de produire en grande quantité Txyl3231-His. La culture est centrifugée à 6000 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire (Fraction totale; FT) est repris dans 50 ml de tampon de lyse (300 mM NaCl, 100 mM NaH_2PO_4 et 20 mM Imidazole) et les cellules sont lysées pour libérer les protéines intracellulaires, à l'aide du FastPrep-24™ 5G (MPbiomedicals) comme décrit précédemment mais avec un programme adapté au broyage de *E. coli* (2 cycles de 30 sec à 6,5 $m.sec^{-1}$ avec des pauses de 1 min entre chaque cycle). La solution obtenue est de nouveau centrifugée à 6000 rpm pendant 10 min. Deux fractions, la fraction soluble (FS, contenant la protéine recombinante et les protéines intracellulaires) et les débris cellulaires (fractions insolubles ; FI) sont obtenues. 10 µl de FT, FS et FI sont analysés par SDS-PAGE et Western blot comme décrit précédemment.

La Fraction soluble (FS) est purifiée par chromatographie d'affinité en condition native, en utilisant la résine Ni-NTA (Qiagen). En effet, la queue polyhistidine ajoutée à la protéine recombinante possède une forte affinité pour les ions Nickel à pH basique. Après fixation sur la résine, la protéine peut être éluée par compétition en utilisant une concentration croissante d'une molécule compétitrice, l'imidazole. Une mise au point de la purification en petit volume a été effectuée afin d'identifier les conditions d'élution de la protéine. Pour cela, 500 µl de résine est lavée 2X avec 1 ml d'eau ultra-pure puis elle est équilibrée avec 1 ml de tampon d'équilibrage (300 mM NaCl et 50 mM NaH_2PO_4). Une fois la résine préparée, 1 ml de FS est placé en présence de la résine pendant 10 min sous agitation douce à température ambiante. Le mélange est centrifugé pendant 5 min à 2000 rpm. Une succession de trois lavages de la résine avec 1 ml de tampon de lavage (tampon d'équilibrage complémenté avec 0 mM, 10 mM et 20 mM d'imidazole respectivement) est effectuée pour éliminer les protéines qui ne se sont pas fixées spécifiquement sur la résine. Plusieurs élutions avec 500 µl des tampons d'élution contenant une concentration croissante d'imidazole (100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM et 500 mM) sont réalisées afin d'identifier la condition d'élution de Txyl3231-His. Toutes les fractions de purification obtenues sont collectées pour vérifier la présence de la protéine recombinante par SDS-PAGE suivi d'un Western Blot. Une purification avec un plus grand volume de FS est effectuée dans les conditions optimales identifiées (10 ml de FS ; 1 ml de résine ; 3 lavages avec 5 ml de tampon de lavage élution avec 5 ml de tampon d'élution contenant 300 mM d'imidazole deux fois de suite). L'absorbance de cette fraction est mesurée à 280 nm pour permettre de déterminer la masse de protéine purifiée obtenue.

VI : Mesure des paramètres biochimiques de Txyl-3231-His et de son activité

VI.1. Détermination de la température et du pH optimal

Pour déterminer le pH optimal de Txyl-3231-His, des mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées dans une gamme de pH (de 4 à 10) à une température fixe de 30 °C. Une cinétique de 5 min est effectuée aux différents pH. Pour l'activité peroxydase, l'ABTS (2,5 mM) est utilisé comme substrat pour le test d'activité à pH acide (≤ 7). A pH basique, le substrat testé est le pyrogallol (2,5 mM). Les réactions sont réalisées dans du tampon phosphate citrate (100 mM) et du tampon Tris HCl 25 mM respectivement, et avec 100 µl d'enzyme purifiée (diluée ou non) et 10 mM H_2O_2. L'absorbance des mélanges réactionnels est mesurée à 405 nm (ABTS) et 420 nm (Pyrogallol). Pour l'activité catalase, le substrat utilisé est H_2O_2 (10 mM) uniquement et sa disparition est mesurée à 240 nm. Les activités sont mesurées en triple. En parallèle, une détermination des coefficients d'extinction molaire de l'ABTS et du pyrogallol oxydé est effectuée dans les différentes conditions. Les activités sont calculées comme décrit précédemment. L'autohydrolyse des substrats dans les différentes conditions de cinétique est évaluée. Les valeurs obtenues sont déduites des activités mesurées lors des essais. Le pH optimal est le pH où l'activité mesurée est maximale. Des pertes d'activité en fonction du pH sont également exprimées en % d'activité relative.

La température optimale est déterminée comme la méthode décrite pour le pH sauf que dans ce cas, le pH utilisé est le pH optimal (pH 7) et différentes températures (40 à 70 °C par trance de 5 °C) sont testées. Les réactions sont réalisées dans du tampon Tris HCl 25 mM. Les coefficients d'extinction molaire de l'ABTS et du pyrogallol oxydé sont déterminés aux différentes températures ainsi que l'autohydrolyse des substrats. Les valeurs obtenues sont déduites des activités mesurées lors des essais. La température optimale est la température où l'activité mesurée est maximale. Des pertes d'activités en fonction de la température sont également exprimées en % d'activité relative.

Résultats

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la physiologie de *TX* et son impact en présence de de différents substrats lignifiés ou de lignine industrielle. Une première partie sera consacrée à la caractérisation des différents substrats utilisés. La deuxième partie s'attachera à étudier la croissance de *TX* sur ces substrats et à évaluer la production de protéine ainsi que les activités enzymatiques au cours de la croissance. Enfin, une dernière partie sera dédiée aux effets de la croissance de *TX* sur les résidus de substrats et l'évolution des sucres et des molécules phénoliques présents dans le milieu de culture.

I : Caractérisation des substrats utilisés

I.1. Composition en lignines et polysaccharides

Les différents substrats utilisés dans cette étude sont la paille de blé (PB), la paille de blé explosée à la vapeur (PBEV) et la lignine Kraft (LK). Les analyses révèlent que ces substrats ont des compositions chimiques contrastées avec des teneurs en lignine et en polysaccharides différentes (**Tableau 17**).

Ces substrats possèdent des teneurs en lignines variées. Ainsi la teneur en lignines de la PB est plus faible que la teneur en lignines de la PBEV ou de la LK avec **23,7** ± 2,0 ; **30,3** ± 0,9 et **85,3** ± 1,0 % de matière sèche (MS) respectivement. L'hydrolyse acide des résidus permet de libérer les monomères constitutifs des polysaccharides. Les principaux sucres monomères obtenus à partir de la PB et de la PBEV sont le glucose, le xylose et l'arabinose. Dans le cas de la PB, le glucose est le sucre principal suivi par le xylose et l'arabinose. Dans la PBEV, le glucose est le sucre majoritairement obtenu et un contenu plus faible en xylose est observé comparativement à la PB. Ces trois sucres monomères sont attribuables aux glucanes (cellulose) et aux hémicelluloses (arabinoxylanes) dont les teneurs varient selon le substrat. La PB est riche en hémicellulose contrairement à la PBEV avec respectivement **20,7** ± 0,3 et **5,4** ± 0,0 % de la matière sèche. A l'inverse, la PBEV possède une plus forte proportion de glucanes que la PB avec respectivement **43,2** ± 0,4 et **30,8** ± 0,4 % de la matière sèche. Dans l'ensemble, les glucanes et les arabinoxylanes représentent la moitié de la matière sèche de la PB et la PBEV. En revanche, la LK est quasiment dépourvue de sucre dont la teneur est de **0,6** ± 0,0 % de la matière sèche.

Tableau 17 : Teneurs en lignines et en sucres des substrats lignifiés (% de matière sèche).

	PB	**PBEV**	**LK**
Lignine	**23,7** ± 2,0	**30,3** ± 0,9	**85,3** ± 1,0
Glucose	**34,2** ± 0,5	**48,0** ± 0,5	**0,1** ± 0,0
Xylose	**20,6** ± 0,2	**5,8** ± 0,0	**0,3** ± 0,0
Arabinose	**2,9** ± 0,1	**0,4** ± 0,0	**0,2** ± 0,0
Glucanes	**30,8** ± 0,4	**43,2** ± 0,4	**0,1** ± 0,0
Hémicelluloses	**20,7** ± 0,3	**5,4** ± 0,0	**0,5** ± 0,0
Polysaccharides	**51,6** ± 0,7	**48,6** ± 0,5	**0,6** ± 0,0

I.2. Composition en molécules phénoliques

Les parois de graminées sont caractérisées par la présence d'acides phénoliques estérifiés ou éthérifiés (acide *p*-coumarique, acide férulique et acide β-O-4 di-férulique) aux polymères pariétaux. Ces acides ont été quantifiés dans les substrats lignifiés par CLHP après hydrolyse alcaline. Les résultats obtenus pour les 2 substrats PB et PBEV sont présentés dans le **Tableau 18**. Ces composés sont détectés à l'état de traces après hydrolyse de la LK. La teneur en acides phénoliques de la PB est de **11,3** ± 0,2 $mg.g^{-1}$ de matière sèche (MS), avec principalement de l'acide *p*-coumarique (**5769,6** ± 118,2 $\mu g.g^{-1}$ de substrat) et de l'acide férulique (**5240,7** ± 68,2 $\mu g.g^{-1}$ de substrat). Dans la PBEV, les acides phénoliques représentent **9,0** ± 0,4 $mg.g^{-1}$ de substrat, avec principalement l'acide *p*-coumarique (**5843,1** ± 224,1 $\mu g.g^{-1}$ MS) et l'acide férulique (**2859,7** ± 119,0 $\mu g.g^{-1}$ MS). Ces composés sont majoritairement liés en éther avec 54,8 et 53,5 % pour la PB et la PBEV respectivement. Cependant, dans la PB, 35,2 % des acides féruliques sont liés en ester ainsi que 56,5 % des acides *p*-coumariques sont sous forme estérifiée. Dans la PBEV 45,5 % des acides féruliques sont estérifiés et on retrouve autant d'acides *p*-coumariques estérifiés et éthérifiés.

Tableau 18 : Composition en acides phénoliques liés en éthers et esters (µg.g^{-1} de matière sèche).

	PB	**PBEV**
Acide *p*-coumarique	**5769,6** ± 118,2	**5843,1** ± 244,1
Ester	**3261,6** ± 13,5	**2878,3** ± 74,5
Ether	**2508,0** ± 104,6	**2964,8** ± 169,5
Acide férulique	**5240,7** ± 68,2	**2859,7** ± 119,0
Ester	**1843,5** ± 36,0	**1300,2** ± 91,5
Ether	**3397,1** ± 32,2	**1559,5** ± 27,6
Acide Di-férulique (β-O-4)	**281,0** ± 17,1	**287,7** ± 12,9
Ester	**nd**	**nd**
Ether	**281,0** ± 17,1	**287,7** ± 12,9
Total	**11291,3** ± 203,4	**8990,4** ± 376,1

nd = non détecté

La principale différence entre PB et PBEV se situe au niveau de la teneur en acide férulique qui est deux fois moins importante dans PBEV avec une diminution plus importante de la fraction éthérifiée (54 %) par rapport aux formes estérifiées (30 %). Les dimères d'acide férulique qui sont sous forme β-O-4 sont exclusivement retrouvés sous forme éther et ne représentent qu'une très faible proportion des acides phénoliques (0,25 % et 0,32 % des acides phénoliques de PB et PBVE respectivement). Ces acides phénoliques ne sont pas détectés dans la LK.

I.3. Potentiels en lignines et en acides phénoliques dans les milieux de culture

Les potentiels en lignine et en acides phénoliques apportés par les différents substrats (50 mg) dans chaque culture (10 ml) sont présentés dans le **Tableau 19**.

Tableau 19 : Potentiels en lignines et acides phénoliques (µg.50 mg^{-1} matière sèche)

	PB	**PBEV**	**LK**
Potentiel en lignine	**11850,0** ± 1000,0	**15150,0** ± 136,4	**42650,0** ± 50,0
Potentiel en acides phénoliques totaux	**564,6** ± 10,2	**449,6** ± 18,8	**nd**
Acide *p*-coumarique	**288,5** ± 5,9	**292,2** ± 12,2	**nd**
Acide férulique	**262,1** ± 3,4	**143,0** ± 5,9	**nd**
Di-férulique (β-O-4)	**14,1** ± 0,4	**14,4** ± 0,7	**nd**

Potentiel en lignine = Pourcentage massique de lignine x Masse de substrat présent dans le milieu de culture
Potentiel en acides phénoliques = Acides phénoliques x (Volume milieu de culture / masse de substrat)

II : Croissance de *TX* sur des substrats lignifiés

II.1. Croissance bactérienne en présence de substrats lignifiés

II.1.1. La croissance bactérienne

Croissance sur les substrats lignifiés et la lignine Kraft

La croissance bactérienne sur les différents substrats lignifiés a été suivie pendant 30h. La bactérie cultivée dans le milieu de culture sans aucun substrat (Xylane 0 %), montre une croissance très faible avec une DO_{600nm} max de **0,13** ± 0,03 (**Figure 30**). La bactérie est capable de se développer sur l'ensemble des substrats lignifiés, avec des taux de croissance (µmax) de **0,48** ± 0,12 ; **0,23** ± 0,02 et **0,58** ± 0,08 h^{-1} ainsi que des DO_{600nm} max de **0,79** ± 0,02 ; **0,29** ± 0,02 et **0,56** ± 0,01 respectivement pour PB, PBEV et LK (**Tableau 20**). La comparaison des cultures de *TX* sur les trois substrats lignifiés montre que la phase exponentielle de croissance et les temps de génération de la bactérie sont deux fois plus faibles en présence de PBEV par rapport aux cultures sur PB et LK où ces paramètres sont davantage similaires.

Effet de la complémentation en xylane sur la croissance

L'ajout de 20 % ou 50 % de xylane dans les différents milieux de culture permet d'augmenter significativement la quantité de cellules obtenues sur l'ensemble des substrats. En effet, sur la PB, la DO_{600nm} max augmente de **0,79** ± 0,02 à **1,34** ± 0,11 et **2,37** ± 0,11 respectivement pour les complémentations à 20 % et 50 % de xylane. Sur la PBEV la DO_{600nm} max passe de **0,29** ± 0,02 à **0,38** ± 0,04 et **1,16** ± 0,05, et sur la LK la DO_{600nm} max varie de **0,56** ± 0,01 à **0,93** ± 0,07 et **2,09** ± 0,19 (**Figure 30**). Les cultures en présence de PB et PBEV, ont des paramètres de croissance similaires (**Tableau 20**). En revanche, en présence de LK, la complémentation en xylane conduit à une augmentation significative du taux de croissance (µmax). En parallèle, le temps de génération diminue avec l'augmentation de l'apport de xylane dans le milieu pour la LK complémentée. En présence de xylane seul, les taux de croissance sont similaires malgré une augmentation de la durée de la phase exponentielle de croissance et de la DO_{600nm} max (**1,00** ± 0,10 et **2,11** ± 0,07 pour les cultures avec xylane 20 % et 50 % respectivement). Les taux de croissance en présence des substrats complémentés sont environ de deux à sept fois plus faibles qu'en présence de xylane seul. Parmi les substrats complémentés à 50 %, le taux de croissance le plus élevée est obtenu avec la LK (µmax = **0,70** ± 0,14 h^{-1}) suivie de la PB (µmax = **0,60** ± 0,19 h^{-1}) et la PBEV (µmax = **0,25** ± 0,03h^{-1}). Ces variations sont illustrées sur la **Figure 31**, avec notamment une DO_{600nm} deux fois plus faible pour la PBEV par rapport aux autres substrats.

Temps de culture et latence sur l'ensemble des cultures

Pour l'ensemble des cultures sur substrats lignifiés, avec ou sans complémentation, des temps de latence sont observés avant le début de la phase exponentielle de croissance (**Figure 30**). Les durées de ces temps de latence sont de **5** h pour les cultures avec PB et PBEV, et **10** h pour la LK. Les durées des phases exponentielles de croissance sont également variables (de **3** à **15** h). En effet, ces phases exponentielles de croissance sont très rapides dans le cas de culture sur xylane seul (entre **3** et **5** h) et durent environ **10** h en présence de PB complémentée ou non (**Tableau 4**). En revanche, elles varient selon l'apport de xylane pour les cultures en présence de PBEV et LK. Pour ces deux substrats, ces phases exponentielles de croissance active durent **10** h et **15** h respectivement pour PBEV et LK complémentées avec 50 % de xylane et sont 2 à 3 fois plus longues par rapport aux cultures avec ces mêmes substrats complémentés à 20 % ou sans xylane (**Figure 31**). Nous observons également que les cellules en fin de culture (30h) sur l'ensemble des substrats sont en début de sporulation.

Tableau 20 : Comparaison des paramètres de croissance de *TX* sur les différents substrats lignifiés sans complémentation en xylane (0 %) ou avec complémentation en xylane (20 % et 50 %).

	Taux de croissance (µmax ; h^{-1})	Temps de génération (Tg ; h)	Temps de Latence (h)	Durée de phase de croissance (h)
PB 0%	**0,47** ± 0,12	**1,53** ± 0,38	**5**	**10**
PB 20%	**0,56** ± 0,08	**1,25** ± 0,16	**5**	**10**
PB 50%	**0,60** ± 0,19	**1,24** ± 0,41	**5**	**10**
PBEV 0%	**0,23** ± 0,02	**2,99** ± 0,24	**5**	**5**
PBEV 20%	**0,26** ± 0,02	**2,64** ± 0,24	**5**	**5**
PBEV 50%	**0,25** ± 0,03	**2,77** ± 0,32	**5**	**15**
LK 0%	**0,58** ± 0,08	**1,21** ± 0,15	**10**	**5**
LK 20%	**0,77** ± 0,02	**0,90** ± 0,02	**10**	**5**
LK 50%	**0,70** ± 0,14	**1,01** ± 0,19	**10**	**10**
Xylane 0%	/	/	/	/
Xylane 20%	**1,30** ± 0,03	**0,53** ± 0,01	**0**	**3**
Xylane 50%	**1,33** ± 0,04	**0,52** ± 0,02	**0**	**5**

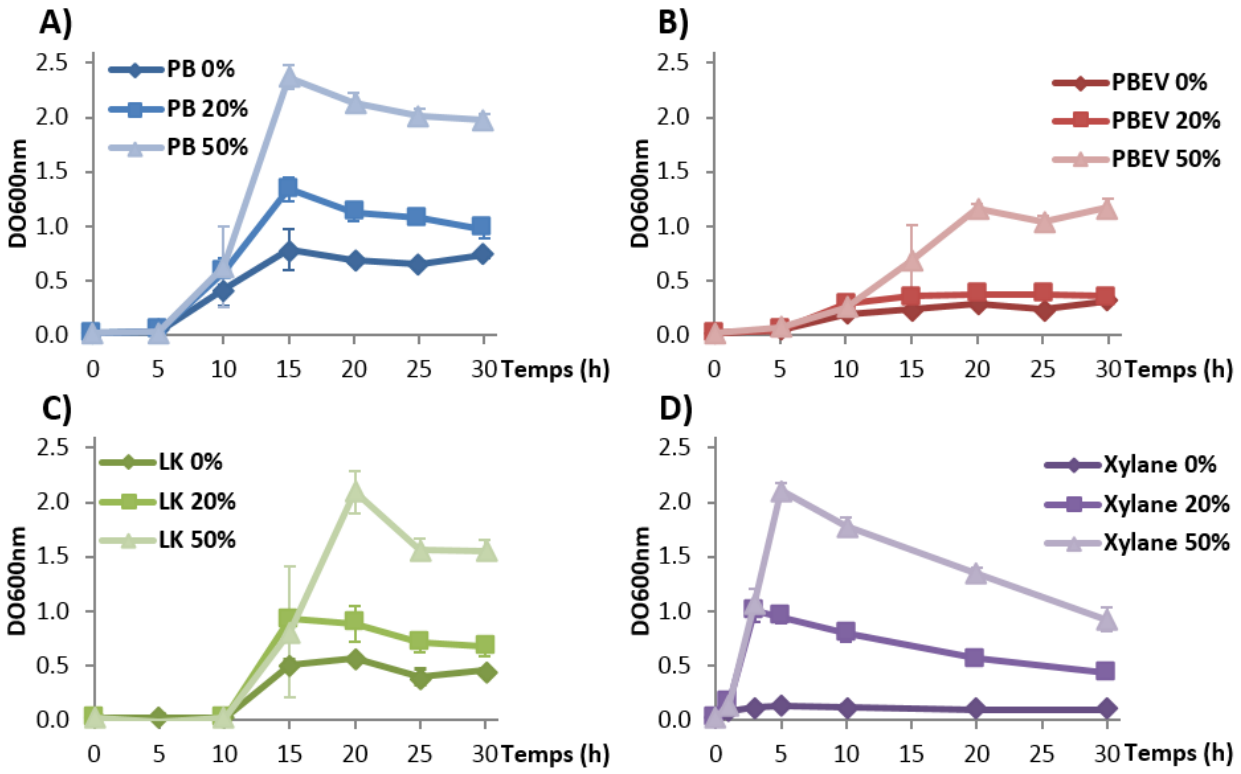


Figure 30 : Croissance de *TX* en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Ces substrats sont complémentés ou non avec du xylane à 20 % et à 50 %.

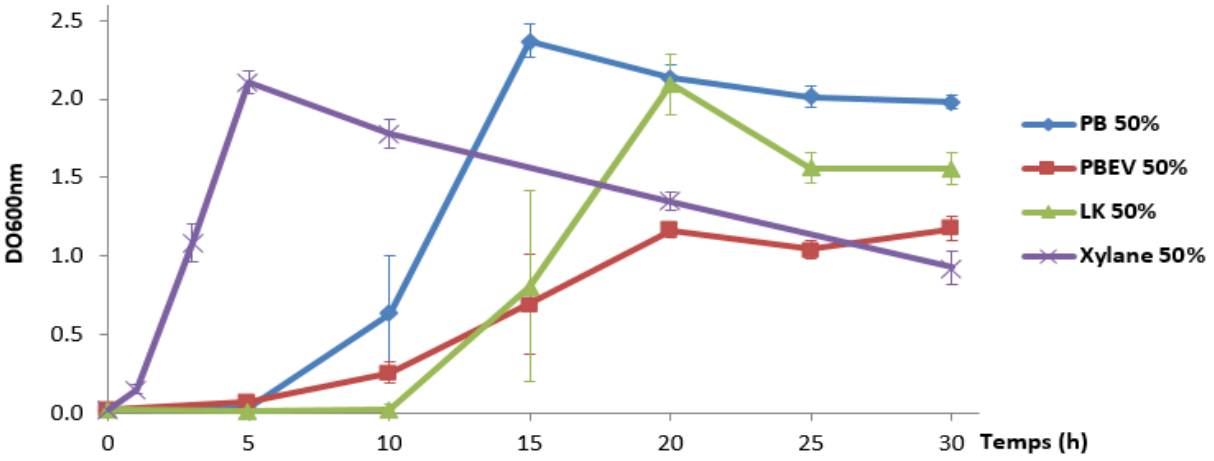


Figure 31 : Croissance de *TX* sur l'ensemble des substrats complémentés avec 50 % de xylane.

II.1.2. La production de protéines durant la croissance

Les productions de protéiques extracellulaires (EC) et intracellulaires (IC) durant la croissance bactérienne sur les différents substrats ainsi que les ratios EC/IC ont été évaluées en fonction du temps (**Figure 32**).

Production de protéines sur substrats lignifiés

Pour la culture avec PB, la production de protéines EC, exprimées par rapport à la croissance est importante en début de phase exponentielle de croissance (10 h) et reste stable jusqu'à la fin de cette phase (entre **88,1** ± 30,1 et **103,5** ± 17,8 µg.DO_{600nm}^{-1}) où elle diminue (**47,4** ± 9,6 µg.DO_{600nm}^{-1}) en fin de culture. Pour les protéines IC, la production de protéine augmente de **36,6** ± 6,9 à **86,1** ± 27,8 µg.DO_{600nm}^{-1} au cours du temps avec un maximum en fin de phase exponentielle de croissance à 20 h. Ensuite elle décroit en fin de culture comme pour les protéines EC. Les protéines EC sont trois fois plus importantes pendant la croissance (ratio EC/IC = **3,3** ± 0,3). Cette asymétrie dans la production de protéines s'atténue pendant la phase stationnaire pour arriver à l'équilibre avec un ratio EC/IC égal à **0,9** ± 0,5 en fin de culture.

En ce qui concerne le substrat PBEV, la production de protéine EC ne varie pas significativement au cours de la culture (entre **47,4** ± 22,9 et **79,1** ± 10,5 µg.DO_{600nm}^{-1}). En revanche, la production en protéines IC diminue au cours du temps avec un maximum en début de croissance (10 h) avec **94,6** ± 20,8 µg.DO_{600nm}^{-1}, et un minimum de **25,8** ± 16,8 µg.DO_{600nm}^{-1}. La dynamique de production des protéines est inversée par rapport au substrat PB, avec une production de protéines IC plus importante que les protéines EC en début de croissance (ratio EC/IC de **0,7** ± 0,2). En fin de phase de croissance (25h), la bactérie produit 2 fois plus de protéines EC que de protéines IC (ratio EC/IC de **2,2** ± 0,2).

Pour la culture avec LK, les concentrations en protéines augmentent au cours du temps avec **73,4** ± 13,3 µg.DO_{600nm}^{-1} pendant la croissance (15 h), pour atteindre **170,0** ± 32,0 µg.DO_{600nm}^{-1} en phase stationnaire. De manière similaire, la production des protéines IC augmente de **11,7** ± 6,0 au début de la croissance à **59,7** ± 20,5 µg.DO_{600nm}^{-1} en fin de culture. Les quantités de protéines EC sont plus importantes par rapport aux IC durant toute la culture ; cependant cette différence s'atténue au cours du temps : le ratio EC/IC diminue entre le début de croissance (EC/IC = **5,0** ± 1,6) et la fin de culture (EC/IC = **2,4** ± 0,3).

Les protéines n'ont pu être quantifiées dans le milieu de culture sans aucun substrat (Xylane 0 %) en raison de faibles concentrations en protéines. En revanche, en présence de xylane seul, les protéines EC sont détectables en fin de phase exponentielle de croissance (5 h) puis leur concentration augmente jusqu'à la fin de la culture pour atteindre **127,5** ± 23,3 et **137,5** ± 19,4 µg.DO_{600nm}^{-1} en présence de xylane 20 et 50 % respectivement. A l'inverse, les protéines IC sont importantes dès le début de la croissance à 3 h (avec **128,1** ± 3,3 et **129,0** ± 30,13 µg.DO_{600nm}^{-1} pour les cultures avec xylane 20 et 50 % respectivement) et augmentent légèrement durant le temps de culture (**137,5** ± 19,4 et **196,9** ± 1,4 µg.DO_{600nm}^{-1} en présence de xylane 20 et 50 % respectivement). Les dynamiques de production des protéines sont similaires avec la présence uniquement de protéines IC en début de culture, puis la concentration en protéines EC augmente pour se rapprocher du niveau de production de protéines IC en fin de culture (ratios EC/IC de **1,0** ± 0,4 et **0,7** ± 0,1 pour xylane 20 et 50 % respectivement).

Effet de la complémentation en xylane sur la production de protéines

Pour les cultures PB complémentées, la production de protéine EC et IC reste similaire par rapport à PB seule. En effet, la production de protéines EC est importante durant la phase exponentielle de croissance (entre **105,0** ± 9,7 et **114,5** ± 7,1 µg.DO_{600nm}^{-1}), puis diminue en fin de culture (**83,4** ± 5,6 et **84,3** ± 8,5 µg.DO_{600nm}^{-1} pour PB avec xylane 20% et 50 % respectivement). De même, pour les protéines IC, la production de protéines augmente au cours du temps (avec **31,5** ± 9,9 et **44,3** ± 4,7 µg.DO_{600nm}^{-1}, en début de croissance et atteint un maximum de **62,4** ± 15,5 et **62,8** ± 0,7 µg.DO_{600nm}^{-1} pour la complémentation à 20 et 50 % respectivement. Les dynamiques de production de protéines sur PB 20 % et PB 50 %, sont similaires à celles observées sur la PB seule, avec une prédominance de protéines EC par rapport aux protéines IC en début de croissance (ratio EC/IC = **4,4** ± 1,0 et **8,3** ± 0,7 pour PB 20 % et PB 50 % respectivement) et une répartition similaire en fin de culture, avec des ratios EC/IC proches de 1.

En ce qui concerne le substrat PBEV, l'ajout de xylane se traduit par une nette augmentation de la production de protéines EC, en particulier avec la complémentation à 20 %, alors que la production de protéines IC reste similaire par rapport à la croissance sur PBEV seule. Les concentrations maximales de protéines EC sont de **221,3** ± 19,4 et **143,0** ± 36,0µg.DO_{600nm}^{-1} durant la phase exponentielle de croissance, pour PBEV 20 % et PBEV 50 % respectivement. En revanche, comme pour la culture sans complémentation, la production en protéines IC diminue au cours du temps. Le maximum de production intervient en début de phase exponentielle de croissance (**82,7** ± 9,0 et **98,3** ± 33,4 µg.DO_{600nm}^{-1} pour PBEV 20 % et PBEV 50 % respectivement) et les concentrations minimales sont détectées en fin de culture (**33,8** ± 20,1 et **40,1** ± 10,1 µg.DO_{600nm}^{-1} pour PBEV 20 % et PBEV 50 % respectivement). Les dynamiques de production de protéines sont similaires à celles sur la PBEV seule, avec une production de protéines IC équivalente aux protéines EC en début de croissance (ratio EC/IC proche de 1), et une production de protéines EC plus importante en fin de culture (ratio EC/IC de **5,4** ± 0,5 et **2,1** ± 0,6 pour PBEV 20 % et PBEV 50 %).

Dans le cas de culture avec LK, l'ajout de xylane à 20 et 50 %, conduit à une production de protéines EC et IC plus importante en début et pendant la phase exponentielle de croissance. La concentration en protéines EC est maximale en phase stationnaire (**202,4** ± 36,9 µg.DO_{600nm}^{-1}) pour LK 20 %, alors que cette valeur maximale est obtenue durant la phase exponentielle croissance (**150,7** ± 20,3 µg.DO_{600nm}^{-1}) pour LK 50 %. La concentration baisse fortement en fin de culture (**49,9** ± 2,4 et **33,2** ± 1,1 µg.DO_{600nm}^{-1} en présence de LK 20 % et LK 50 % respectivement). En ce qui concerne les productions des protéines IC, celles-ci sont les plus importantes en fin de phase exponentielle de croissance, avec **100,5** ± 16,9 et **49,4** ± 1,4 µg.DO_{600nm}^{-1} pour les cultures LK 20 et LK 50 % respectivement. La dynamique de production des protéines est similaire à celle observée sur la LK seule, mais l'ajout de xylane atténue l'importance de la production de protéines EC en début de croissance. Dans tous les cas, la production de protéines EC reste toujours supérieure à la production de protéines IC contrairement aux autres substrats, en particulier en début de croissance (ratio EC/IC de **3,3** ± 0,4 et **2,4** ± 0,6 avec LK 20 % et LK 50 % respectivement). Ces différences de production s'atténuent au cours de la croissance ; les ratios EC/IC sont respectivement de **1,9** ± 0,4 et **2,0** ± 0,5 avec LK 20 % et LK 50 % en fin de culture.

Dans l'ensemble, la concentration en protéines produites durant la croissance augmente dans les cultures complémentées en xylane. C'est l'ajout de 50 % de xylane qui a permis la production de protéines la plus élevée pour le substrat PB, alors que pour les substrats PBEV et LK, c'est la complémentation à 20 % qui a permis la meilleure production de protéines.

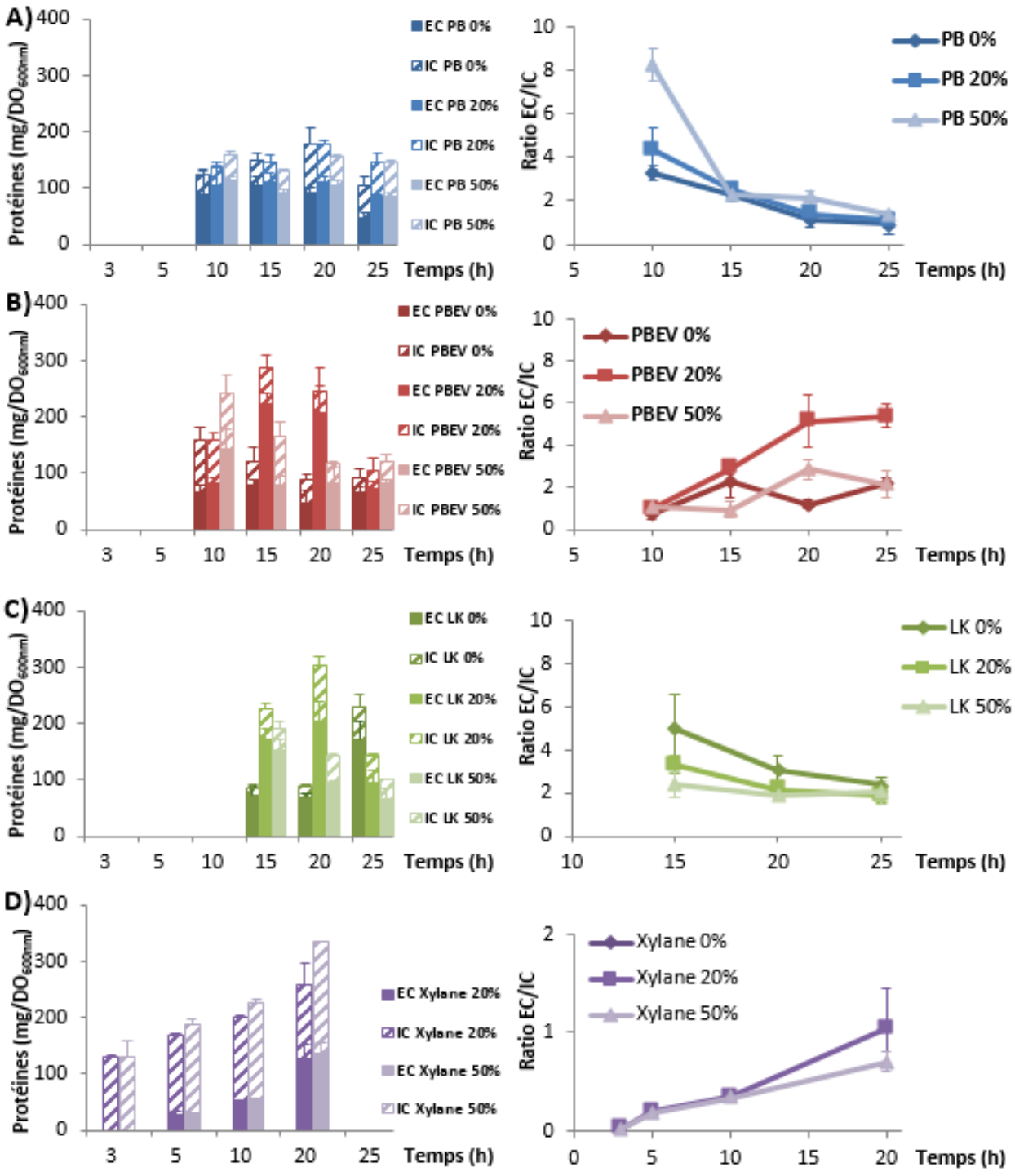


Figure 32 : Cinétique de production de protéines en fonction de la croissance (DO_{600nm}), et évolution du ratio EC/IC, en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les concentrations protéiques extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les concentrations protéiques intracellulaires (IC) sont hachurées.

II.2. Les activités enzymatiques

II.2.1. Les activités xylanases

Les productions de xylanases par *TX* au cours du temps sur les différents substrats sont présentées en fonction de la croissance (DO_{600nm}) et en fonction de la concentration protéique (**Figure 33**). Ces activités xylanases sont presque uniquement extracellulaires. En effet, aucune activité xylanase intracellulaire n'est détectée en présence de LK et PBEV alors que celles-ci sont très faibles en présence de PB et de xylane avec un maximum de 0,3 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et 5 $UI.mg^{-1}$ avec une complémentation en xylane (données non présentées).

Activités xylanases sur des substrats lignifiés

Sur les substrats seuls, aucune activité xylanase n'est observée dans les milieux de cultures contenant la PBEV et la LK. En revanche, en présence de PB, l'activité xylanase EC augmente au cours du temps avec **1,1** ± 0,8 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ en début de phase exponentielle croissance et s'élève à **3,7** ± 0,5 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ en fin de culture. De même, cette activité xylanase EC, exprimée en fonction de la production de protéines, augmente de **5,3** ± 2,4 $UI.mg^{-1}$ en début de croissance à **80,5** ± 18,5 $UI.mg^{-1}$ en fin de culture avec la PB.

Effet de la complémentation en xylane sur la production d'activités

Après complémentation en xylane, des activités xylanases EC sont détectées pour l'ensemble des substrats. Pour la PB 20 % et PB 50 %, les activités xylanases EC (en fonction de la croissance ou de la production protéiques) augmentent par rapport à la PB seule. La complémentation de 20 % en xylane permet de passer en début de phase exponentielle de croissance de **1,1** ± 0,2 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et **11,4** ± 2,4 $UI.mg^{-1}$ à **10,9** ± 0,7 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et **131,2** ± 3,0 $UI.mg^{-1}$ en fin de culture. Des évolutions et des niveaux de productions similaires sont observés avec PB 50 %.

Pour la PBEV 20 % et PBEV 50 %, la dynamique globale d'augmentation des activités xylanases au cours du temps est la même que sur la PB seule. Les activités xylanases augmentent durant la phase exponentielle de croissance. En revanche, contrairement à la PB seule, le niveau de la complémentation a un impact sur les concentrations de ces activités. Avec la complémentation de 20 % en xylane, l'activité augmente de **0,4** ± 0,3 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**13,0** ± 6,7 $UI.mg^{-1}$) en début de culture à **2,2** ± 0,3 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**33,8** ± 4,5 $UI.mg^{-1}$) en fin de culture. La complémentation de PBEV avec du xylane 50 % permet d'augmenter davantage les activités xylanases en passant en début de croissance de **0,6** ± 0,2 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**6,0** ± 1,5 $UI.mg^{-1}$) à **7,9** ± 1,0 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**98,0** ± 10,5 $UI.mg^{-1}$) en fin de culture.

Pour la LK complémentée avec 20 et 50 % de xylane, il est observé comme précédemment une augmentation des activités xylanases au cours du temps et un effet moins marqué de la complémentation de 20 % en xylane par rapport 50 % de xylane. Après ajout de xylane 20 %, les activités varient de **0,3** ± 0,2 UI.DO_{600nm}^{-1} et **2,0** ± 1,2 UI.mg^{-1} en début de culture à **1,9** ± 0,2 UI.DO_{600nm}^{-1} et **14,8** ± 3,2 UI.mg^{-1} en fin de culture. Pour la complémentation en xylane de 50 %, ces activités augmentent de **1,3** ± 0,7 UI.DO_{600nm}^{-1} et **6,5** ± 3,6 UI.mg^{-1} à **5,6** ± 0,4 UI.DO_{600nm}^{-1} et **70,2** ± 14,6 UI.mg^{-1} en fin de culture.

Enfin, en présence de xylane à 20 et 50 %, le niveau de xylane ajouté dans le milieu de culture a un impact sur la production de xylanases. Les xylanases augmentent au cours du temps en fonction de la croissance (de **0,3** ± 0,1 UI.DO_{600nm}^{-1} et **0,2** ± 0,0 UI.DO_{600nm}^{-1} en début de phase exponentielle de croissance à **4,6** ± 0,4 UI.DO_{600nm}^{-1} et **10,1** ± 2,3 UI.DO_{600nm}^{-1} en fin de culture pour Xylane 20 % et Xylane 50 % respectivement). En revanche, les activités xylanases en UI.mg^{-1} de protéines, sont à leur niveau maximal en début de phase exponentielle de croissance (~ 80 UI.mg^{-1}). En présence de Xylane 20 %, les activités diminuent à **37,2** ± 8,4 UI.mg^{-1} en phase stationnaire et en fin de culture alors qu'elles restent stables (**73,0** ± 8,7 UI.mg^{-1}) en présence de Xylane 50 %.

Globalement, les complémentations en xylane permettent d'augmenter les activités xylanases EC sur l'ensemble des substrats lignifiés et de LK. Les activités xylanases sont plus importantes en fin de culture (phase stationnaire), sauf pour la culture avec xylane qui, à l'inverse, a une production d'activités xylanases maximale en début de phase exponentielle de croissance. La comparaison des niveaux de production entre les différents substrats (à la fin de culture) montre que c'est la PB qui permet la meilleure production de xylanase suivie par la PBEV puis la LK et le xylane qui conduisent à des niveaux de production similaires.

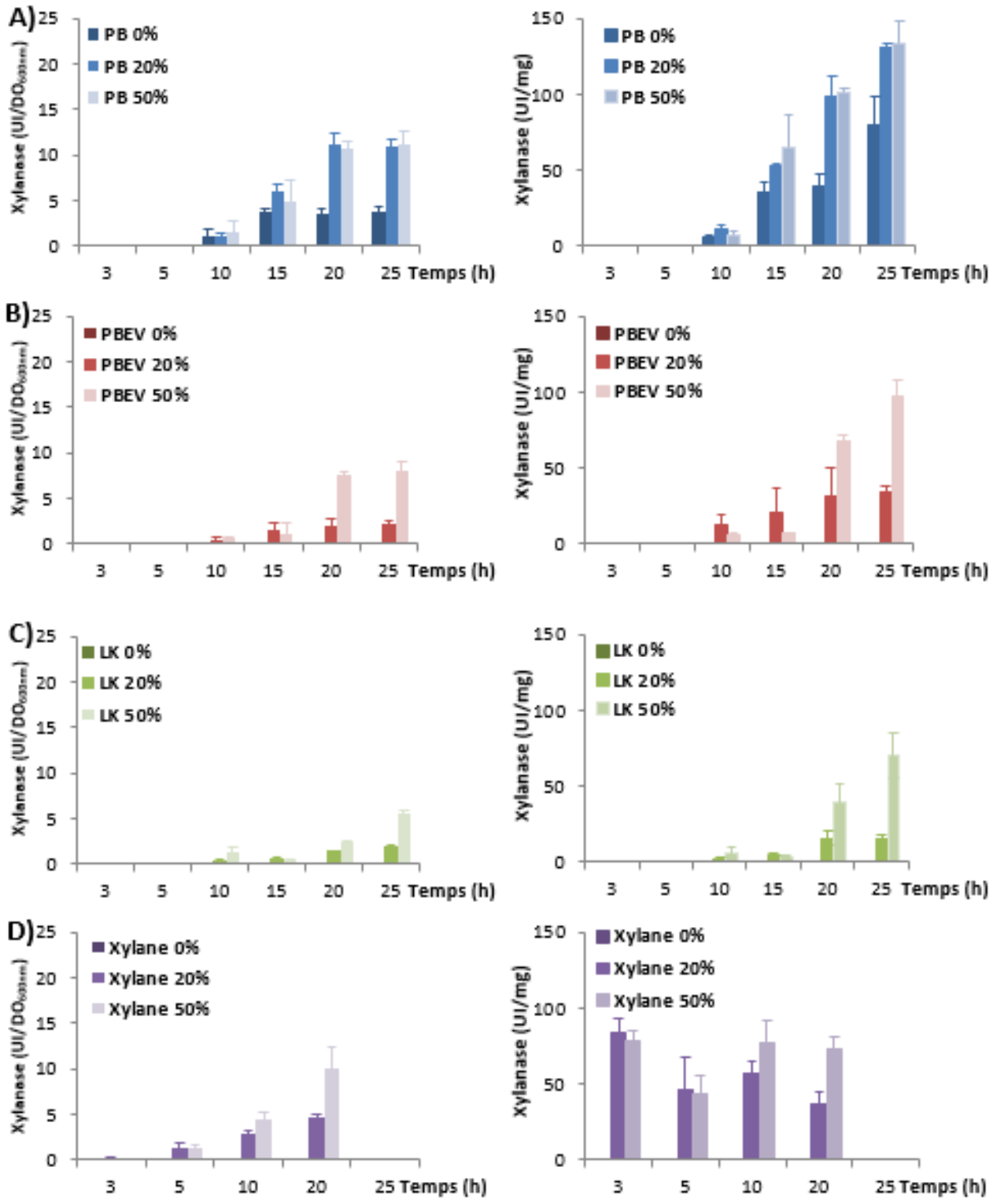


Figure 33 : Cinétique de production d'activités xylanases en fonction de la croissance (DO_{600nm}) et en fonction de la production de protéines (mg) au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane.

II.2.2. Les activités phénol-oxydases

Les productions de phénol-oxydases (POX) par *TX* au cours du temps selon les différents substrats utilisés ainsi que les ratios EC/IC sont présentés en fonction de la croissance (DO_{600nm}) (**Figure 34**) et en fonction de la concentration en protéine (mg) (**Figure 35**). Ces résultats permettent de visualiser des dynamiques de productions des activités POX aussi bien au niveau de leur compartimentation cellulaire qu'au cours du temps.

Activités phénol-oxydases sur des substrats lignifiés

Aucune activité POX n'est retrouvée sur le milieu de culture sans substrat (Xylane 0 %). Sur les substrats seuls, les activités POX EC en fonction de la croissance et de la concentration protéique sont uniquement présentes sur les cultures PB et PBEV et sont maximales au début de la phase exponentielle de croissance. En revanche, au niveau IC, les activités POX en fonction de la croissance sont prédominantes sur la PB, tandis que les activités POX en fonction des protéines sont importantes sur l'ensemble des substrats lignifiés.

En ce qui concerne le substrat PB, les activités POX en fonction de la croissance et de la production protéique sont similaires, avec de fortes activités EC en début de phase exponentielle de croissance (10 h) (**2,3** ± 0,7 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et **3,0** ± 0,5 $UI.mg^{-1}$). Elles diminuent progressivement au cours du temps et représentent en fin de culture **0,7** ± 0,3 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**1,5** ± 0,8 $UI.mg^{-1}$). Pour les activités POX IC, c'est l'inverse, les activités apparaissent durant la phase exponentielle de croissance et atteignent leur niveau maximum en fin de phase exponentielle de croissance ou en début de phase stationnaire (20 h) avec **2,8** ± 0,2 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ (**4,4** ± 0,2 $UI.mg^{-1}$).

Pour la PBEV, l'évolution des activités POX EC suit la même dynamique que les activités obtenues sur la PB, mais avec des niveaux de production plus importants (**5,17** ± 1,01 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et **8,05** ± 0,75 $UI.mg^{-1}$ en début de phase exponentielle de croissance (10 h)). Parmi les cultures sur substrats sans complémentation, la production maximale de POX EC est obtenue sur PBEV. En revanche, l'évolution des activités IC en $UI.DO_{600nm}^{-1}$ ou $UI.mg^{-1}$ est différente. En effet, les activités IC exprimées en $UI.DO_{600nm}^{-1}$ restent constantes mais faibles durant toute la culture (entre **0,8** ± 0,1 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ et **0,3** ± 0,1 $UI.DO_{600nm}^{-1}$) alors que les activités IC POX en $UI.mg^{-1}$ de protéine montrent une augmentation au cours du temps et une activité maximale en fin de croissance après 10 h de culture (**9,3** ± 0,9 $UI.mg^{-1}$).

TX a une production d'activités POX exclusivement IC en présence de LK. Au niveau des activités POX IC en $UI.DO_{600nm}^{-1}$, comme sur la PBEV, les activités sont constantes mais faibles durant l'ensemble de la culture (elles varient de **0,3** ± 0,1 $UI.DO_{600nm}^{-1}$ à **0,6** ± 0,2 $UI.DO_{600nm}^{-1}$).

En revanche, les activités POX IC en UI.mg^{-1} sur la LK sont prédominantes en début de culture (15 h) avec **5,2** ± 0,4 UI.mg^{-1} puis une diminution progressive est observée. Après 25 h de culture, les activités POX IC ne représentent plus que **1,2** ± 0,9 UI.mg^{-1}. Parmi les substrats non complémentés testés, la production maximale de POX IC (en UI.mg^{-1}) est obtenue sur LK.

En présence de xylane, les activités POX sont uniquement IC. Les dynamiques des activités POX sont identiques pour les deux conditions Xylane 20 % et 50 %. Ces activités augmentent au cours du temps et sont maximales en phase stationnaire (après 20 h de culture). Elles représentent **1,2** ± 0,3 UI.DO_{600nm}^{-1} et **0,7** ± 0,1 UI.mg^{-1}. Ces activités sont largement inférieures à celles obtenues en présence de PB, PBEV et LK.

Effet de la complémentation en xylane sur la production d'activités

L'effet de la complémentation en xylane sur le niveau de productions d'activités POX, ainsi que la compartimentation cellulaire au cours du temps sont très variables en fonction des substrats.

Globalement, les activités POX EC et IC diminuent dans les cultures sur PB complémentée. Par ailleurs, plus la quantité de xylane ajoutée augmente, plus ces activités POX diminuent. En revanche, ces complémentations n'ont aucun effet sur les dynamiques de localisation des activités POX (POX EC maximale en début de phase exponentielle de croissance et POX IC maximale en phase stationnaire). Les activités POX EC sur PB complémentées sont 3 à 6 fois inférieures pendant la phase de croissance comparativement à la PB seule. Les activités POX IC diminuent de 2 à 3 fois par rapport aux activités mesurées sur la PB seule en fin de croissance et début de phase stationnaire (20 h). Au niveau de la localisation de ces activités, les ratios EC/IC, que ce soit en fonction de la croissance ou des protéines, les dynamiques observées sont similaires avec POX essentiellement EC en début de croissance (10 h) (ratios EC/IC > 1). Puis la dynamique s'inverse avec une production POX principalement IC avec des différences plus importantes après la fin de la croissance (20 h). Les activités POX IC sont 5 et 8 fois plus importantes que les activités POX EC (en UI.DO_{600nm}^{-1} et en UI.mg^{-1} respectivement).

Dans les milieux contenant de la PBEV et de la LK, l'ajout de xylane à 20 et 50 % conduit à une augmentation significative des activités POX EC et IC. Ces complémentations ont un impact sur la compartimentation de ces activités. En effet, plus l'addition de xylane est importante et plus les activités POX sont localisées dans les cellules (IC).

En ce qui concerne la PBEV, la complémentation induit de plus fortes activités POX EC. Les activités maximales POX EC (UI.DO_{600nm}^{-1}) sur PBEV 50 % sont de 1,5 fois (en début de croissance 10 h) et 3 fois (en fin de croissance après 25 h de culture) plus importantes que les activités sur PBEV seule. En revanche, pour les activités en fonction de la production de protéines, les activités POX EC ne sont pas modifiées significativement par la complémentation. Pour les activités POX IC (UI.DO_{600nm}^{-1} ou UI.mg^{-1}), la complémentation permet d'augmenter les activités entre 2 et 5 fois au cours du temps pour PBEV 20 % et PBEV 50 % par rapport à PBEV seule. Les dynamiques globales de la répartition des POX (EC/IC) sont peu modifiées par la complémentation en xylane. La principale variation est observée en début de croissance où la production relative de POX EC augmente par rapport à la culture PBEV seule (ratio EC/IC entre 10 et 15 en fonction de la croissance et entre 3 et 10 en fonction des protéines produites). Ces dynamiques s'atténuent au cours du temps en fonction de la croissance (ratio EC/IC entre 1 et 2,5, **Figure 34**), voire finissent par s'inverser avec une plus grande production d'activités IC (ratio EC/IC entre 0,3 et 0,4) pour les activités en fonction des protéines (**Figure 35**).

Après complémentation de la LK, on observe une production d'activités EC, qui n'était pas détectable en présence de LK seule. Les activités POX EC sur LK 20 % sont maximales en phase stationnaire (25 h) (**1,9** ± 0,2 UI. DO_{600nm}^{-1} et **1,6** ± 0,5 UI.mg^{-1}) et elles sont supérieures aux activités obtenues en présence de LK 50 % (**0,8** ± 0,1 UI. DO_{600nm}^{-1} et **1,8** ± 0,6 UI.mg^{-1}). Ces évolutions sont aussi observées au niveau des activités POX IC, avec des activités maximales de **2,4** ± 0,3 UI.DO_{600nm}^{-1} et **10,8** ± 1,2 UI.mg^{-1} avec LK 20 % et LK 50 % respectivement en début de phase exponentielle de croissance (15 h). Ces augmentations d'activités POX IC varient de 2 à 5 fois (UI.DO_{600nm}^{-1}) et 2 à 3 fois (UI.mg^{-1}) comparativement aux activités obtenues sur LK sans complémentation. Concernant les dynamiques de localisation des activités, plus la complémentation en xylane est importante plus les activités POX IC sont importantes. En début de croissance (15 h) les ratios EC/IC sur LK 50 % sont inférieurs à 1 en début de croissance (15 h), puis ces ratios augmentent pour finir au-dessus de 1 en fin de croissance. Ces différences de production d'activités vont s'atténuer au cours du temps ; TX produit en fin de culture 1,5 fois (UI.DO_{600nm}^{-1}) et 4 fois (UI.mg^{-1}) plus d'activités POX IC que d'activités POX EC.

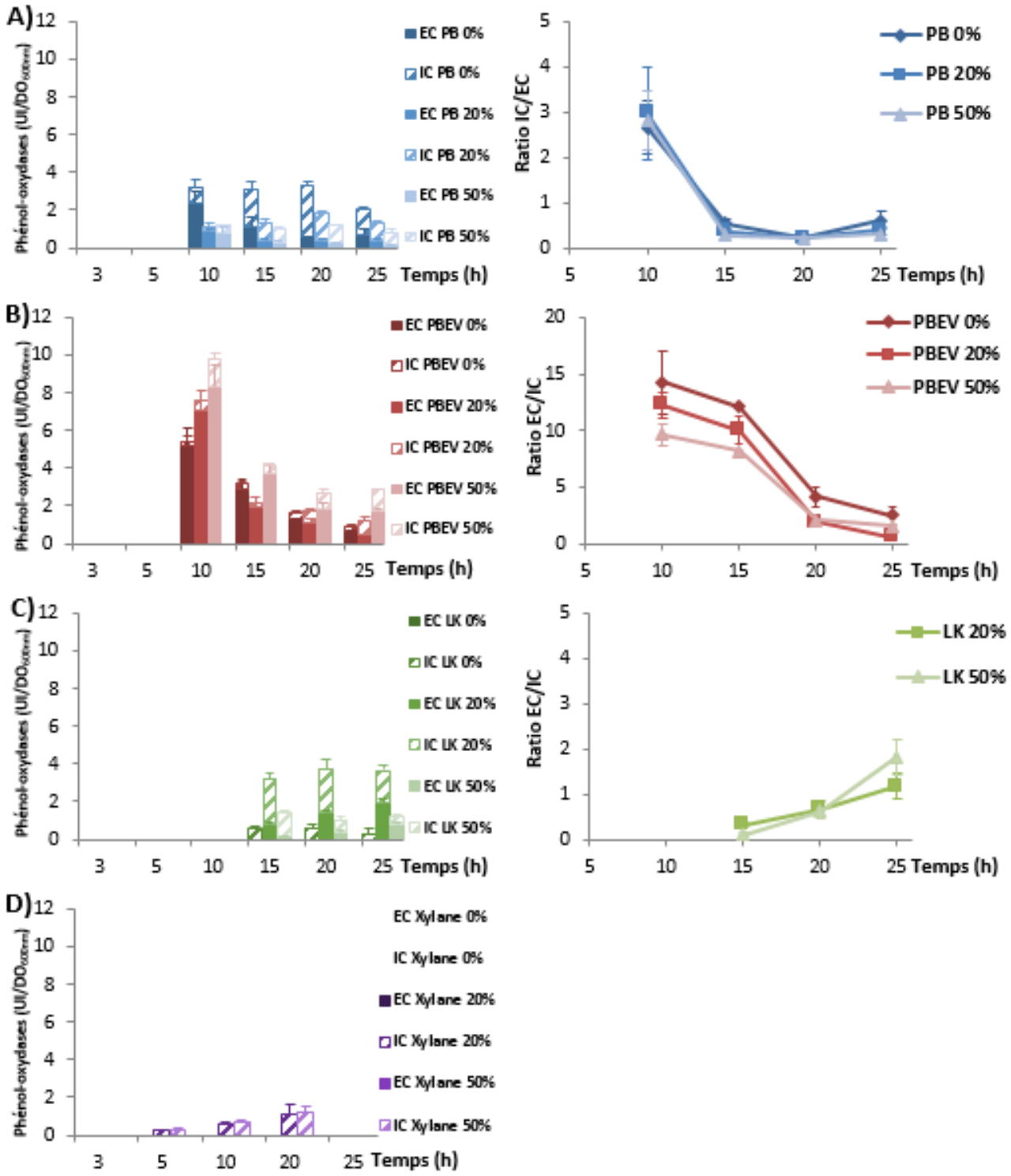


Figure 34 : Cinétique de production des activités phénol-oxydases en fonction de la croissance (DO_{600nm}) et évolution du ratio EC/IC, au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les activités extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les activités intracellulaires (IC) sont hachurées.

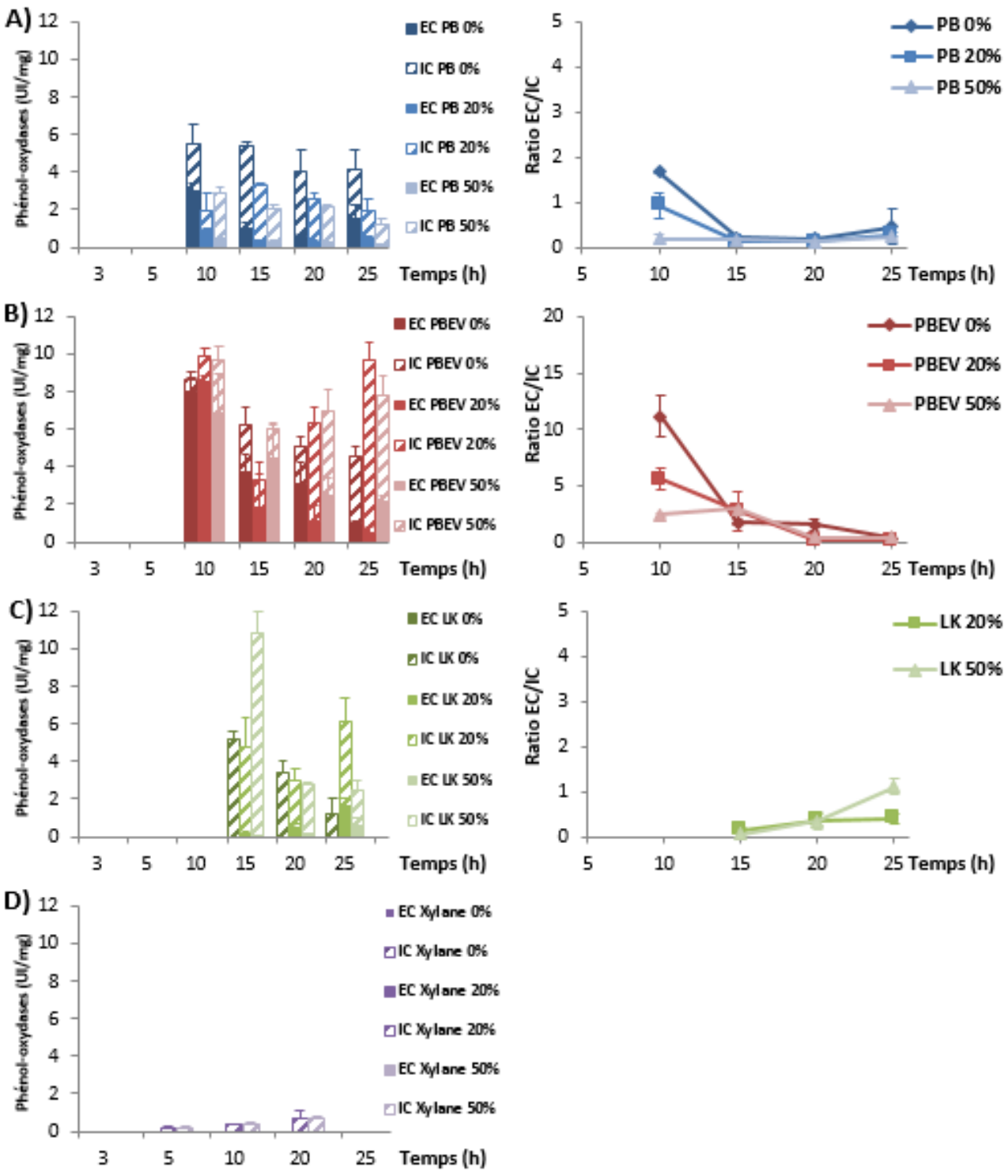


Figure 35 : Cinétique de production d'activités phénol-oxydases en fonction des protéines et évolution du ratio EC/IC, au cours du temps en présence de : A) PB, B) PBEV, C) LK et D) Xylane. Les activités extracellulaires (EC) sont en couleurs unies et les activités intracellulaires (IC) sont hachurées.

III : Effet sur les résidus et composés phénoliques

III.1. Caractérisation des résidus

III.1.1. Analyse infra-rouge

L'infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique rapide d'analyse qualitative et semi-quantitative, non destructive permettant de visualiser les modifications des fonctions chimiques associées aux composés des résidus. Les bandes de vibrations correspondent à différentes fonctions chimiques, qui peuvent être retrouvées dans plusieurs composés. Néanmoins, certaines bandes sont plus précisément attribuées que d'autres, comme la bande à 1510 cm^{-1}, qui est caractéristique des noyaux aromatiques de la lignine dans le cas de résidus lignifiés. Les spectres des différents résidus des substrats riches en lignine avec et sans croissance bactérienne (Témoin 30 h) sont présentés dans la **Figure 36**. Les différentes bandes d'absorption et leurs attributions sont présentées dans le **Tableau 21**.

Les profils des spectres obtenus pour PB et PBEV, sont proches avec des intensités importantes au niveau de la bande caractéristique de la lignine (1510 cm^{-1}) et dans la région 1400 et 1000 cm^{-1}, région spectrale correspondant aux bandes principalement attribuées aux fonctions chimiques de la cellulose et des hémicelluloses (par exemple les bandes 1315, 1200, 1115 et 900 cm^{-1} sont des bandes attribuées à la cellulose et à l'hémicellulose). Une diminution d'intensité est observée dans le cas de PBEV au niveau de la bande à 1730 cm^{-1} caractéristique des fonctions esters, attribuables aux xylanes. Contrairement à PB et PBEV, il n'a pas été possible d'isoler le résidu LK en raison de sa solubilité dans le milieu de culture. Dans ce cas, le milieu de culture a été lyophilisé avant analyse, la contribution de composés présents dans le milieu ne peut être exclue. Néanmoins, les spectres de LK se distinguent nettement des spectres PB et PBEV, en révélant une moindre intensité dans la région correspondant aux polysaccharides (1400 à 1000 cm^{-1}). Plusieurs bandes correspondant à un étirement ou une vibration des noyaux aromatiques (1650, 1595, 1510, 1400, 1035 cm^{-1} ou encore à 850 et à 840 cm^{-1}) sont présentes dans les spectres infrarouge.

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin de comparer visuellement l'ensemble des spectres des résidus lignifiés avec et sans croissance bactérienne (**Figure 37A**). En accord avec les données chimiques présentées précédemment, cette analyse montre des différences marquées entre la LK et la PB/PBEV, illustrée par la composante principale 1 (CP1) qui représente 98 % de la variance des spectres (**Figure 37B**). Les différences entre la LK avec la PB/PBEV sont matérialisées par le vecteur ou

« loading score » associée à la CP1, avec des intensités de bandes plus importantes pour la LK entre 2000-1360 cm^{-1} et 860-800 cm^{-1} ; à l'inverse les bandes sont plus intenses pour la PB et la PBEV entre 1360 et 860 cm^{-1}. Cette première analyse en composante principale montre que les spectres des résidus avec croissance (C) se distinguent des témoins sans croissance (T) pour PB et PBEV avec ou sans complémentation.

Suite à l'analyse globale des spectres, une deuxième analyse a été réalisée en considérant chaque résidu avec et sans croissance. Dans le cas de la PB, l'ACP des spectres infrarouge permet par l'intermédiaire de la CP1 de séparer les spectres des résidus avec et sans croissance bactérienne avec un score CP1 90 % (**Figure 38**). Ceci montre que la croissance bactérienne, a un effet significatif sur PB avec complémentation. Le loading score associé à la CP1 permet de visualiser les bandes dont les intensités sont les plus impactées avec croissance bactérienne. Celles-ci sont comprises dans la région spectrale (entre 1200 et 950 cm^{-1}) correspondant aux bandes de vibration des fonctions chimiques associées aux polysaccharides (cellulose et hémicellulose). Les bandes identifiées comme fortement modifiées sont les bandes à 1165, 1115 et 1050 cm^{-1} ou encore la bande à 990 cm^{-1} qui est caractéristique des arabinoxylanes.

Contrairement à l'analyse des spectres de PB, l'ACP des spectres correspondant à la PBEV avec et sans complémentation ne permet pas de séparer totalement les résidus avec et sans croissance bactérienne (**Figure 39**). Néanmoins, le loading score associé à la CP1 (83 %), montre que les spectres sont modifiés après croissance au niveau de la région correspondant aux bandes de vibrations des composés aromatiques entre 1800 et 1400 cm^{-1} (bandes 1650, 1510 et 1400 cm^{-1}). En revanche, la zone des polysaccharides (1200-950 cm^{-1}) révélée par le loading score de la CP1 correspond à une région spectrale dont l'intensité augmente après croissance. Compte tenu de la très faible teneur en xylane de PBEV, la région 1200 - 950 cm^{-1} révélée par la CP1 pourrait être attribuée aux bandes de vibration de la cellulose qui n'est pas dégradée par *TX*.

Concernant l'analyse des spectres correspondant à la LK, l'ACP montre que la CP1 permet de séparer les spectres avant et après croissance bactérienne (84 %). Le loading score associé à la CP1, permet de visualiser les bandes les plus impactées par cette croissance bactérienne. Comme pour la PB, les bandes associées aux polysaccharides 1165, 1115, 1050, 1035 et 990 cm^{-1} sont impactées par la croissance bactérienne. Dans ce cas, ces bandes seraient associées au xylane ajouté en complémentation à la LK (spectre du milieu de culture lyophilisé). Le loading score montre également des bandes dans la région attribuable aux composés aromatiques (**Figure 40**). Toutefois les deux bandes principales (1540 et 1650 cm^{-1}) peuvent

correspondre aux vibrations des fonctions amides et refléter la présence de protéines dans le milieu de culture.

Les ACP ont été complétées par une analyse par soustraction de spectres des résidus sans croissance et avec croissance pour chaque substrat et chaque condition de complémentation. Les résultats sont concordants avec les ACP précédentes, en particulier l'intensité des bandes arabinoxylanes diminue après croissance de TX sur PB ; cet effet est renforcé pas la complémentation en xylane. Après croissance sur PBEV, les spectres de différence suggèrent une diminution de l'intensité des bandes aromatiques sans effet de la complémentation. Dans le cas de la LK, les spectres de différences montrent des variations plus marquées avec la complémentation au niveau de la région associée aux xylanes, illustrant la consommation du xylane ajouté au milieu de culture (Annexe).

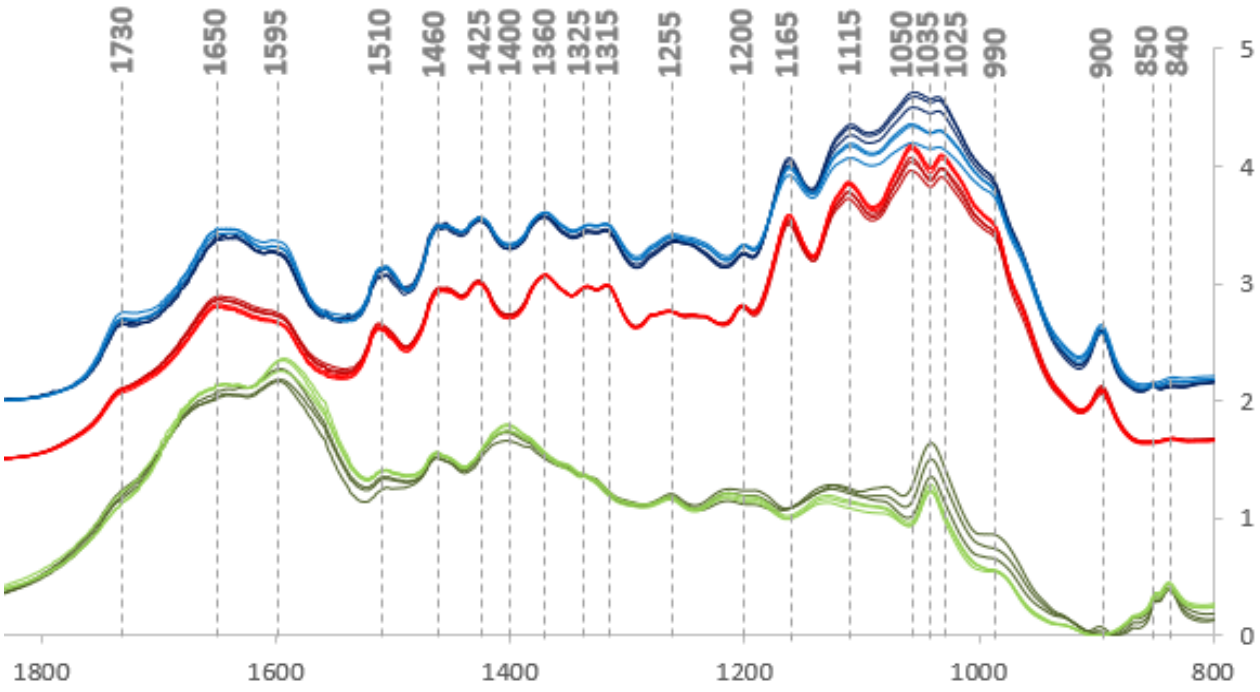


Figure 36 : Spectres infrarouge à transformée de Fourier des substrats avec ou sans croissance bactérienne des résidus. Les spectres bleus, rouges et verts correspondent respectivement aux résidus PB, PBEV et LK.

Tableau 21 : Attribution des différentes bandes d'absorption.

Bandes	Attribution	Réf
1730 cm^{-1}	Étirement du C=O non conjugué chez les hémicelluloses ou noyau aromatique	1 2 3 4 7
1650 cm^{-1}	Étirement du C-O conjugués carboxylique ou O-H dans le noyau aromatique	4 5 7
1595 cm^{-1}	Étirement du C=C ou C=O dans le noyau aromatique de la lignine	1 4 5 6 8-12
1510 cm^{-1}	Étirement du C-C ou C=C dans le noyau aromatique dans la lignine	1 4 5 6 8-12
1460 cm^{-1}	Déformation du C–H dans la lignine (ou xylane) Déformation d'un -CH3 ou –CH2- asymétrique (lignine kraft)	1 4 5 6 9-11
1425 cm^{-1}	Déformation du C-H dans la cellulose ou la lignine	4 5 6 7
1400 cm^{-1}	Déformation du C-H Déformation d'un C-O d'un alcool aromatique (lignine kraft)	3 9 11
1360 cm^{-1}	Déformation du C-H d'un alcool aliphatique ou phénolique	2 5 7
1325 cm^{-1}	Étirement du C-O le noyau aromatique (Unité S)	3 5
1315 cm^{-1}	Vibration du C-H au niveau dans cellulose/hémicellulose/Lignine	1 4
1255 cm^{-1}	Étirement du C-O dans l'hémicellulose Etirement d'un C-O d'un groupe méthoxyle aromatique (Unité Gaïacyle)	4 6 7 10 12
1200 cm^{-1}	Étirement ou déformation du C-O dans la cellulose et hémicellulose	5 7
1165 cm^{-1}	Étirement du C-O-C asymétrique de la liaison glycosidique β-(1,4)	1 3 4 6
1115 cm^{-1}	Étirement du C-H dans la cellulose ou lignine (Unité S)	4 5
1050 cm^{-1}	Étirement du C-O dans la structure de la cellulose ou hémicellulose	4 6 7
1035 cm^{-1}	Étirement du C-O ou C-H dans la cellulose Étirement du C-O(H) ou C-O(C) d'un aliphatique ou aromatique (lignine)	1 3 6 8 9-12
1025 cm^{-1}	Étirement du C-O ou du C-H	6
990 cm^{-1}	Étirement du -HC=C-H- dans les chaines latérales des arabinoxylanes	3
900 cm^{-1}	Vibration du C-H dans les liaisons glycosidiques	
850 cm^{-1}	Déformation d'un C-H dans le noyau aromatique (Unité G)	8 9 12
840 cm^{-1}	Déformation d'un C-H dans le noyau aromatique (Unité G)	8 12

(1) Auxenfans *et al.*, 2017 ; (2) Hermosilla *et al.*, 2017 ; (3) Pereira *et al.*, 2017 ; (4) Bekiaris *et al.*, 2015 ; (5) Domínguez-Robles *et al.*, 2017 ; (6) Adapa *et al.*, 2011 ; (7) Cui *et al.*, 2012 ; (8) Abdelaziz and Hulteberg, 2017 ; (9) Kumar *et al.*, 2015 ; (10) Liu *et al.*, 2014 ; (11) Chai *et al.*, 2014 ; (12) El Mansouri *et al.*, 2011.

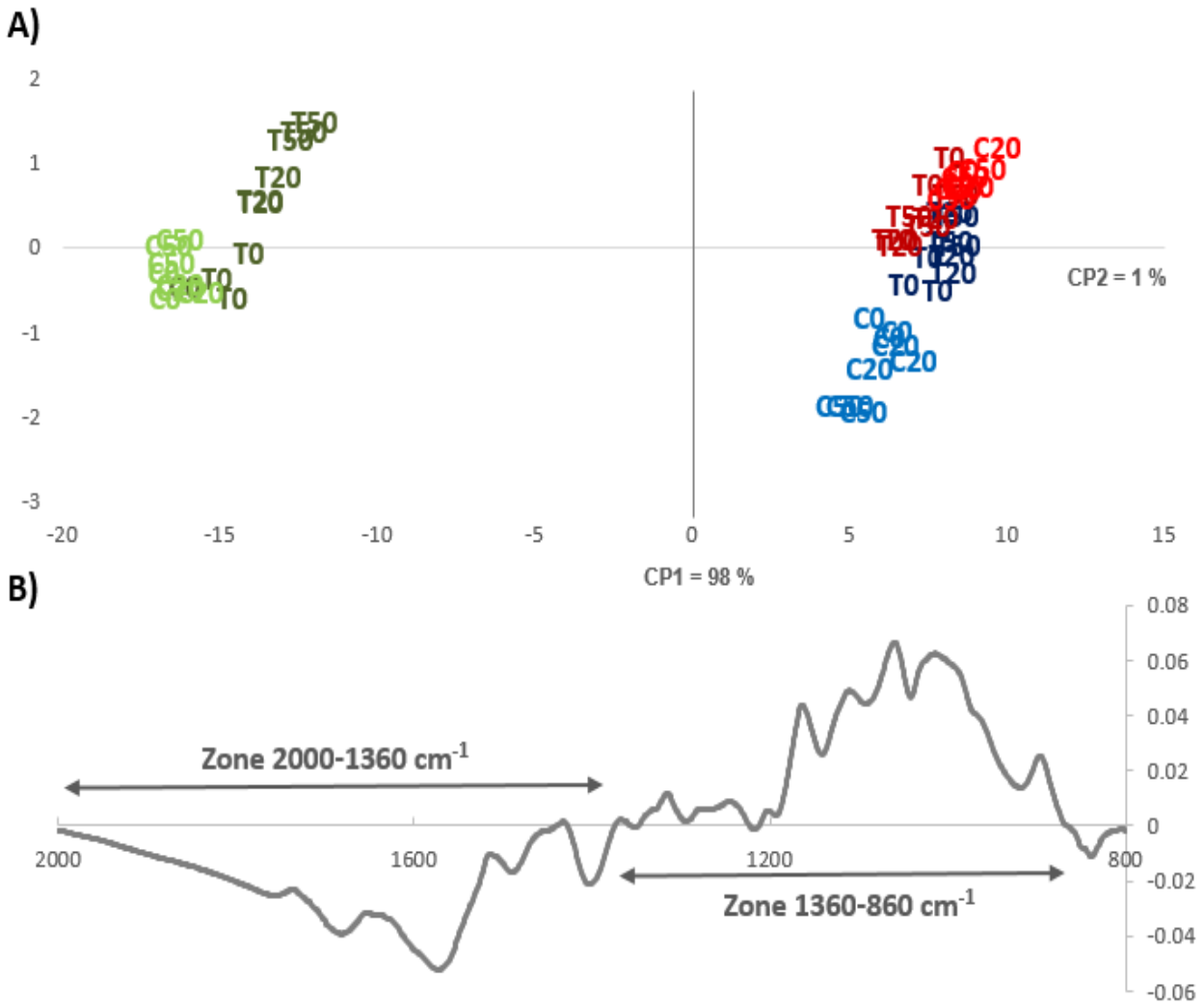


Figure 37 : Analyse en composantes principales de l'ensemble des spectres. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne. Les spectres bleus, rouges et verts correspondent respectivement aux résidus PB, PBEV et LK.

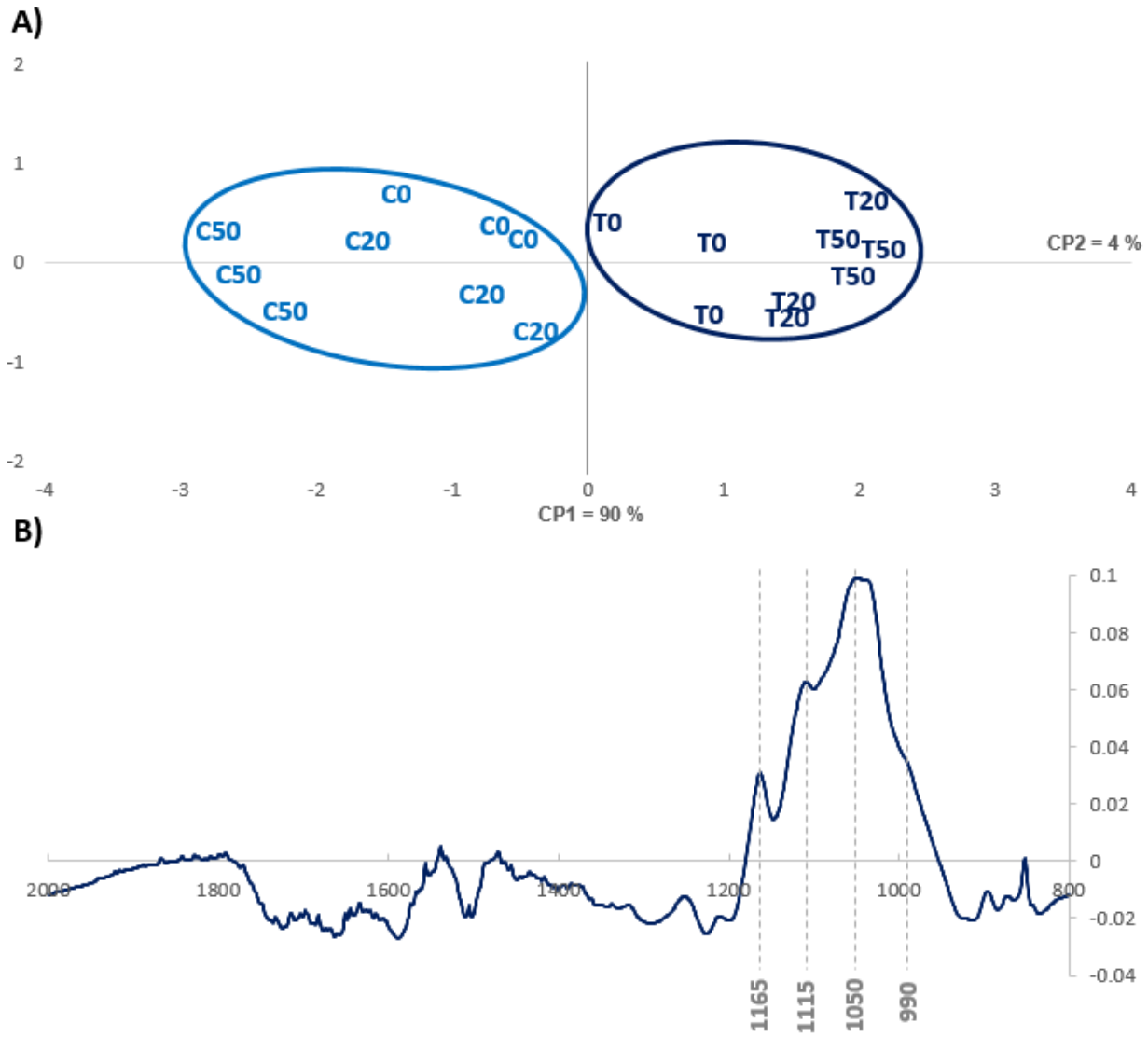


Figure 38 : Analyse en composantes principales des spectres de la PB. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne.

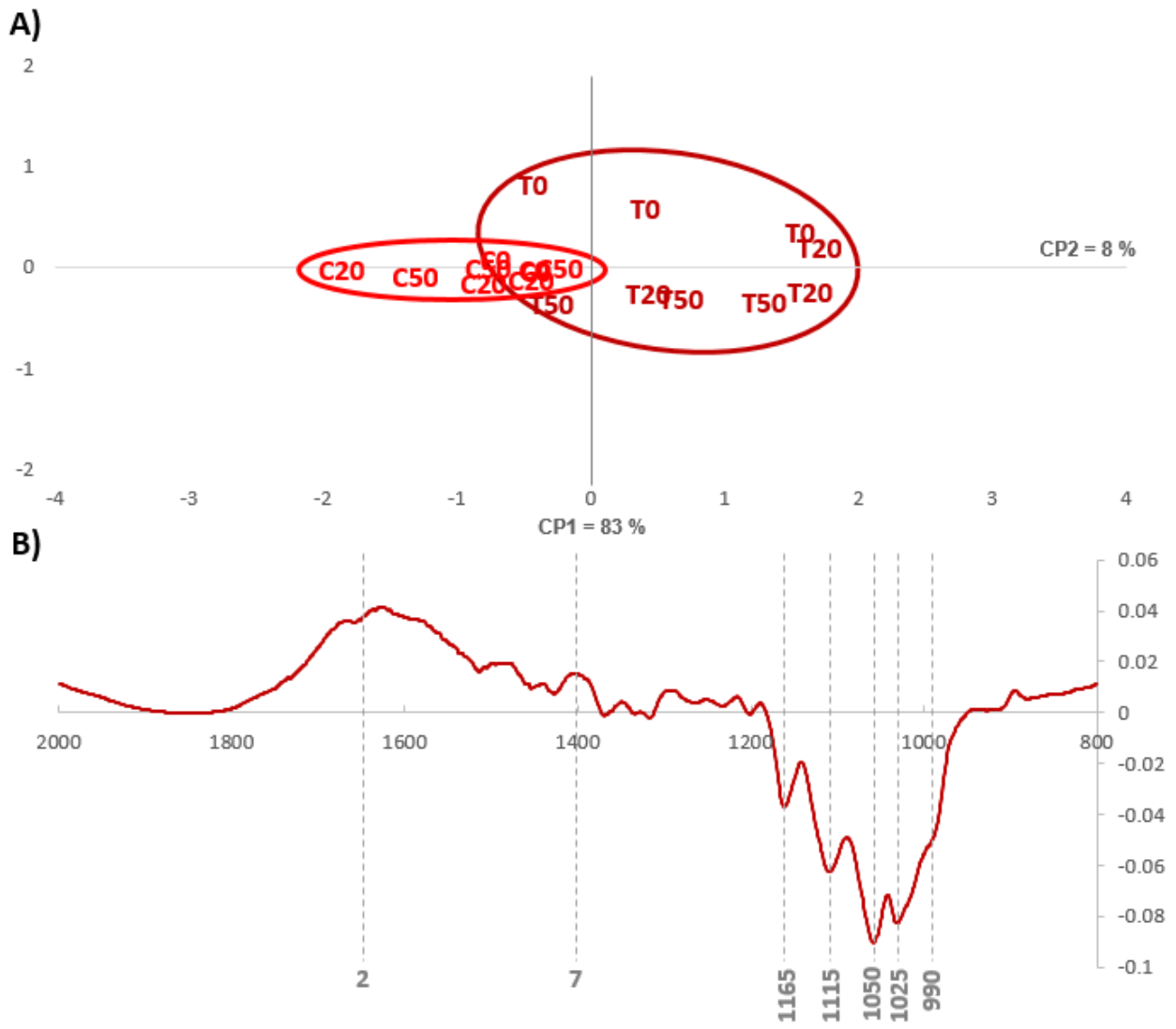


Figure 39 : Analyse en composantes principales des spectres de la PBEV. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne.

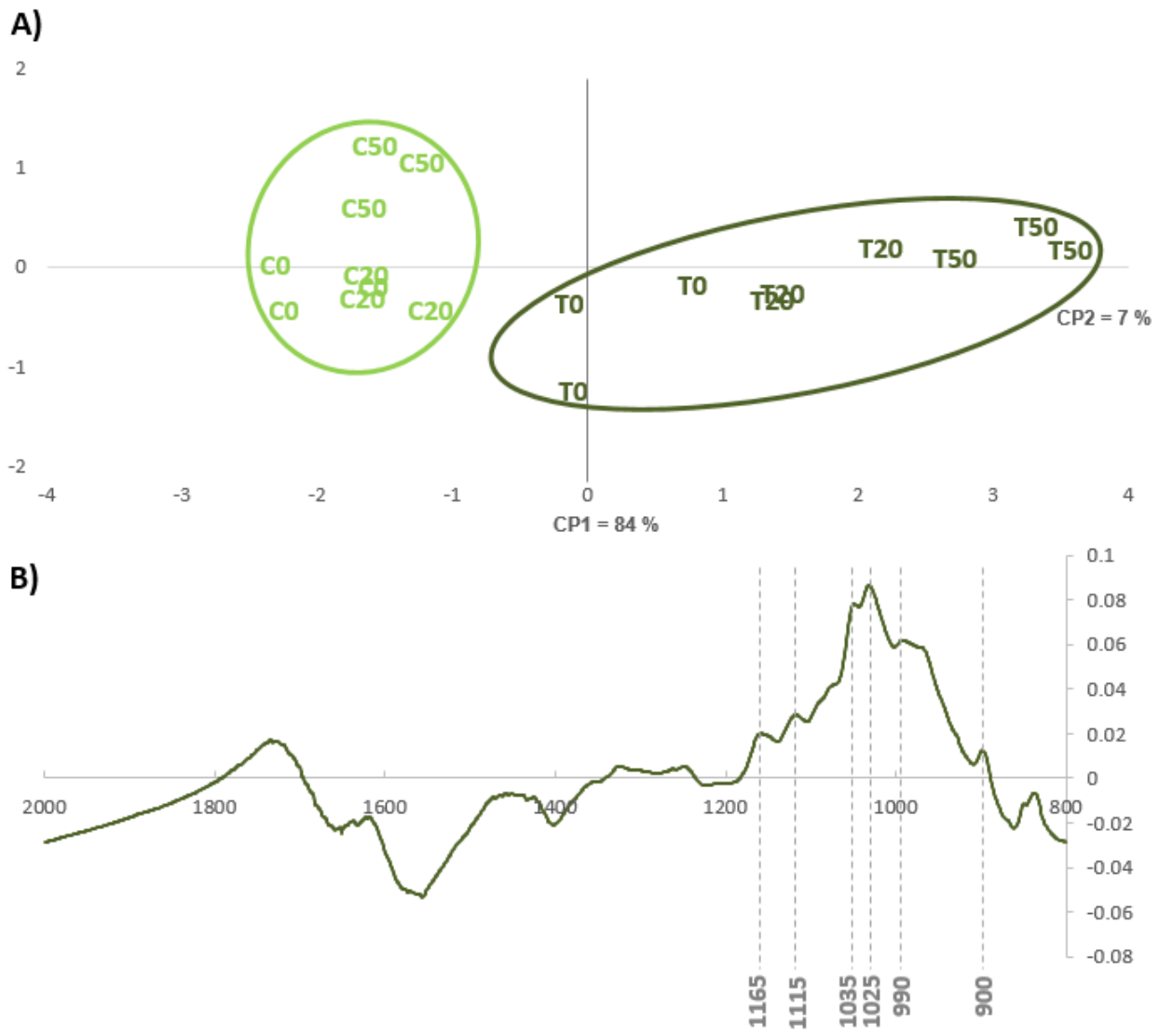


Figure 40 : Analyse en composantes principales sur la LK. A) Score plot, B) Loading CP1. Les échantillons notés T (T0, T20 et T50) correspondent aux résidus témoins sans croissance, tandis que les échantillons notés C (C0, C20 et C50), correspondent aux résidus avec croissance bactérienne.

III.1.2. Analyse RMN

Structure des résidus par RMN-2D

Afin de préciser de possibles modifications de la lignine sur les résidus après croissance bactérienne, une analyse par résonance magnétique nucléaire RMN-2D a été réalisée sur les résidus avec et sans croissance bactérienne sur les substrats complémentés avec 50 % de xylane. Le choix de ces résidus complémentés découle de l'analyse IRTF montrant que les modifications des résidus avec croissance bactérienne sont les plus importantes. La RMN-2D en phase liquide permet une analyse qualitative et semi-quantitative des groupements constitutifs des résidus lignifiés, en particulier les unités phénoliques de la lignine et les principales liaisons inter-unités notamment les liaisons β-O-4 (A), les liaisons β-5 (B) et les liaisons β-β (C).

Les analyses RMN-2D ont été réalisées après ultra-broyage et acétylation des résidus de la PB et de la PBEV avec et sans croissance bactérienne (**Figure 41** et **Figure 42**). L'analyse des spectres permet de quantifier les proportions relatives en syringyle et guaiacyle (ratio S/G), ainsi que les proportions de liaisons inter-unités de la lignine (en pourcentage du total des liaisons analysées) (**Tableau 22**). Les liaisons présentes sont majoritairement des liaisons β-O-4, avec de faibles proportions en liaisons β-5 et β-β. Les résidus PBEV renferment une moindre proportion de liaisons β-O-4, par rapport à la PB et une légère diminution du ratio S/G. En revanche, ce ratio n'évolue pas après croissance bactérienne et la proportion de ces liaisons varie peu avec et sans croissance. En effet, les liaisons β-O-4 représentent **95,0** ± 0,6 et **86,2** ± 0,8 % des liaisons analysées dans les résidus PB et PBEV sans croissance et **91,6** ± 1,6 et **83,8** ± 1,9 % sur ces résidus PB et PBEV avec croissance. Le même résultat est observé au niveau des liaisons phénylcoumarane et résinol. Ces résultats indiquent de faibles changements de proportions de liaisons dans les résidus, après croissance bactérienne. (**Figure 41** et **Figure 42**).

Tableau 22 : Analyse RMN-2D des résidus de la PB et de la PBEV

Groupement chimique	PB 50 % Témoin	PB 50 % Croissance	PBEV 50 % Témoin	PBEV 50 % Croissance
Syringyle/Gaiacyle (S/G)	**0,7** ± 0,0	**0,7** ± 0,0	**0,6** ± 0,0	**0,6** ± 0,01
% Aryle-Ether (β-O-4)	**95,0** ± 0,6	**91,6** ± 1,6	**86,2** ± 0,8	**83,8** ± 1,9
% Phénylcoumarane (β-5)	**2,0** ± 0,8	**4,9** ± 1,2	**7,4** ± 0,1	**9,4** ± 1,3
% Résinol (β-β)	**3,0** ± 0,6	**3,5** ± 0,4	**6,4** ± 0,6	**6,8** ± 0,6

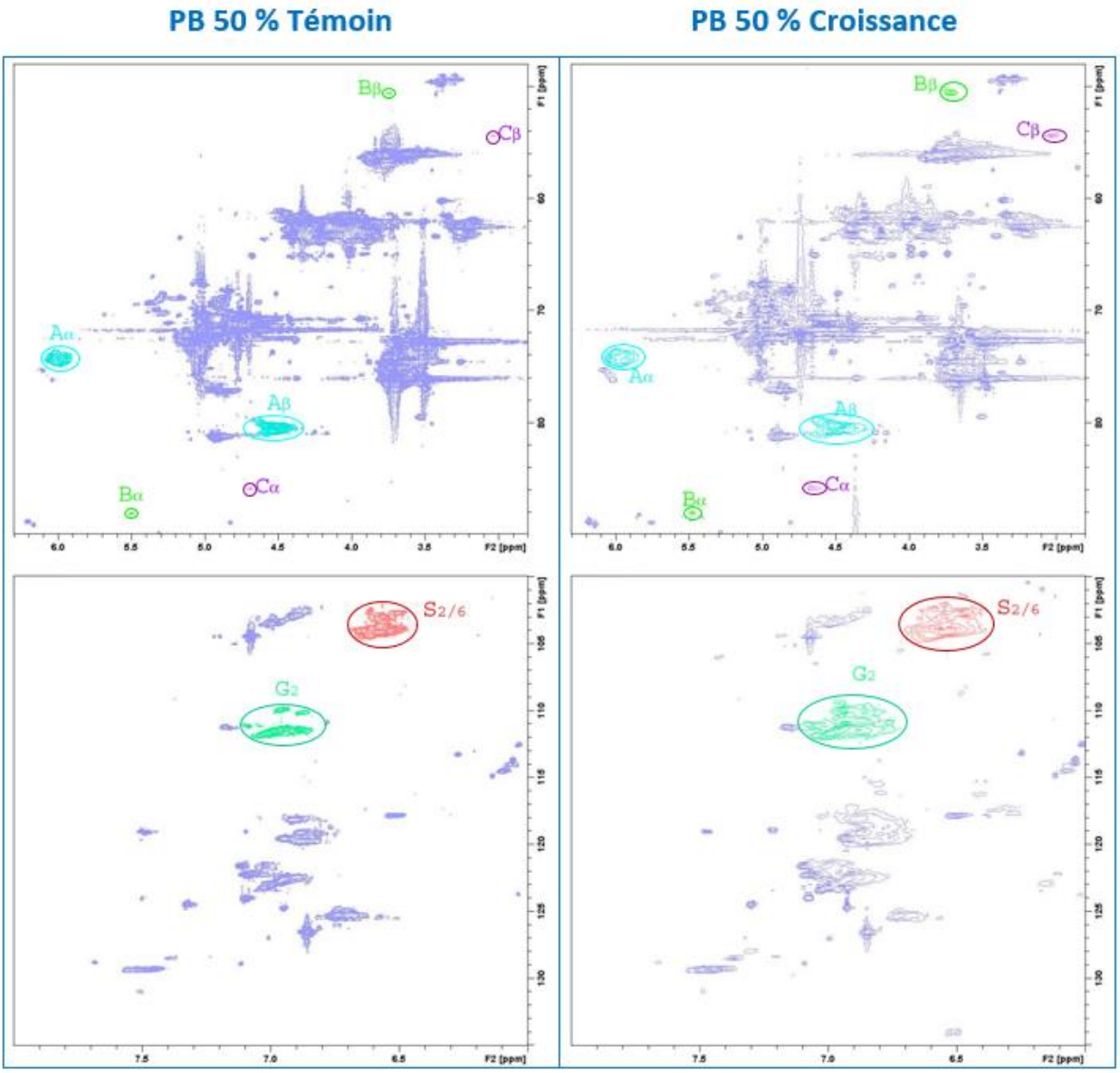


Figure 41 : Analyse RMN-2D des résidus de la PB avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. En bleu clair, les liaisons aryle-éther (β-O-4), en vert les liaisons phenylcoumarane (β-5), en violet les liaisons résinol (β-β), en vert pale les unités G et en rouge les unités S.

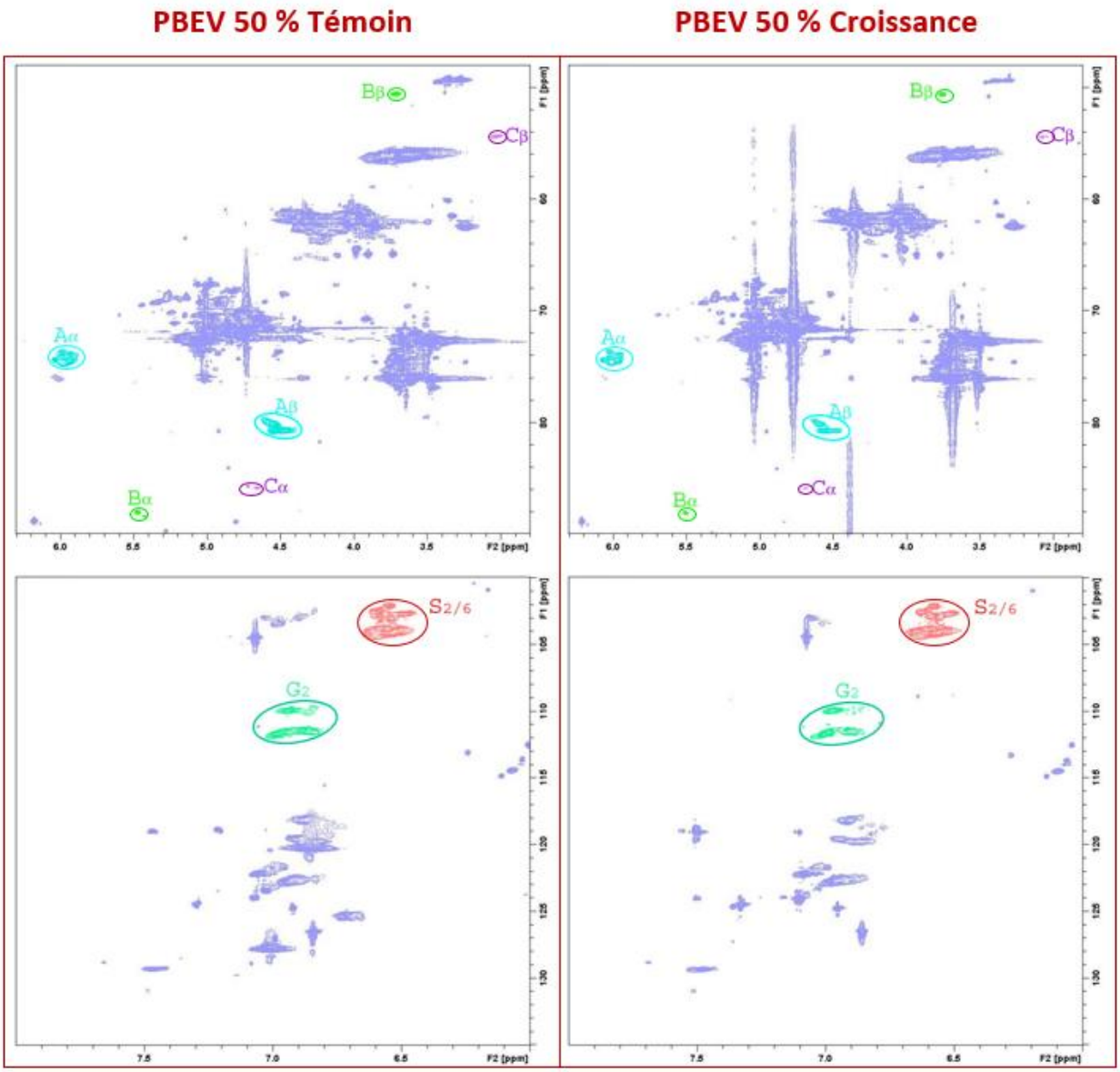


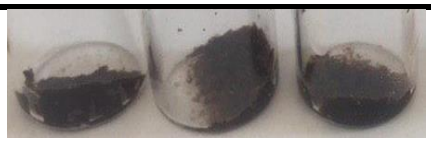
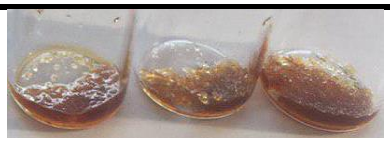
Figure 42 : Analyse RMN-2D des résidus de la PBEV avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. En bleu clair, les liaisons aryle-éther (β-O-4), en vert les liaisons phenylcoumarane (β-5), en violet les liaisons résinol (β-β), en vert pale les unités G et en rouge les unités S.

Structure des résidus par RMN du phosphore

Différentes méthodologies ont été mises en œuvre pour tenter de solubiliser les résidus. Néanmoins, ces méthodes, dont l'acétylation, se sont révélées infructueuses dans le cas des résidus LK (lyophilisat des milieux de cultures avec LK), avec ou sans croissance bactérienne. C'est pourquoi, les résidus de LK, ont été analysés en RMN du phosphore après dérivation de la lignine par phosphitylation et solubilisation dans le solvant pyridine/$CDCL_3$. Ces analyses, réalisées elles aussi sur les résidus complémentés avec 50 % de xylane, permettent la quantification des différents groupes hydroxyles présents dans la lignine avec notamment les OH aliphatiques, les OH des noyaux syringyle, guaiacyle, *p*-hydroxyphényle et les OH des acides carboxyliques (**Figure 43**).

Les analyses en RMN du phosphore de la LK avec et sans croissance bactérienne sont présentées dans la **Figure 43**. Sur l'ensemble des groupements hydroxyles des modifications significatives sont observées après croissance bactérienne. En particulier, les hydroxyles des acides carboxyliques varient de **0,2** ± 0,0 à **1,6** ± 0,1 µmol.mg^{-1}, les hydroxyles aliphatiques varient de **0,4** ± 0,0 à **1,0** ± 0,1 µmol.mg^{-1} et enfin les hydroxyles aromatiques passent de **0,2** ± 0,0 à **0,7** ± 0,1 µmol.mg^{-1} de résidus (**Tableau 23**). Ces résultats mettent en évidence une plus grande disponibilité des groupements hydroxyles dans les résidus après une croissance bactérienne. Néanmoins, ces résultats sont à considérer avec précaution, car les résidus n'ont pas complètement été solubilisés après dérivation (**Tableau 23**).

Tableau 23 : RMN du phosphore des résidus de LK avec et sans croissance (µmol.mg^{-1}).

Echantillon	LK 50 %Témoin	LK 50 % Croissance
OH Aliphatique	**0,4** ± 0,0	**1,0** ± 0,1
OH Syringyle	**0,1** ± 0,0	**0,3** ± 0,0
OH Guaiacyle	**0,1** ± 0,0	**0,3** ± 0,0
OH *p*-Hydroxyphényle	**0,02** ± 0,0	**0,1** ± 0,0
Totaux OH aromatique	**0,2** ± 0,0	**0,7** ± 0,1
OH acides carboxylique	**0,2** ± 0,01	**1,6** ± 0,1
S/G ^{31}P	**1,0** ± 0,0	**1,1** ± 0,0
Résidus après dérivation, partiellement solubilisés		

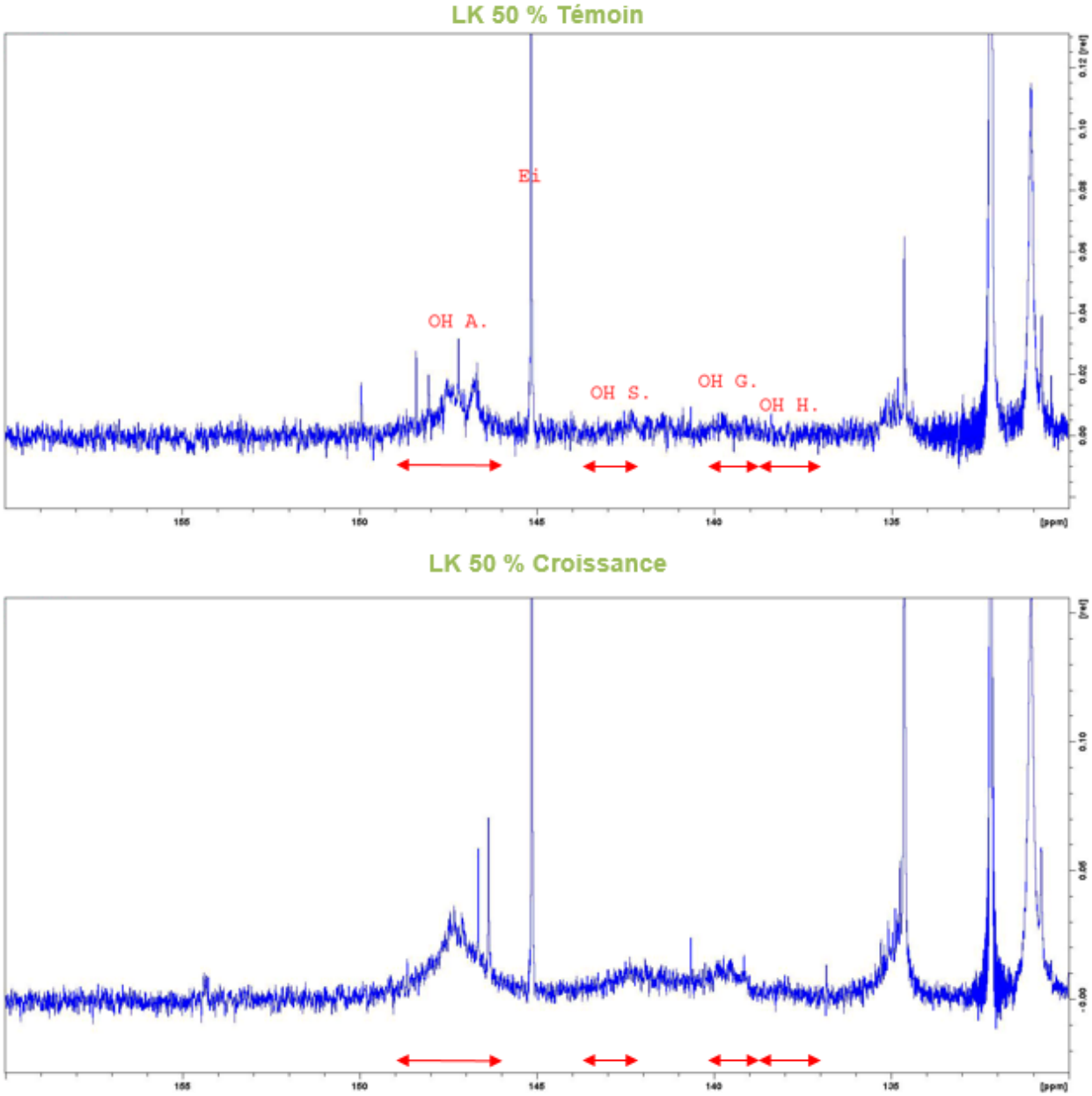


Figure 43 : Analyse RMN du phosphore des résidus de LK avec et sans croissance complémenté avec 50 % de xylane. OH A = Aliphatique ; Ei = Etalon interne ; OH S = Syringyle ; OH G = Guaiacyle ; OH H = *p*-Hyroxyphényle.

III.2. Composition des milieux de culture au cours de la croissance

L'analyse des sucres et des molécules phénoliques dans les milieux de culture a été effectuée dans la condition de complémentation en xylane 50 %. Cette condition permet d'obtenir les taux de croissance bactérienne les plus élevés, de plus l'analyse infrarouge montre que les modifications des résidus avec croissance bactérienne sont les plus importantes.

III.2.1. Composition en sucres

L'analyse des sucres présents dans la culture avec complémentation 50 % avec et sans croissance a été effectuée après hydrolyse acide du milieu de culture et quantification par CLHP. Les principaux sucres monomères sont le xylose, le glucose et l'arabinose dont les proportions représentent entre 84 et 90 % des sucres quantifiés. En absence de croissance, le xylose est majoritaire, et correspond à la complémentation en xylane. La présence de glucose pourrait être liée au relargage d'oligomères à partir des résidus dans les milieux de culture. La différence entre les teneurs en sucre des milieux avec et sans croissance représente environ 90 % des xyloses quantifiés dans les témoins pour les cultures avec PB et LK, et 80 % des xyloses pour la culture avec PBEV. La perte en xylose est légèrement plus faible pour la culture avec PBEV. La perte en glucose montre une tendance similaire alors que l'arabinose diminue dans les mêmes proportions pour les trois substrats (**Tableau 24**).

Tableau 24 : Sucres présents dans les milieux de culture avec et sans croissance.

	PB 50 %		PBEV 50 %		LK 50 %	
	Témoin	Croissance	Témoin	Croissance	Témoin	Croissance
Ara/Glc/Xyl	**5/22/73**	**24/30/46**	**2/10/88**	**6/21/73**	**3/14/83**	**14/12/74**
Perte en sucres (%)						
Arabinose	**34,4** ± 4,2		**35,9** ± 0,2		**35,1** ± 6,1	
Glucose	**82,7** ± 0,8		**68,9** ± 0,7		**89,1** ± 1,1	
Xylose	**91,7** ± 1,0		**79,7** ± 2,3		**87,2** ± 4,2	

III.2.2. Composition en molécules phénoliques

Les molécules phénoliques présentes dans les milieux de culture avec et sans croissance bactérienne ont été déterminées par CLHP. Les composés détectables, sont principalement constitués par des acides phénoliques en C6-C3 (*p*-coumarique, férulique et di-férulique) et en C6-C1 (acide *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, syringique), ainsi que des aldéhydes en C6-C1 (*p*-hydroxybenzaldéhyde, vanilline, syringladéhyde). Les molécules phénoliques présentes dans les milieux de culture avec et sans croissance bactérienne sont présentées dans la **Figure 44**.

Composition en phénols totaux sans croissance

Les milieux de culture après autoclavage (Témoin 0 h) et les milieux de culture sans croissance (Témoin 30 h), ont des teneurs similaires sur l'ensemble des composés identifiés (données non présentées), à l'exception de l'acide férulique pour lequel des différences importantes sont observées. En effet, dans le cas des milieux de culture avec PB, **2,8** ± 0,0 et **0,9** ± 0,2 µg.50 mg^{-1} d'acide férulique sont quantifiés dans les Témoins 0 h et les Témoins 30 h respectivement. On peut faire le même constat pour les milieux avec PBEV, **1,6** ± 0,3 et **0,1** ± 0,0 µg.50 mg^{-1} d'acide férulique sont quantifiés dans les milieux de culture après autoclavage et sans croissance respectivement.

Les composés phénoliques totaux détectés dans les Témoins 30 h sont similaires et représentent **58,7** ± 3,9 ; **55,6** ± 9,7 et **56,3** ± 2,3 µg.50 mg^{-1} pour les cultures avec PB, la PBEV et la LK respectivement. Sur la LK, l'acide vanillique représente la principale molécule phénolique (63,7 % des composés phénoliques totaux), contrairement aux Témoins 30 h PB où les acides *p*-coumarique, vanillique et férulique sont majoritaires (avec 41,1 ; 17,7 et 15,9 % des composés phénoliques totaux respectivement). Dans le cas des Témoins 30 h PBEV, ce sont l'acide *p*-coumarique et la vanilline qui sont principalement présents (avec 37,4 et 23,0 % des composés phénoliques totaux respectivement).

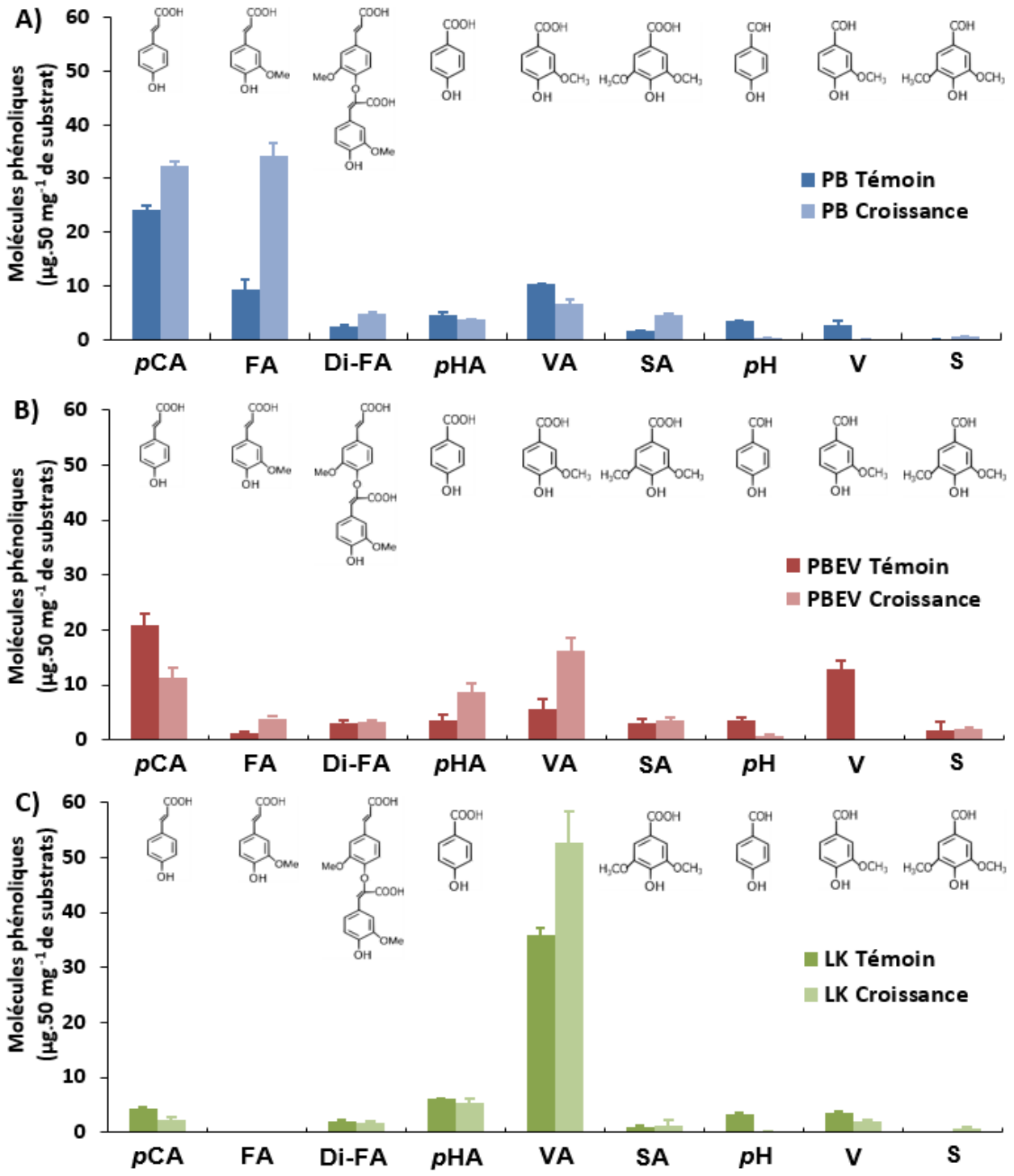


Figure 44 : Molécules phénoliques présentes dans les milieux de culture sans (Témoin 30 h) et avec croissance (Croissance 30 h) en présence de PB (A), PBEV (B) et LK (C) complémentée par le xylane 50 %. Acide *p*-Coumarique (*p*CA) ; Acide Férulique (FA) ; Acide Di-Férulique (Di-FA) ; Acide *p*-Hydroxybenzoïque (*p*HA) ; Acide Vanillique (VA) ; Acide Syringique (SA) ; *p*-Hydroxybenzaldhéyde (*p*H) ; Vanilline (V) et Syringaldéhyde (S).

Composition en phénols totaux après croissance bactérienne

La quantité totale de composés phénoliques détectés dans les milieux de culture après croissance sont différents des teneurs sans croissance et représentent **87,3** ± 4,7 ; **50,2** ± 6,7 et **66,0** ± 9,0 µg.50 mg^{-1} pour la PB, la PBEV et la LK respectivement. Sur la LK, l'acide vanillique représente toujours la principale molécule phénolique (79,9 % des composés phénoliques totaux), contrairement aux cultures avec PB où les acides férulique et *p*-coumarique sont majoritaires dans les milieux (39,3 et 37,2 % des composés phénoliques totaux respectivement). Dans le cas des cultures avec PBEV, ce sont les acides vanillique et *p*-coumarique qui sont principalement présents (32,5 et 22,7 % des composés phénoliques totaux respectivement).

Des variations significatives des quantités de composés phénoliques sont donc observées dans les milieux de culture après croissance (**Figure 44**). Ces variations dépendent des substrats. Une augmentation des quantités d'acides férulique, *p*-coumarique, syringique et di-férulique avec respectivement **24,9** ± 0,7 ; **8,3** ± 0,1 ; **2,9** ± 0,3 et **2,5** ± 0,0 µg.50 mg^{-1} sont observés après croissance bactérienne sur la PB. De même sur la PBEV, les acides vanillique, *p*-hydroxybenzoïque et férulique représentent respectivement **10,7** ± 0,6 ; **5,2** ± 0,5 et **2,8** ± 0,1 µg.50 mg^{-1} après croissance. Enfin, sur la LK, la concentration en acide vanillique augmente à **16,9** ± 4,3 µg.50 mg^{-1} après croissance bactérienne.

De nombreux composés phénoliques subissent une diminution de concentration après la croissance bactérienne. En effet, dans les cultures avec PB, les concentrations en acide vanillique, *en p*-hydroxybenzaldéhyde et en vanilline diminuent et représentent **3,6** ± 0,7 ; **3,2** ± 0,1 et **2,8** ± 0,7 µg.50 mg^{-1} respectivement. Des variations de concentrations encore plus fortes sont observées après croissance sur PBEV où les teneurs en vanilline, acide *p*-coumarique et p-hydroxybenzaldhéyde sont respectivement de **12,8** ± 1,6 ; **9,4** ± 0,5 et **2,8** ± 0,4 µg.50 mg^{-1}. Sur la LK, les concentrations en *p*-hydroxybenzaldhéyde, en acide *p*-coumarique et en vanilline diminuent et atteignent respectivement **3,1** ± 0,0 ; **2,2** ± 0,4 et **1,5** ± 0,1 µg.50 mg^{-1}.

Globalement, l'acide férulique augmente dans les milieux de culture avec la croissance bactérienne, alors que l'acide *p*-coumarique et les aldéhydes comme la vanilline et le *p*-hydroxybenzaldhéyde diminuent après la croissance bactérienne dans les milieux de culture.

Potentiel en phénols totaux et en acides phénoliques

L'ensemble des phénols totaux analysés dans les milieux de culture avec et sans croissance sont présentés dans le **Tableau 25**. Sans croissance, ces phénols totaux représentent respectivement **0,5** ± 0,0; **0,4** ± 0,1 et **0,1** ± 0,0 % du potentiel en lignine apporté par les substrats PB, PBEV et LK. Ces phénols totaux sont détectés dans les milieux de culture après croissance représentent respectivement **0,7** ± 0,0; **0,3** ± 0,0 et **0,1** ± 0,0 % du potentiel en lignine apporté par les substrats PB, PBEV et LK.

Tableau 25 : Phénols totaux présents dans les milieux de cultures avec et sans croissance.

	PB 50 %		PBEV 50 %		LK 50 %	
	Témoin	Croissance	Témoin	Croissance	Témoin	Croissance
Potentiel en Lignine (µg/50 mg substrat)	**11850,0** ± 1000,0		**15150,0** ± 136,4		**42650,0** ± 50,0	
Phénols Totaux (µg/50 mg résidus)	**58,7** ± 3,9	**87,3** ± 4,7	**55,6** ± 9,7	**50,2** ± 6,7	**56,3** ± 2,3	**66,0** ± 9,00
Potentiel en composés phénoliques (%)*	**0,5** ± 0,0	**0,7** ± 0,0	**0,4** ± 0,1	**0,3** ± 0,0	**0,1** ± 0,0	**0,1** ± 0,0

*Potentiel en composés phénoliques = Phénols totaux / Potentiel en lignine

Les concentrations en acide *p*-coumarique, férulique et di-férulique quantifiées dans les milieux de culture témoins représentent **6,3** ± 0,5 et **5,6** ± 0,6 % du potentiel apporté par les substrats PB et la PBEV (**Tableau 26**). Après croissance, les concentrations en acides phénoliques détectés représentent **12,7** ± 0,6 et **4,2** ± 0,5 % du potentiel apporté par la PB et la PBEV.

Tableau 26 : Acides phénoliques présents dans les milieux de culture avec et sans croissance.

	PB 50 %		PBEV 50 %	
	Témoin	Croissance	Témoin	Croissance
Potentiel en acide phénolique (µg/50 mg substrat)	**564,6** ± 10,2		**449,6** ± 18,8	
Acides phénoliques totaux (µg/50 mg résidus)	**35,9** ± 2,7	**71,5** ± 3,3	**25,1** ± 2,9	**18,7** ± 2,2
Potentiel en acides phénoliques (%)	**6,6** ± 0,5	**12,7** ± 0,6	**5,6** ± 0,6	**4,2** ± 0,5

IV : Analyse protéomique

IV.1. Analyse globale

L'analyse globale permet d'identifier et de quantifier les protéines produites dans l'ensemble des conditions de cultures et sur les différents substrats après 30 h de culture au niveau intracellulaire (IC) et extracellulaire (EC). Le nombre de protéines différentes et de protéines totales peut être déterminé dans chacune des conditions, ce qui permet d'obtenir l'abondance des protéines en fonction des protéines totales (% d'abondance). Il est donc possible d'identifier la stratégie spécifique de production protéique mise en œuvre par la bactérie en présence des différents substrats. Il est aussi possible de comparer les profils de protéines exprimées uniquement sur un ou plusieurs substrats riches en lignine, en comparaison avec le substrat témoin (Xylane), ce qui permet d'identifier une partie des protéines clés dans la transformation bactérienne des substrats lignifiés.

IV.1.1. Stratégie de production protéique

Le nombre total de protéines est similaire sur PB, PBEV et Xylane et représente ~400 protéines différentes. Ce nombre est légèrement plus faible sur LK (~375 protéines différentes) (**Tableau 27**). Les protéines IC sont majoritaires pour l'ensemble des substrats et représentent entre 83 et 89 % des protéines détectées. Globalement le nombre total de protéines produites au niveau IC est compris entre 316 et 358, avec un nombre de protéines IC légèrement supérieur sur la PB et la PBEV comparativement au xylane et LK. Dans les milieux de culture, entre 144 et 263 protéines différentes sont détectées. Cependant, parmi ces protéines, les protéines EC ne représentent que 25 à 30 % de toutes les protéines détectées dans les milieux de culture. Les autres protéines sont probablement issues de lyse cellulaire après la croissance ou pendant la préparation des échantillons. Le nombre de protéines EC identifiées varie de 47 à 69 protéines selon les substrats (entre 11 et 17 % des protéines totales), ce nombre étant le plus important dans les cultures avec xylane seul (**Figure 45**).

Tableau 27 : Analyse globale des protéines exprimées en fonction des substrats : nombre de protéines exprimées (Nb) et pourcentage (%) de protéines intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC).

	PB 50 %		PBEV 50 %		LK 50 %		Xylane 50 %	
	Nb	**%**	**Nb**	**%**	**Nb**	**%**	**Nb**	**%**
IC	358	89	350	87	316	84	338	83
EC	47	11	53	13	58	16	69	17
Total	405		403		374		407	

L'annotation fonctionnelle des protéines identifiées est représentée sur la **Figure 45**. Les différentes fonctions des protéines IC sont globalement similaires sur l'ensemble des substrats (**Figure 45A**). La répartition de ces fonctions (% d'abondance) au niveau des différents substrats est également similaire. La plupart des protéines sont impliquées dans différentes voies métaboliques intracellulaires comme les métabolismes des acides aminés (~15 %) ou des sucres (~21 %), ou de la synthèse des protéines (entre 9 et 16 %). On retrouve également entre 4 et 7 % de protéines de transport et seulement 3 % d' hémicellulases. Par contre ces protéines de transport et ces hémicellulases sont très diverses. Dans le compartiment IC, le nombre de transporteurs varie de 18 à 24 en fonction des substrats et on retrouve entre 14 et 19 hémicellulases différentes. Les oxydoréductases potentielles ont également été détectées et représentent entre 32 et 36% des protéines IC exprimées en présence des différents substrats. Entre 68 et 80 protéines différentes sont identifiées.

Les profils des fonctions des protéines EC sont très différents des protéines IC. Les protéines de fonction inconnue, les protéines de transport et les hémicellulases sont les plus abondantes et représentent respectivement entre 18 et 26 %, entre 10 et 20 %, et entre 25 et 35 % de toutes les protéines présentes pour l'ensemble des substrats (**Figure 45B**). Contrairement aux hémicellulases IC qui sont très diverses, le nombre d'hémicellulases secrétées est faible (4 à 5 enzymes uniquement selon le substrat). Le nombre de transporteurs différents détectés dans le milieu EC est également plus faible que dans milieu IC. On retrouve entre 9 et 16 transporteurs différents sur l'ensemble des substrats. L'abondance des oxydoréductases dans les protéines EC est significativement plus faible par rapport au milieu IC. En effet, elles représentent 18 %, 13 %, 16 % des protéines EC dans le cas des substrats xylane, la PB et la PBEV respectivement. Sur LK leur abondance est de seulement 7 %. Par ailleurs le nombre d'oxydoréductases identifiées est aussi plus faible avec entre 3 et 5 protéines seulement.

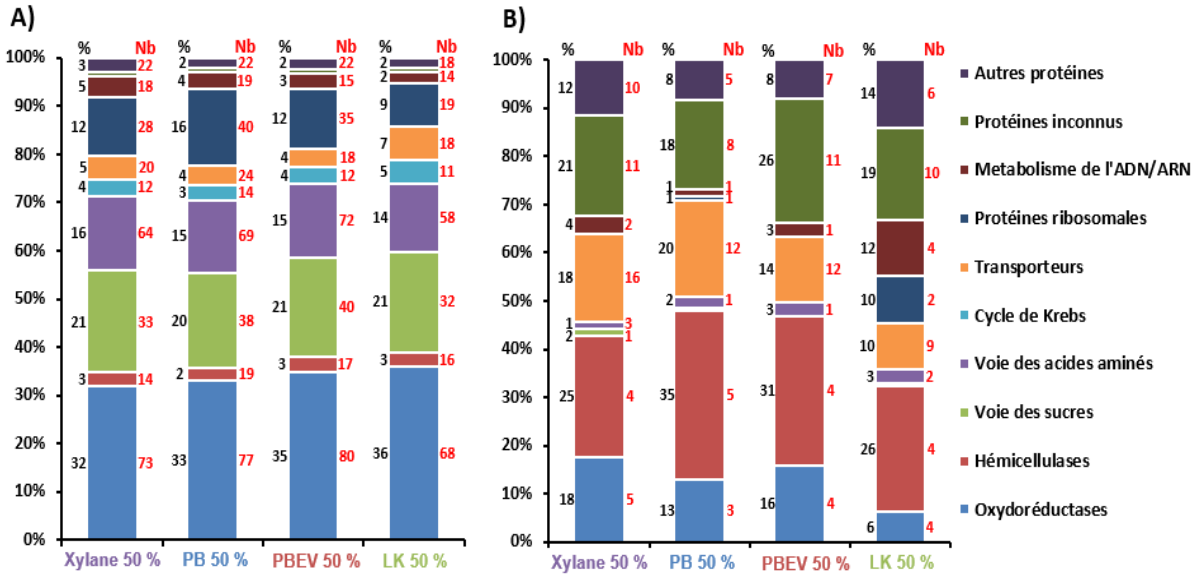


Figure 45 : Fonctions des différentes protéines intracellulaires IC (A) et extracellulaires EC (B) identifiées sur les différents substrats ainsi que leur abondance en pourcentage (%) et le nombre de protéines exprimées (Nb).

IV.1.2. Identification des protéines produites uniquement sur les substrats riches en lignine

Cette première analyse a également permis d'identifier les protéines produites uniquement en présence des substrats lignifiés ou les protéines communes (**Figure 46**). Au niveau IC, 256 protéines sont communes aux 4 substrats (72 à 81 % des protéines totales selon les substrats), alors qu'au niveau EC, seules 22 protéines (32 à 47 % des protéines totales selon les substrats) sont communes. Parmi ces protéines communes, on trouve 75 et 5 oxydoréductases IC et EC respectivement dont plusieurs peroxydases, déshydrogénases et oxydases. 18 et 5 hémicellulases IC et EC respectivement sont également identifiées (**Tableau 28**). Dans le milieu IC on note la présence essentiellement d'exoenzymes comme des xylosidases, arabinosidases, estérases et glucosidases. Dans le milieu EC, les seules xylanases identifiées sont deux xylanases de la famille des GH11.

Tableau 28 : Identification des oxydoréductases et hémicellulases intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC) communes à l'ensemble des substrats.

Gene ID	Oxydoréductases IC
TXYL_00125	Aldo/keto reductase, Aryl-alcohol dehydrogese
TXYL_00155	3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase, fabG
TXYL_00455	Aspartate-semialdehyde dehydrogese
TXYL_00570	Oxidoreductase domain-containing protein
TXYL_00580	Oxidoreductase, D-binding domain protein

TXYL_02400	Acyl-CoA dehydrogese YdbM
TXYL_02885	Acireductone dioxygese mtnD
TXYL_03010	Pyruvate dehydrogese E1 component, alpha subunit
TXYL_03015	2-oxoisovalerate dehydrogese subunit beta bkdA
TXYL_03025	Dihydrolipoyl dehydrogese
TXYL_03085	Short chain alcohol dehydrogese
TXYL_03090	Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase domain protein
TXYL_03095	Pyruvate synthase PorA, Pyruvate flavodoxin/ferrédoxine oxydoréductase
TXYL_03130	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family
TXYL_03135	Oxidoreductase related to aryl-alcohol dehydrogeses
TXYL_03165	Aldo/keto reductase YrpG, oxidoreductase
TXYL_03190	Oxidoreductase domain protein
TXYL_03220	Manganese catalase
TXYL_03475	Glyoxal reductase,related to aryl-alcohol dehydrogeses
TXYL_03795	Aldehyde dehydrogese, thermostable, AldHT
TXYL_04250	Aldo/keto reductase, Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein
TXYL_04605	Copper amine oxidase domain protein
TXYL_05420	Enolase 2-phosphoglycerate dehydratase
TXYL_05660	Putative oxidoreductase
TXYL_05670	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogese
TXYL_05700	Superoxide dismutase, iron/manganese superoxide dismutase family, manganese oxidoreductase
TXYL_07335	DPH dehydrogese
TXYL_07940	Rhamnulose-1-phosphate aldolase/alcohol dehydrogese
TXYL_08345	Oxidoreductase Yc=vaA
TXYL_08355	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogese, Dimeric dihydrodiol dehydrogese
TXYL_08835	6-phosphoglucote dehydrogese, DP(+)-dependent, decarboxylating GndA
TXYL_09330	Peroxiredoxin hydroperoxide oxidoreductase, trxA,
TXYL_09340	Glutathione peroxidase
TXYL_09800	Aldo/keto reductase
TXYL_10010	6-phosphoglucote dehydrogese D-binding
TXYL_10210	Oxidoreductase domain-containing protein
TXYL_10495	Mequinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit
TXYL_10535	Dihydrodipicolite reductase
TXYL_10620	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogese
TXYL_10690	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
TXYL_10695	3-isopropylmalate dehydratase small subunit
TXYL_11265	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
TXYL_11820	Thiol peroxidase
TXYL_12560	Inosine-5 -monophosphate dehydrogese
TXYL_12645	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogese, type I
TXYL_12685	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha subunit
TXYL_12690	Pyruvate ferredoxin oxidoreductase, beta subunit
TXYL_13155	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
TXYL_13395	Histidinol dehydrogese
TXYL_13440	Thioredoxin reductase
TXYL_13610	Bifunctiol protein FolD 2
TXYL_13685	2-oxoisovalerate dehydrogese beta subunit
TXYL_13935	D-3-phosphoglycerate dehydrogese
TXYL_14210	Oxidoreductase, short chain dehydrogese/reductase family protein, UxuB
TXYL_14250	Meso-diaminopimelate dehydrogese
TXYL_14255	DP-specific glutamate dehydrogese
TXYL_14695	Peroxiredoxin, Alkyl hydroperoxide reductase
TXYL_14705	DH-peroxiredoxin reductase
TXYL_14760	Predicted Cytochrome c oxidase subunit II
TXYL_14770	Cytochrome c oxidase subunit 2
TXYL_14775	Cytochrome c oxidase subunit 1
TXYL_16200	Oxidoreductase
TXYL_16280	GutB2, Alcohol dehydrogese zinc-binding domain protein
TXYL_16365	Ferredoxin DP reductase, Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase

TXYL_16370	DH dehydrogese-like protein YumB
TXYL_16380	Putative heme-dependent peroxidase GK3416
TXYL_16405	Oxidoreductase domain protein
TXYL_16575	Alcohol/aldehyde dehydrogese
TXYL_17155	Isocitrate dehydrogese [DP]
TXYL_17240	Oxidoreductase domain protein
TXYL_17380	2,5-didehydroglucote reductase
TXYL_17475	Catalase-peroxidase 2
TXYL_17780	Dihydroxy-acid dehydratase
TXYL_18625	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family
TXYL_19830	3-isopropylmalate dehydrogese
TXYL_19845	Ketol-acid reductoisomerase

Gene ID	Oxydoréductases EC
TXYL_00730	Cytochrome c oxidase subunit 2
TXYL_08660	Copper amine oxidase N-termil domain
TXYL_08800	Putative uncharacterized protein/Copper amine oxidase domain protein
TXYL_10110	Alanine dehydrogese
TXYL_13315	AsnO

Gene ID	Hémicellulases IC
TXYL_00055	Endo-1,4-beta-xylase A with CBM22 and CBM9 and SLH domain
TXYL_00800	Cephalosporin C deacetylase - acetyl-xylan esterase
TXYL_03720	XynB2, 1,4-beta-xylosidase GH43
TXYL_04380	Endo-1,4-beta-xylase
TXYL_07365	BglA
TXYL_09645	Uncharacterized -L-arabinofuranosidase protein araN
TXYL_10005	BglA
TXYL_10250	Acetyl xylan esterase
TXYL_10260	Alpha-galactosidase
TXYL_11180	1,4- beta xylosidase
TXYL_15335	Putative xylosidase
TXYL_16065	Glycoside hydrolase family 2 sugar binding protein
TXYL_16175	Reducing end xylose-releasing exo-oligoxylase Xyn8A
TXYL_16195	Alpha-glucuronidase GH67
TXYL_16210	Endo-1,4-beta-xylase Xyn10
TXYL_16220	Alpha-L-arabinofuranosidase
TXYL_19775	Glycoside hydrolase family 3 domain protein

Gene ID	Hémicellulases EC
TXYL_00785	Endoglucase D
TXYL_04380	Endo-1,4-beta-xylase GH11
TXYL_04370	Endo-1,4-beta-xylase
TXYL_15245	Putative Phospholipase/carboxylesterase family protein

L'analyse des données obtenues avec les substrats lignifiés montre que 10 protéines IC sont communes à PB, PBEV et LK dont 2 oxydoréductases (Txyl_03505 et Txyl_18830) et 1 carboxylestérase appartenant à la famille 10 des carbohydrate estérases (Txyl_16830) (**Tableau 29**). En revanche, seule 1 protéine (Txyl_15510) est retrouvée dans les milieux EC sur les 3 substrats lignifiés et celle-ci est inconnue. Pour la PB, 30 protéines IC et 11 protéines EC sont uniques. Sur la PBEV, 19 protéines IC et 5 protéines EC sont uniques. Enfin, sur la LK, 13 protéines IC et 19 protéines EC sont uniques. Dans tous les cas, le nombre d'oxydoréductases et d'hémicellulases uniques pour chacun des substrats est relativement faible (**Tableau 29**). Sur PB, seules 4 oxydoréductases et 2 arabinosidases/xylosidases GH43 sont detectées dans les protéines IC et dans le milieu EC. Sur PBEV, on retrouve deux galactosidases IC et 4 oxydoréductases dont une correspond à une déshydrogénase EC. Enfin sur LK, on identifie 2 oxydoréductases et 1 arabinanase en IC et 2 oxydoréductases en EC (**Tableau 29**).

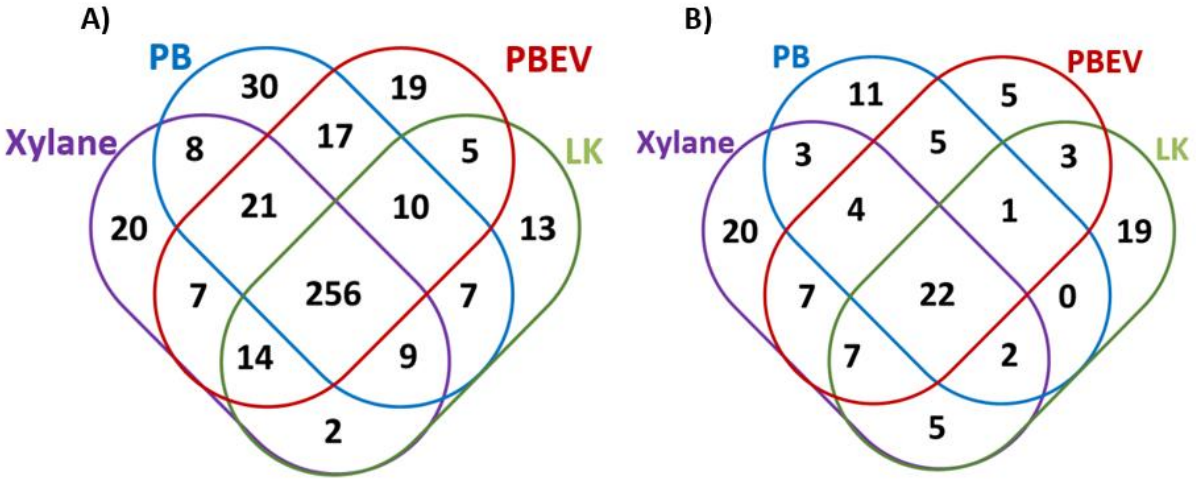


Figure 46 : Diagramme de Venn sur les protéines intracellulaires (A) et extracellulaires (B).

Tableau 29 : Identification des oxydoréductases et des hémicellulases intracellulaires (IC) et extracellulaires (EC) exprimées uniquement sur les substrats riches en lignine

Gene ID	Oxydoréductases IC	PB 50%	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_05255	Copper amine oxidase domain protein	X		
TXYL_09135	Short-chain dehydrogese/reductase SDR	X		
TXYL_10375	Ribonucleoside-diphosphate reductase NrdZ	X		
TXYL_18850	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	X		
TXYL_00550	Short-chain dehydrogese/reductase SDR, FabG		X	
TXYL_11125	FAD dependent oxidoreductase, Monomeric sarcosine oxidase		X	
TXYL_13680	2-oxoisovalerate dehydrogese subunit alpha		X	
TXYL_05820	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [DH] FabI			X
TXYL_08140	Probable DH-dependent butanol dehydrogese 1 YugJ			X

TXYL_05625	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	X	X	
TXYL_09355	UDP-glucose 6-dehydrogese, RkpK	X	X	
TXYL_09870	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	X	X	
TXYL_03290	Aryl-alcohol dehydrogese (DP(+)), Aldo/keto reductase	X		X
TXYL_07985	Oxidoreductase, aryl-alcohol dehydrogese		X	X
TXYL_15090	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogese		X	X
TXYL_03505	Triphenylmethane reductase,DPH-dependent quinine oxidoreductase	X	X	X
TXYL_18830	Putative Copper amine oxidase domain protein	X	X	X

Gene ID	Oxydoréductases EC	PB 50%	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_04070	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogese		X	
TXYL_03515	Alkylhydroperoxidase like protein, AhpD family			X
TXYL_11890	Ferredoxin			X
TXYL_18080	Cytochrome c oxidase subunit II	X	X	

Gene ID	Hémicellulases IC	PB 50%	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_09595	Xylosidase / Arabinosidase GH43	X		
TXYL_14985	Glycoside hydrolase GH43	X		
TXYL_08595	Beta-galactosidase GH42		X	
TXYL_10200	Alpha-galactosidase GH36		X	
TXYL_00090	Arabinase GH43			X
TXYL_15880	Carboxylesterase CE10	X	X	
TXYL_00645	Alpha-N-arabinofuranosidase GH 51	X		X
TXYL_16830	Carboxylesterase CE10	X	X	X

Gene ID	Hémicellulases EC	PB 50%	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_09630	Bifunctionl Glycoside hydrolase 10 and Carbohydrate esterase 1	X		
TXYL_14685	Beta-glucase (Endo-beta-1,3-1,4 glucase)	X		

IV.2. Comparaison de l'expression des protéines clés

L'analyse des niveaux d'expression des protéines identifiées permet de quantifier les protéines produites par rapport à une condition témoin qui est la culture sur xylane. Les taux de sur-expression ou de sous-expression ont été obtenus en normalisant les niveaux d'expression obtenus en appliquant la valeur 1 à l'ensemble des protéines produites exprimées sur le xylane.

Globalement, parmi les protéines qui sont significativement régulées ($p < 0,05$ et taux de faux positif < 0,05%), ~57 % des protéines IC produites par *TX* en présence de substrats lignifiés sont sur-exprimées par rapport au xylane. Sur PB, PBEV et LK, 42%, 30% et 9% des protéines EC respectivement sont sur-exprimées (**Tableau 30**).

Tableau 30 : Nombre de protéines IC et EC sur-exprimées et sous-exprimées, (% de sur-expressions des protéines (%) sur l'ensemble des substrats lignifiés par rapport au xylane).

	PB 50 %			PBEV 50 %			LK 50 %		
	Up	**Down**	**%**	**Up**	**Down**	**%**	**Up**	**Down**	**%**
IC	61	46	57	60	47	56	63	44	59
EC	14	19	42	10	23	30	3	30	9
Total	75	65		70	70		66	74	

Le **Tableau 31** montre les niveaux d'expression des différentes oxydoréductases et hémicellulases dans les différents compartiments cellulaires de *TX*. Au niveau des oxydoréductases IC identifiées dans tous les substrats, 11 oxydoréductases sont significativement sur-exprimées sur tous les substrats lignifiés. Les niveaux d'expression varient de 1,2 à 3,3 fois. Parmi les oxydoréductases sur-exprimées, c'est sur LK que la majorité de ces enzymes sont sur-exprimées à l'exception de deux copper amine oxidase Txyl_18830 et Txyl_05255 (niveau d'expression maximal sur PB) et Txyl_03505 codant pour une quinone reductase (niveau d'expression maximal sur PBEV). Les deux oxydoréductases les plus exprimées (sur-expression de 5,1x et 4,8 fois respectivement) sont Txyl_05820 (NADH réductase) et Txyl_17475 (catalase/peroxydase). Cette dernière enzyme n'est sur-exprimée que sur PBEV et LK. Dans le milieu de culture, la seule protéine exprimée de manière différentielle est Txyl_08800 (copper amine oxidase) ; elle est sur-exprimée uniquement sur PB et PBEV et sous exprimée sur LK.

Pour les hémicellulases, au niveau IC deux enzymes sont sur-exprimées quel que soit le substrat Txyl_00800 (Carbohydrate estérase 7) et Txyl_00645 (Arabinofuranosidase GH51). Txyl_00800 a des niveaux d'expression de 1,4 ± 0,0 ; 1,9 ± 0,2 et 1,6 ± 0,4 sur la PB, la PBEV et la LK respectivement alors que le niveau d'expression de Txyl_00645 est de 1,3 ± 0,2 sur PB et PBEV et 2,1 ± 0,8 sur la LK. Au niveau EC, les protéines Txyl_04370 (xylanase GH11) et Txyl_09630 (estérase CE1) sont sur-exprimées sur PB et PBEV et sous-exprimées sur LK. C'est sur paille de blé que les niveaux d'expression de ces deux enzymes sont les plus importants. (**Tableau 31**).

Tableau 31 : Expression des oxydoréductases et des hémicellulases en présence de substrats riches en lignine par rapport au xylane (Témoin). Un niveau d'expression >1 traduit une sur-expression par rapport au xylane alors qu'un niveau <1 montre une sous-expression.

Gene ID	Oxydoréductases IC	Niveaux d'expression		
		PB 50 %	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_17475	Catalase-peroxydase 2	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,8	4,8 ± 1,9
TXYL_03095	**Pyruvate flavodoxin/ferredoxin oxidoreductase domain protein**	**1,7 ± 0,3**	**1,4 ± 0,5**	**2,2 ± 0,6**
TXYL_03475	Glyoxal reductase,related to aryl-alcohol dehydrogenases	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
TXYL_12685	**Pyruvate ferredoxin oxidoreductase**	**1,3 ± 0,1**	**1,3 ± 0,1**	**2,0 ± 0,7**
TXYL_14695	**Peroxiredoxin, Alkyl hydroperoxide reductase**	**1,4 ± 0,0**	**1,1 ± 0,2**	**1,7 ± 0,3**
TXYL_16380	**Peroxydase GK3416 (heme-dependent)**	**1,4 ± 0,1**	**1,3 ± 0,2**	**1,4 ± 0,2**
TXYL_12560	**Inosine-5 -monophosphate dehydrogenase**	**1,6 ± 0,1**	**1,0 ± 0,2**	**1,8 ± 0,5**
TXYL_16280	**GutB2, Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein**	**1,3 ± 0,1**	**1,7 ± 0,2**	**2,0 ± 0,8**
TXYL_03505	**NADPH-dependent quinone oxidoreductase**	**1,7 ± 0,3**	**2,5 ± 0,3**	**1,8 ± 0,2**
TXYL_05670	**Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase**	**1,3 ± 0,1**	**1,6 ± 0,0**	**1,7 ± 0,2**
TXYL_14705	**NADH-peroxiredoxin reductase**	**1,7 ± 0,5**	**2,1 ± 0,2**	**3,1 ± 0,9**
TXYL_08345	Oxidoreductase Yc=vaA	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
TXYL_10620	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	2,1 ± 0,3	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1
TXYL_10375	Ribonucleoside-diphosphate reductase NrdZ	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,3
TXYL_03220	Manganese catalase	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
TXYL_18830	**Copper amine oxidase**	**3,3 ± 0,4**	**1,4 ± 0,4**	**1,4 ± 0,2**
TXYL_11820	Thiol peroxidase	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1
TXYL_05820	**Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]**	**1,7 ± 0,2**	**1,3 ± 0,3**	**5,1 ± 4,1**
TXYL_14760	Predicted Cytochrome c oxidase subunit II	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3
TXYL_09870	Oxidoreductase, aldo/keto reductase	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1
TXYL_05255	**Copper amine oxidase**	**2,6 ± 0,2**	**1,5 ± 0,7**	**1,2 ± 0,3**
TXYL_10495	Menaquinol-cytochrome c reductase	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3
Gene ID	**Oxydoréductases EC**	**PB 50 %**	**PBEV 50 %**	**LK 50 %**
TXYL_08800	Copper amine oxidase	2,1 ± 0,5	1,6 ± 0,4	0,3 ± 0,2

Hémicellulases IC	PB 50 %	PBEV 50 %	LK 50 %
Acetyl-xylane Esterase CE7	1,4 ± 0,0	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,4
Alpha-L-arabinofuranosidase GH51	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,5 ± 0,5
Xylosidase/Arabinosidase 43	1,7 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,3
Alpha-N-arabinofuranosidase GH 51	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	2,1 ± 0,8
b-L-arabinofuranosidase GH127	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,7 ± 0,5

Gene ID	Hémicellulases EC	PB 50 %	PBEV 50 %	LK 50 %
TXYL_04370	Endo-1,4-bêta-xylanase GH11	3,1 ± 3,0	1,9 ± 0,9	0,3 ± 0,4
TXYL_09630	Carbohydrate esterase CE1	9,2 ± 9,1	1,3 ± 1,7	0,7 ± 0,0

V : Production et caractérisation d'une peroxydase d'intérêt

Dans l'objectif de produire des oxydoréductases d'intérêt, nous nous sommes intéressés au gène Txyl_17475 (*Tx-3231*) qui code pour une peroxydase catalase (Tx-3231) intracellulaire Cette protéine est présente pour tous les substrats et sur-exprimée 1,7x et 4,8x sur les substrats lignifiés PBEV et LK.

V.1. Isolement du gène d'intérêt par PCR

Afin d'isoler le gène d'intérêt Txyl_17475 (*Tx-3231*) codant pour la peroxydase catalase putative Tx-3231, l'ADN génomique de *TX* précédemment extrait est utilisé comme matrice. Le gène est isolé et amplifié par PCR en utilisant des amorces amont et aval spécifiques. Les produits obtenus par PCR sont observés sous UV après migration électrophorétique sur gel d'agarose, (**Figure 47**). Ce profil électrophorétique met en évidence une bande d'environ 2200 pb correspondant à la taille attendue du gène *Tx-3231*. L'amplification à partir de l'ADN génomique a donc bien permis de confirmer la présence de ce gène dans le génome de *TX*. Cette amplification n'est pas spécifique puisqu'une bande d'environ 500 pb est également amplifiée (**Figure 47A**). Une purification de la bande d'intérêt après extraction sur gel a été effectuée en vue de réaliser le clonage (**Figure 47B**).

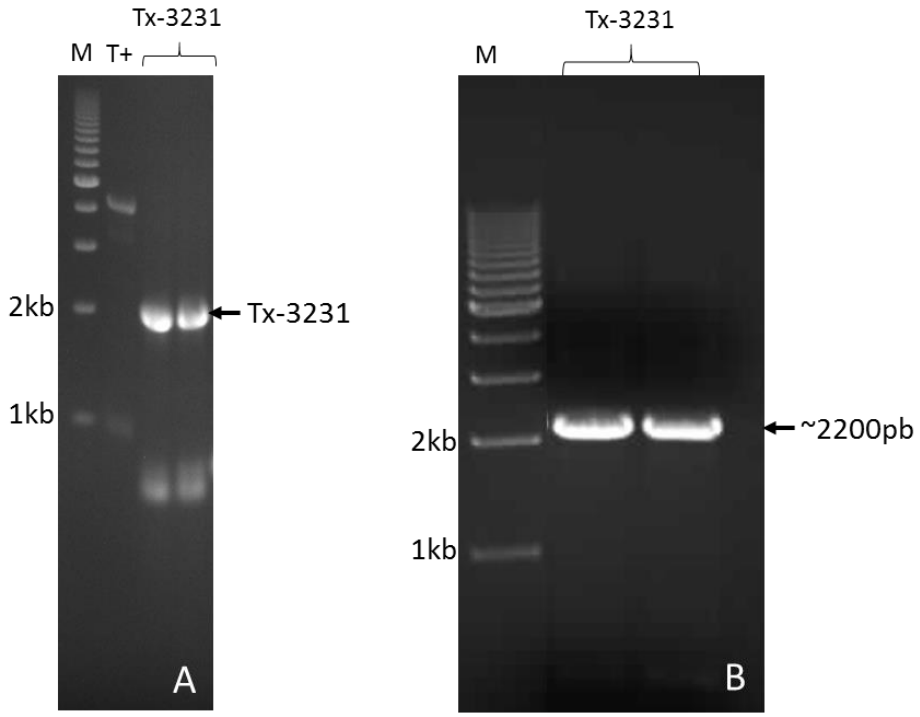


Figure 47 : Analyse électrophorétique du gène Tx-3231 amplifié par PCR ; A) après amplification, B) après purification ; (M : marqueurs de masse moléculaire, T+ témoin d'amplification)

V.2. Expression de *Tx-3231*

Le plasmide recombinant *Tx-3231* pEt28-His, a été introduit chez *E. coli* XL1Blue (bactérie de clonage). Après sélection des clones positifs, une extraction d'ADN plasmidiques et leurs séquençages ont permis de confirmer la présence du gène *Tx-3231*. Ces plasmides ont été introduits chez des bactéries d'expression *E. coli* Tuner DE3 et *E. coli* JM109 DE3 afin d'effectuer la production de la protéine recombinante.

Plusieurs tests d'induction avec différentes concentrations en IPTG ont permis de montrer que la protéine est produite de façon importante avec une concentration de 1 mM (données non présentées). La **Figure 48** montre l'expression de Tx-3231 avec 1 mM d'IPTG à 30°C et à 37°C avec les deux bactéries d'expression après 1 nuit d'induction. Avec *Tx-3231*-pEt28His-TunerDE3, une protéine de taille attendue (environ 80 kDa) est obtenue aussi bien dans les conditions de non induction qu'à 37°C ou à 30°C. Le niveau de production est plus important à 30°C. Avec *Tx-3231*-pEt28His-JM109DE3, aucune production n'est observée dans les cultures non induites. En revanche, la production est plus importante avec 1 mM d'IPTG à 37°C comparativement à la culture induite avec 1 mM d'IPTG à 30°C.

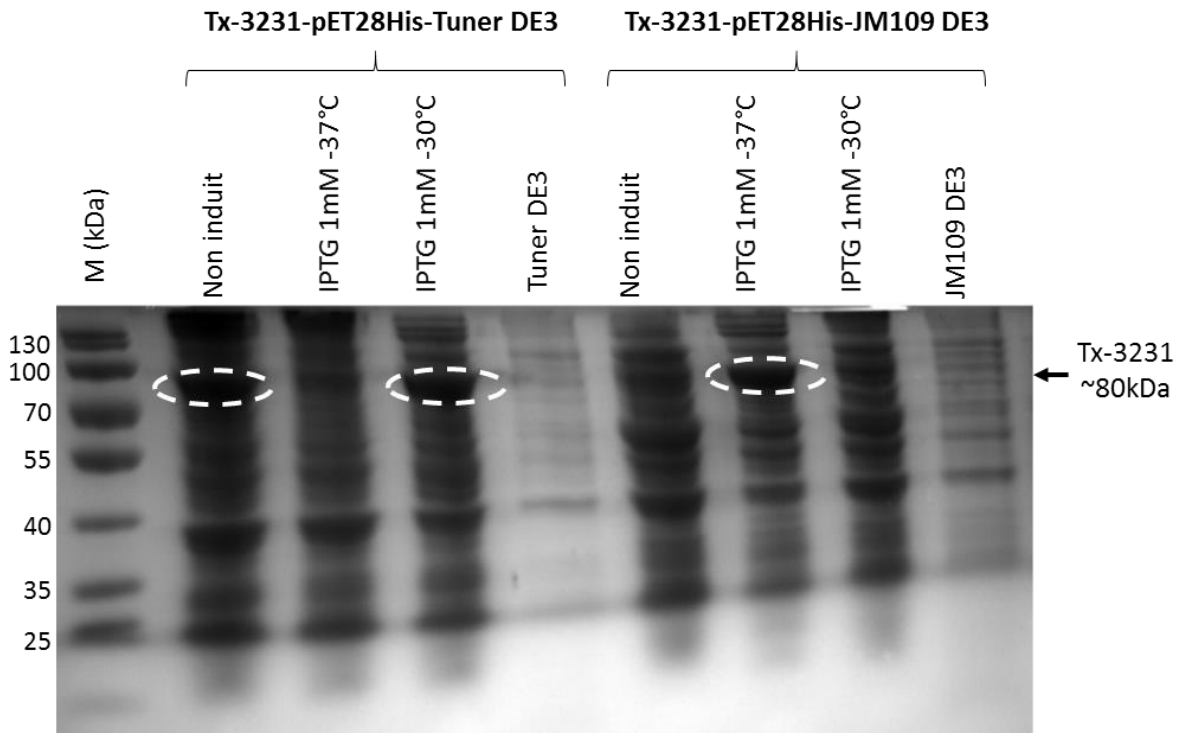


Figure 48 : Profil électrophorétique des différents extraits de culture de *E. coli* Tuner DE3 et JM109DE3 contenant le plasmide recombinant Tx-3231 pEt28 His obtenus après différentes conditions d'induction (M : marqueurs de masses moléculaire)

V.3. Purification de Tx-3231 recombinante

Suite à l'obtention de la protéine recombinante Tx-3231, après une culture cellulaire dans les conditions optimales déterminées précédemment (avec *Tx-3231*-pEt28His-TunerDE3 induite avec 1 mM d'IPTG et à 30°C), une purification protéique est réalisée suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE (**Figure 49A**).

La protéine Tx-3231 est présente sous forme soluble. Elle est parfaitement retenue dans la colonne de purification, et commence à être éluée en présence de 100 mM d'imidazole mais avec des protéines contaminantes (données non présentées). Elle est majoritairement éluée en présence de 300 mM d'imidazole. Après électrophorèse, la protéine est reconnue spécifiquement par les anticorps anti-Histidine (**Figure 49B**). On constate également la co-élution de bandes de plus hautes masses moléculaires (> 130 kDa) reconnues par les anticorps. Ces bandes pourraient représenter des états d'oligomérisation de la protéine qui n'aurait pas été dénaturée lors de la migration. Par ailleurs, les extraits de protéines purifiées ont une coloration orange, suggérant la présence de cofacteur hème dans les extraits.

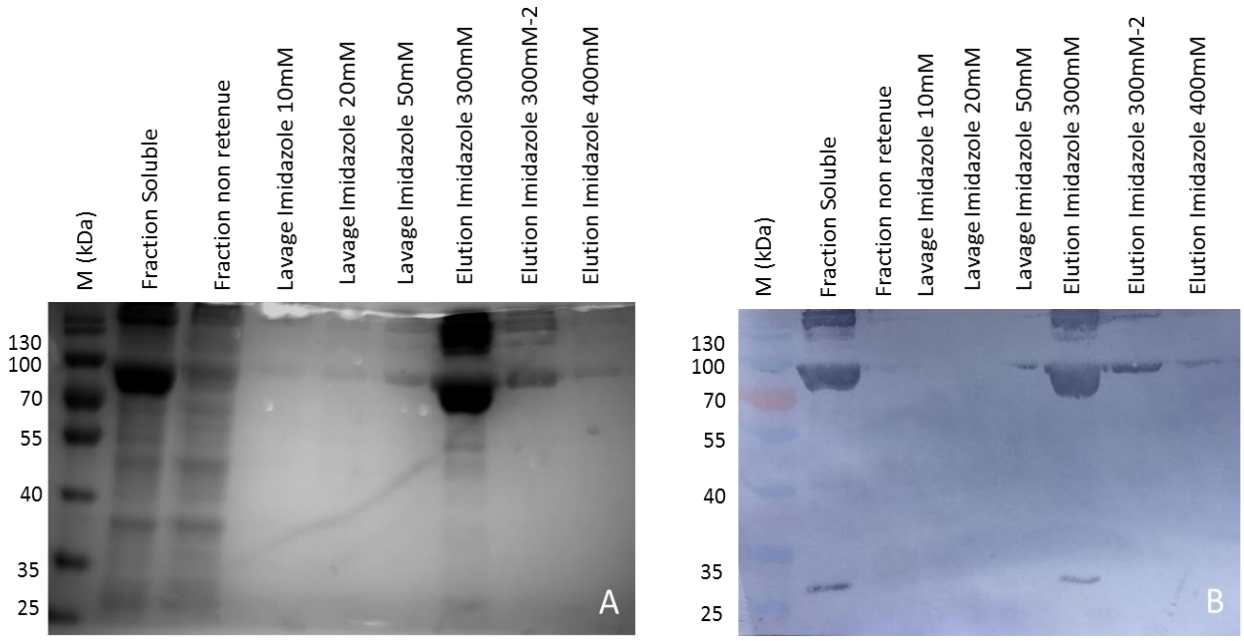


Figure 49 : Profil électrophorétique de la purification de *Tx-3231*. A) révélation au bleu de Coomassie, B) révélation en Western Blot avec des anticorps anti-Histidine ; (M marqueurs de masses moléculaire).

V.4. Caractérisation partielle de Tx-3231 : pH et température optimaux

Afin de procéder à la détermination de l'activité de Tx-3231, nous avons dans un premier temps identifié les conditions de pH et de température optimales à son activité (**Figure 50**). Les activités peroxydases ont été déterminées avec de l'ABTS et du pyrogallol comme substrat à pH acide et pH basique respectivement. Les activités enzymatiques sont testées aux différents pH à 50°C afin de déterminer le pH optimal (**Figure 50A**). L'enzyme est complètement inhibée aux pH inférieurs à 4. Les activités augmentent avec le pH pour atteindre une valeur maximale de 72 $UI.mg^{-1}$ à pH 7 (avec le pyrogallol). Une diminution de l'activité à pH basique (supérieur à 8) est ensuite observée (activité résiduelle de 55 % à pH 8 et pH 9). De ce fait, il peut être établi que le pH optimal des activités peroxydases de Tx-3231 est de 7. Pour l'activité catalase (mesurée en présence du substrat H_2O_2), le pH optimal est de 8 dans le Tris-HCl 100 mM. L'enzyme conserve 80 % et 42 % de son activité à pH 9 et pH 10 respectivement dans le tampon Tris-HCl (**Figure 50C**).

Les expériences pour déterminer les températures optimales d'activité de Tx-3231 ont été réalisées aux pH optimaux, à pH 7 pour l'activité peroxydase (avec le pyrogallol) et à pH 8 pour

l'activité catalase. Dans le cas de la peroxydase, une augmentation progressive de l'activité est observée pour atteindre une valeur maximale à 55°C. A 50°C et 60°C, l'enzyme conserve environ 60% de l'activité. En revanche, des activités résiduelles de 10% et 25% sont mesurées à 70°C et 30°C (**Figure 50B**). La température optimale de l'activité catalase est de 30°C. On observe une baisse de l'activité entre 74% et 55% de l'activité maximale entre 40°C et 50°C (**Figure 50D**).

Les activités spécifiques peroxydases et catalase de Tx-3231 (déterminées dans les conditions de température et pH optimaux) sont 65.8 ± 4.0 $UI.mg^{-1}$ et 50,4 ± 0,7 $UI.mg^{-1}$ respectivement.

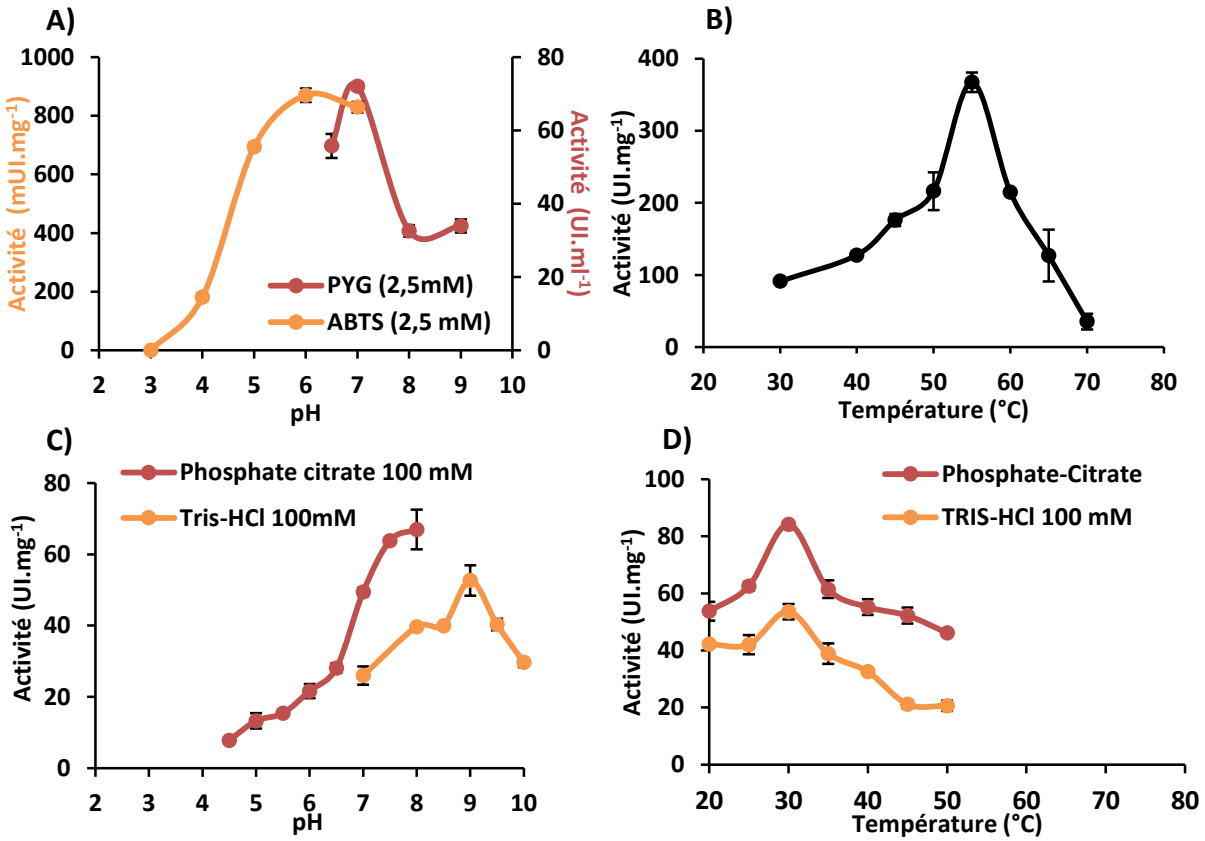


Figure 50 : pH et Température optimaux de Tx-3231. A-B) activité peroxydase; C-D) activité catalase

Discussion

I. Choix des substrats utilisés

Pour étudier la capacité ligninolytique de *TX*, des sources de carbone à la fois riches en lignines et de compositions chimiques ou structurales contrastées ont été sélectionnées. L'origine de ces substrats et leur disponibilité ont également été des critères importants à prendre en considération. La paille de blé (PB) a été retenue car c'est un coproduit agricole abondant et très utilisé dans de nombreuses études de fractionnement de la biomasse lignocellulosique (Kaparaju *et al.*, 2009; Talebnia *et al.*, 2010). Cette biomasse est riche en cellulose (30.8%) et en hémicellulose (20.7%) et possède une concentration en lignine non négligeable (23.7%) sous sa forme native. Plusieurs études ont montré la capacité de nombreux microorganismes à utiliser ce substrat lignifié (Ball and Mccarthy, 1988; Godden *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 2016). Des travaux récents au laboratoire ont mis en évidence la croissance de *TX* sur la paille de blé (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2014). Le deuxième substrat sélectionné pour l'étude de la physiologie de *TX* est la paille de blé explosée à la vapeur (PBEV), qui est issue d'un prétraitement de la biomasse permettant d'améliorer l'accessibilité à la cellulose dans le cadre de la bioraffinerie (Sun *et al.*, 2005; Alvira *et al.*, 2016). En revanche, dans ce substrat, les hémicelluloses sont souvent éliminées et la lignine est modifiée, en particulier au niveau des liaisons inter-monomères (Li *et al.*, 2007; Auxenfans *et al.*, 2017). La PBEV utilisée dans cette étude ne contient plus que 5,4% d'hémicelluloses mais, à l'inverse, possède une fraction plus importante de cellulose (43,2 %) et de lignine (30,3 %) en comparaison avec la PB. Les substrats lignocellulosiques contiennent également des acides phénoliques en quantité variable en fonction de leur origine botanique (Ralph, 2010; Santiago *et al.*, 2013; Lapierre *et al.*, 2019). Ces acides sont associés à la lignine et aux hémicelluloses par des liaisons ester et éther chez les graminées (Iiyama *et al.*, 1994; Ralph, 2010). Les teneurs en acide *p*-coumarique (*p*CA) dans la PB et la PBEV sont identiques (5,8 $mg.g^{-1}$), mais varient au niveau des formes estérifiées et éthérifiées. En effet, la proportion des formes estérifiées diminue de 56 % dans la PB à 50 % dans PBEV. En revanche, pour les acides féruliques (FA), non seulement la concentration varie entre ces deux substrats (5,2 *vs* 2,9 $mg.g^{-1}$ pour la PB et la PBEV respectivement), mais aussi la proportion des modes de liaisons : 64,8 % des FA sont éthérifiés dans la PB et 54,5 % des FA pour la PBEV. On observe également la présence d'acides di-féruliques (β-O-4) qui sont retrouvés en quantité similaire dans PB et PBEV suggérant une résistance de ces structures à l'explosion à la vapeur. La présence de ces acides phénoliques, en particulier les formes dimériques, peut jouer un rôle négatif au niveau de l'accessibilité des enzymes et microorganismes à ces substrats, du fait de la

présence de multiples interactions inter-polymères (e.g. entre lignines et hémicelluloses) (Santiago *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). D'un autre côté, ces acides phénoliques peuvent être valorisés par extraction enzymatique (Dupoiron *et al.*, 2017; Dupoiron *et al.*, 2018). Les compositions des résidus PB et PBEV sont en accord avec les travaux publiés au laboratoire sur des résidus similaires (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2014; Rakotoarivonina *et al.*, 2016; Auxenfans *et al.*, 2017; Paës *et al.*, 2019).

Enfin, le troisième substrat retenu est la lignine Kraft. Il s'agit d'une lignine issue de liqueurs de cuisson papetière, dont la production est abondante avec environ 130 millions t/an et dont la plus grande quantité est brulée pour produire de l'énergie dans les industries papetières (Davis *et al.*, 2016; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2019; Tribot *et al.*, 2019). Ce substrat est composé presque uniquement de lignine (85,3%), et sa structure et sa composition diffèrent de celles de lignines natives (PB) et modifiées (PBEV) (Chakar and Ragauskas, 2004). L'origine botanique de cette lignine commerciale n'est pas précisée par le fournisseur. Néanmoins, l'analyse RMN du phosphore indique la présence de groupements hydroxyles de type syringyle et guaiacyle suggérant que cette lignine provient d'angiospermes et non de conifères (Boerjan *et al.*, 2003).

Les profils de ces substrats sont très différents, ce qui a permis de confronter la bactérie *TX* à une diversité de substrats et de source de carbone (lignine technique, lignine native associée dans des polymères glucidiques,…). De nombreuses études de microorganismes en présence de substrats de composition complexe ont démontré des comportements physiologiques très différents en fonction des sources de carbone disponibles (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2012; Sainsbury *et al.*, 2013). Dans cette étude, l'utilisation de la PB, de la PBEV et de la LK a permis d'identifier des stratégies variables mises en place par *TX* pour s'adapter à chaque substrat.

II : Croissance et activités enzymatiques de TX sur des substrats lignifiés

Croissance et effet de la complémentation sur des substrats lignifiés

La croissance de *TX* en présence du substrat PB avait déjà été démontrée précédemment. Les temps de génération et les temps de latence observés en présence de ce substrat sont cohérents avec les résultats obtenus antérieurement (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Ici, nous montrons pour la première fois que cette bactérie est capable de croitre en présence de PBEV ou de LK comme seule source de carbone. A notre connaissance, c'est la première fois que la croissance d'une bactérie en présence de PBEV est rapportée. Cependant, la croissance et les

temps de génération de la bactérie sont deux fois plus faibles en présence de PBEV par rapport aux cultures sur PB. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette faible croissance : i/ l'accessibilité restreinte aux différents polymères due à leurs modifications structurales lors du prétraitement ; ii/ la présence éventuelle de produits inhibiteurs comme le furfural (issu des pentoses lors de l'explosion à la vapeur ou de l'autoclavage) iii/ la faible teneur en hémicellulose de ce substrat (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Klinke *et al.*, 2004; Pu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). *TX* est également capable de croitre en présence de LK, avec un taux de croissance similaire à celui obtenu avec la PB. Ceci montre la capacité de cette bactérie à utiliser la lignine (et par extension ses molécules aromatiques constitutives) comme unique source de carbone. Cependant, la croissance n'a débuté qu'après une longue phase de latence. De nombreuses études montrent que cette phase de latence permet aux microorganismes de s'adapter aux milieux environnants (production des enzymes nécessaires à l'utilisation d'un substrat complexe, détoxification des milieux,…), avant de pouvoir démarrer leur croissance (Loh and Tan, 2000; Glaser and Venus, 2017). Dans notre étude, nous avons montré une variation des temps de latence en fonction des substrats (LK > PB = PBEV). Leurs durées relativement longues pourraient être dues à la présence de composés inhibiteurs dans les milieux de culture. Ces composés peuvent être associés à des dérivés de furane issus de l'hémicellulose ou encore des composés phénoliques issus de la lignine, tous deux libérés par l'autoclavage dans les milieux de culture (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Klinke *et al.*, 2004; Monlau *et al.*, 2014; Aston *et al.*, 2016). Il a notamment été démontré que les acides aliphatiques étaient beaucoup moins inhibiteurs que les acides aromatiques et que la vanilline et l'acide vanillique étaient 5 fois plus inhibiteurs que le 5-hydroxymethylfurfural (Clark and Mackie, 1987; Jönsson and Martín, 2016). Plus récemment, une étude a montré une augmentation de la phase de latence d'*Alicyclobacillus acidocaldarius* en présence de composés comme les acides férulique, *p*-coumarique et sinapique (substrats), ce qui tend à conforter cette hypothèse (Aston *et al.*, 2016).

L'ajout de xylane dans les cultures permet d'augmenter significativement la croissance de *TX* sur l'ensemble des substrats lignifiés. La croissance rapide sur xylane seul, sans temps de latence contrairement aux cultures avec substrats lignifiés, met en évidence l'impact négatif de la lignine ou de ses constituants sur la croissance de *TX*. Quel que soit le substrat lignifié, le temps de latence ne varie pas avec l'ajout de xylane, contrairement à la durée de croissance qui augmente en présence de 50 % de xylane sur la PBEV et la LK et devient 2 à 3 fois plus longue par rapport aux cultures avec les mêmes substrats complémentés à 20% ou sans xylane. Malgré la concentration importante en lignine, les cultures avec LK complémentées ou non en xylane montrent des taux de croissance supérieurs aux cultures avec des substrats dont les structures

sont plus complexes (PB et PBEV, constituées de lignines, celluloses et d'hémicelluloses). Il est possible que la réticulation des lignines et des hémicelluloses par de nombreuses liaisons inter-polymères impliquant les acides phénoliques limitent leur utilisation par les microorganismes (Santiago *et al.*, 2013). La détection de dimère férulique dans la PBEV suggère qu'une fraction de ces interactions résiste à l'explosion à la vapeur, comme récemment proposé (Auxenfans *et al.*, 2017). Néanmoins, la production de biomasse bactérienne en culture complémentée reste plus faible avec PBEV par rapport à PB et LK avec xylanes. Ce résultat est en accord avec l'analyse des sucres dans les milieux de culture complémentée, la perte en xylanes est plus faible quand TX est cultivée avec PBEV.

La croissance de *TX* sur les substrats lignifiés peut être comparée à celle d'autres microorganismes lignocellulolytiques. Une étude sur la culture de *Rhodococcus jostii* RHA en présence de 2,5 $g.l^{-1}$ de PB et 0,5 $g.l^{-1}$ de LK avec une complémentation en glucose de 50 $mg.l^{-1}$ conduit à des résultats similaires à ceux de notre étude avec une DO_{600nm} de 1,2 sur la PB après 48 h et une DO_{600nm} de 0,6 après 72 h sur LK (Sainsbury *et al.*, 2013). Une deuxième étude menée dans des conditions similaires à nos travaux révèle que *Bacillus ligniniphilus* L1 se développe avec 1 $g.l^{-1}$ de LK (Zhu *et al.*, 2017). Les résultats obtenus sont aussi similaires à ceux de notre étude, avec une DO_{600nm} de 0,2 et une DO_{600nm} de 1 après 6 jours de croissance en présence de LK seule ou LK complémentée en glucose à 1 $g.l^{-1.}$ De plus, les auteurs observent qu'en présence de LK et de glucose, ce dernier est rapidement consommé pendant les premières 48 h, ce qui permet à la bactérie d'utiliser ensuite la LK comme source d'énergie pour soutenir sa croissance pendant les 4 jours suivants (Zhu *et al.*, 2017). Ces observations sont également retrouvées chez les bactéries *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, et *Enterobacter lignolyticus* ou encore chez *Pseudomonas* et *Rhodococcus* dont la croissance sur LK nécessite une complémentation avec d'autres sources de carbone (glucose ou xylose) (Raj *et al.*, 2007; Chandra *et al.*, 2007; DeAngelis *et al.*, 2013; Ravi *et al.*, 2019). L'ensemble de ces résultats souligne le besoin d'une autre source de carbone pour amorcer la croissance et permettre ensuite l'utilisation de la lignine comme source de carbone. En effet, la dégradation de la lignine est probablement trop lente pour que ce substrat apporte seul une source d'énergie suffisante pour soutenir une croissance optimale (DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017).

Sur LK, *TX* présente un meilleur taux de croissance que sur les deux autres substrats lignifiés complexes (PB et PBEV). Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de composés dont les groupements phénoliques libres, une fois l'inhibition levée, seraient plus facilement accessibles comme source de carbone pour *TX* (Chakar and Ragauskas, 2004). De plus, l'ajout

d'une source de carbone (xylane) a permis d'augmenter significativement les taux de croissance sur LK. Ceci a déjà été démontré chez d'autres microorganismes comme *Anerinibacillus aneurinilyticus* qui est capable d'utiliser la LK mais uniquement quand la culture est complémentée avec du glucose (Raj *et al.*, 2007). Différentes études ont mis en évidence une levée de l'inhibition de la croissance et une dégradation accrue des composés phénoliques, avec des complémentations par d'autres sources de carbone (Wang and Loh, 1999; Loh and Tan, 2000; Polymenakou and Stephanou, 2005; Sainsbury *et al.*, 2013). Plusieurs mécanismes sont proposés : 1) la consommation des sources de carbone facilement assimilables (glucose, xylose, xylane,..) permettrait l'obtention d'un nombre de cellules suffisant, les bactéries peuvent alors consommer plus efficacement la LK (Mamma *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2017) ; 2) l'ajout d'une source de carbone permettrait d'augmenter la tolérance des bactéries à la toxicité des composés phénoliques. Par ailleurs, l'acclimatation des cellules a un impact sur la croissance bactérienne en présence de ces composés phénoliques inhibiteurs. Par exemple, les bactéries *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas pseudoalcaligenes,* cultivées en présence de phénol et de glucose, utilisent dans un premier temps le glucose pour croitre avant de consommer les phénols présents. Dans ces études, les auteurs suggèrent que les bactéries doivent s'acclimater aux composés inhibiteurs avant de pouvoir les utiliser correctement et efficacement (Mamma *et al.*, 2004; Polymenakou and Stephanou, 2005). Notre étude montre également que *TX* est capable de croître en présence de LK (5 $g.l^{-1}$) sans être inhibée. Des effets inhibiteurs de LK importants sur la croissance de bactéries ont été montrés même à faible concentration. La croissance d'*Acetoanaerobium sp. WJDL-Y2* est inhibée en présence de LK à partir d'une concentration de 4 $g.l^{-1}$ alors que cet effet inhibiteur est observé dès 0,5 $g.l^{-1}$ sur la croissance de *Planococcus sp*. et *Pseudomonas fluorescens* (Priyadarshinee *et al.*, 2015; Duan *et al.*, 2016).

Protéines produites et dynamiques en fonction des substrats

La production de protéines par *TX* est dépendante des substrats présents dans le milieu de culture. Les quantités de protéines totales produites sur PB et xylane sont similaires à celles obtenues dans les études antérieures (~300 $\mu g.DO_{600nm}^{-1}$ en phase stationnaire) (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Ces concentrations en protéines totales produites sur PB sont aussi retrouvées chez d'autres microorganismes lignocellulolytiques comme *Cellulomonas* sp. lequel produit ~400 $\mu g.DO_{600nm}^{-1}$ après 96 h sur ce substrat (Emtiazi and Nahvi, 2000). Nous observons que les protéines EC sont fortement induites par la présence de substrats lignifiés. Ce résultat est similaire aux travaux précédents montrant la stimulation de la production de protéines EC en présence de PB et de son de blé tout au long de la croissance de *TX* (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Plusieurs

études ont démontré une amélioration de la sécrétion de protéines, en particulier des enzymes, en présence de substrats lignocellulosiques complexes (Godden *et al.*, 1989; Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Nos résultats confirment ces observations et suggèrent une corrélation entre la teneur en lignine et la production de protéines EC. En effet, des productions de protéines EC plus importantes sont observées sur les substrats les plus riches en lignines (PBEV et LK).

Sur les substrats lignifiés, la concentration en protéines EC est toujours supérieure aux protéines IC contrairement à la culture bactérienne sur le xylane seul. Dans ce dernier cas, la production de protéines EC n'intervient qu'en phase de croissance stationnaire. Des tendances similaires de production de protéines ont été observées durant la croissance de *Bacillus atrophaeus* LSSC3 avec deux fois plus de protéines EC que IC produites sur la LK (Huang *et al.*, 2013).

Les dynamiques de production des protéines sont également très variables en fonction des substrats. Les niveaux de production de protéines EC sont supérieurs à ceux de de protéines IC sur PB et LK. Les niveaux de protéines EC restent importants pendant la durée de la culture mais une augmentation de protéines IC est observée. Sur la PBEV, les niveaux de production EC et IC sont équivalents en début de croissance puis une production de protéines EC est observée et les protéines IC diminuent. En présence de substrat complexe, la stratégie de la bactérie devrait consister à produire majoritairement des protéines EC en début de croissance pour dégrader et permettre l'assimilation de la source de carbone (Falade *et al.*, 2019a). C'est ce phénomène qui est observé en présence de PB et LK. En revanche, en présence de la PBEV, dès le début de la croissance ,*TX* produit beaucoup de protéines IC qui pourraient lui servir pour s'adapter à ce substrat ou le détoxifier, et qui semble en tout cas plus difficile à utiliser (milieu de culture contenant potentiellement des composés inhibiteurs et/ou toxiques variés comme des dérivés furanes et phénoliques issus du prétraitement) (Klinke *et al.*, 2004; Aston *et al.*, 2016).

Activités Xylanases et effet de la complémentation

TX est une bactérie produisant des activités hémicellulolytiques et la production de ces activités est variable en fonction des substrats (Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Nous confirmons ces résultats dans ce travail avec une production d'activité xylanase, laquelle est majoritairement extracellulaire en présence de PB, et plus importante en phase stationnaire (Rakotoarivonina *et al.*, 2012; Rakotoarivonina *et al.*, 2014; Rakotoarivonina *et al.*, 2016). Une xylanase de la famille 11 (Tx-xyn11) déjà caractérisée est la principale xylanase sécrétée dans le milieu de culture de la bactérie en présence d'hémicellulose ou de parois végétales (Samain *et al.*, 1997; Harris *et al.*,

1997; Rakotoarivonina *et al.*, 2012). Les activités xylanases mesurées par unité de protéines sont plus importantes que chez d'autres bactéries lignocellulolytiques comme *Cellulomonas* sp. ou *Streptomyces* sp. F2621, qui en présence de PB produisent ~8 UI.mg^{-1} de protéines, soit 10 fois moins que *TX* (Emtiazi and Nahvi, 2000; Tuncer *et al.*, 2004). En revanche sur PBEV et LK seules, aucune activité xylanase n'est détectée. *TX* étant une bactérie hémicellulolytique, cette absence de production est probablement corrélée avec l'absence ou la quasi absence d'hémicellulose dans ces substrats. La production de ces activités est souvent induite par des xylooligosaccharides issus des hémicelluloses des parois végétales (Samain *et al.*, 1997; Jørgensen *et al.*, 2005; Chávez *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2010). Ainsi, quand les milieux de culture sont complémentés avec du xylane, une augmentation significative des activités xylanases sur l'ensemble des substrats lignifiés est observée.

L'examen des dynamiques d'activités xylanases exprimées par rapport à la teneur en protéines permet de différencier les cultures avec xylane seul, des cultures avec substrats lignifiés complémentés avec du xylane. Une production importante de xylanases est observée dès le début de la croissance avec xylane seul, alors que ces activités augmentent progressivement sur les substrats lignifiés complémentés jusqu'à la phase stationnaire de croissance. Cette dynamique a déjà été démontrée dans les cultures de *TX* en présence de PB et de son de blé (Rakotoarivonina *et al.*, 2014). Cette dynamique peut être expliquée par le fait que les activités xylanases sont souvent induites par la présence de xylane ou les oligosides produits par les enzymes elles-mêmes (Jørgensen *et al.*, 2005; Chávez *et al.*, 2006). En présence de petits oligosides (xylobiose) ou de sucres simples comme du xylose, les microorganismes lignocellulolytiques produiraient des xylanases à un niveau d'activité basal pour dégrader rapidement le xylane présent dans le milieu (Jørgensen *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005). Ainsi, une libération possible de xylooligosides ou xylose après autoclavage du milieu de culture peut induire directement la production de xylanases dès le début de la croissance. En présence de substrats lignocellulosiques complexes, plusieurs xylanases peuvent être exprimées ; cette diversité pourrait être associée à la nature des hémicelluloses et leur degré de ramification. En effet, il est connu que les xylanases n'ont pas toutes les mêmes profils d'activité (Beaugrand, Chambat, *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2011; Podkaminer *et al.*, 2012; Broeker *et al.*, 2018; Malgas *et al.*, 2019). Ainsi pour dégrader les hémicelluloses dans les substrats lignifiés, la bactérie doit produire des xylanases spécifiques (par la production d'oligosides inducteurs spécifiques), ce qui peut entraîner un décalage dans le temps de ces productions.

Activités phénol-oxydases et effet de la complémentation

Nos travaux ont montré, pour la première fois, des activités phénol-oxydases (POX) chez *TX*. Les activités phénol-oxydases ont été dosées en présence et absence de H_2O_2 (activités peroxydase et laccase). Les activités laccases étant très faibles, l'activité POX mesurée correspond majoritairement aux activités peroxydases. Les profils de production au cours du temps de ces activités enzymatiques sont différents et dépendent de la composition de la biomasse lignocellulosique présente dans les milieux de culture. Des différences d'activités ligninolytiques sont observées aussi bien chez les bactéries que chez les champignons en présence de différents substrats plus ou moins lignifiés (Stajić *et al.*, 2006; Mikiashvili *et al.*, 2006; Jing and Wang, 2012). Nous avons essayé de comparer nos activités avec les résultats de la littérature, même si les conditions de mesures sont souvent variables d'une étude à une autre et ne sont pas toujours bien précisées. Les niveaux d'activités détectés chez *TX* (6 $UI.mg^{-1}$) en présence de PB, sont comparables aux niveaux d'activités obtenus avec d'autres bactéries comme *Streptomyces albus* ATCC, *Ensifer adhaerens*, *Streptomyces* sp. F6616 et *Raoultella ornithinolytica*, avec des activités POX de 3,4; 5,2; 6,2 et 7,2 $UI.mg^{-1}$ de protéines respectivement (Antonopoulos *et al.*, 2001; Tuncer *et al.*, 2009; A., Falade *et al.*, 2019a; Falade *et al.*, 2019c). Toutefois, aucune activité POX en $UI.mg^{-1}$ de protéines en présence de LK pour des bactéries, n'est décrite dans la littérature. C'est pourquoi, nous comparons ici les activités obtenus en $UI.l^{-1}$, même si ces comparaisons ne prennent pas en compte l'importance de la croissance et donc de la production protéique. En présence de LK seule, la production d'activité POX IC de *TX* (15 $UI.l^{-1}$) est plus importante que celle de *Bacillus atrophaeus* (0,5 $UI.l^{-1}$), *Bacillus pumilus* (0,7 $UI.l^{-1}$) et de *Bacillus* sp. (3,5 $UI.l^{-1}$) (Huang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). De même, en présence de LK complémenté avec une autre source de carbone, les activités POX EC de *TX* (115 $UI.l^{-1}$) sont supérieures à celles déterminées chez *Nonomuraea gerenzanensis* (70 $UI.l^{-1}$), mais sont inférieures à celles retrouvées chez *Klebsiella pneumoniae* NX-1 (250 $UI.l^{-1}$) et Pseudomonas putida NX-1 (600 $UI.l^{-1}$) (Casciello *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018b).

Les activités POX sont détectées aussi bien dans le milieu extracellulaire que dans les cellules, car ces différents types d'activités sont nécessaires pour dépolymériser la lignine dans milieu EC et pour le catabolisme intracellulaire des composés aromatiques (Huang *et al.*, 2013; Kamimura *et al.*, 2017a). La localisation et les dynamiques de production d'activités POX varient fortement selon les substrats lignifiés. En effet, les variations de composition et teneur en lignine impliquent des besoins en enzymes variables (Stajić *et al.*, 2006; Mikiashvili *et al.*, 2006; Jing and Wang, 2012). Ainsi, en présence du substrat xylane (hémicellulose) les activités POX sont

uniquement IC et sont très faibles, comparativement aux activités POX détectées dans les cultures avec substrats lignifiés qui nécessitent la production d'activités ligninolytiques EC. La production d'activité IC par *TX* cultivée en présence de xylane seul est probablement liée à la régulation de l'H_2O_2 intracellulaire ou des activités antioxydantes (La Carbona *et al.*, 2007; Mishra and Imlay, 2012). Pour la culture avec PB, les activités sont majoritairement EC en début de croissance puis la dynamique s'inverse et les activités deviennent principalement IC. La production d'activité EC en début de croissance s'explique par le besoin de dépolymériser ce substrat complexe, puis la production d'activité IC permettrait de métaboliser une partie des composés phénoliques issus de cette dépolymérisation. Une production importante d'activités POX EC sur la PB en début de croissance, suivie par une diminution au cours du temps est aussi observée chez *Streptomyces* sp. F6616 (Tuncer *et al.*, 2009). En présence de LK, la bactérie produit principalement des activités IC avec le développement d'activité EC après la fin de la phase stationnaire de croissance. Cette localisation majoritairement IC et ces dynamiques de production d'activité POX s'expliquent en partie par la structure de la LK, qui n'est pas associée dans un réseau de polysaccharides contrairement à PB et PBEV. Cette lignine montre une polydispersité au niveau de son masses moléculaire, et les composés aromatiques de faible masse qui la constituent, pourraient être internalisés puis métabolisés à l'aide des activités ligninolytiques IC (Chakar and Ragauskas, 2004; Abdelaziz and Hulteberg, 2017). L'évolution des activités POX IC, détectées dès le début de la croissance et de manière plus importante que les activités EC, a aussi été décrite chez *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* sp. et *Pandoraea* sp. ISTKB (Huang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015). L'apparition des activités POX EC en fin de phase exponentielle de croissance est également rencontrée chez un très grand nombre de bactéries avec notamment *Comamonas* B-9, *Novosphingobium* sp., *Cupriavidus basilensis* B-8, *Nonomuraea gerenzanensis Pseudomonas pudita*, *Raoultella ornithinolytica* et *Ensifer adhaerens* (Chen *et al.*, 2012a; Chen *et al.*, 2012b; Shi *et al.*, 2013a; Casciello *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018b; Falade *et al.*, 2019a; Falade *et al.*, 2019c). Enfin, pour la culture avec PBEV, les activités POX sont essentiellement EC contrairement aux substrats PB et LK qui conduisent à la production de POX principalement IC. En présence de PBEV, la production est majoritairement EC en début de croissance, puis diminue au cours du temps à l'inverse des activités POX IC qui sont détectées en fin de culture. Cette localisation des activités POX principalement EC en début de croissance peut s'expliquer par la structure plus condensée de la lignine de la PBEV par rapport à celle de la PB (Ballesteros *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). La production importante d'activité POX IC après la fin de la phase exponentielle de croissance, est

probablement liée à l'augmentation des composés phénoliques issus de la dépolymérisation du substrat.

Les activités POX sont toujours détectées après le début de la croissance et comme pour *TX*, l'ajout d'une source de carbone supplémentaire a permis d'améliorer la production d'activité POX chez *Nonomuraea gerenzanensis* en présence de LK (Casciello *et al.*, 2017). La dégradation de la lignine est probablement trop lente pour que ce composé apporte l'énergie suffisante pour soutenir une croissance optimale (DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). Une autre source de carbone apporterait aux bactéries l'énergie nécessaire pour produire les activités POX et ainsi par la suite utiliser la lignine et ces dérivés comme source d'énergie. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus chez *Nonomuraea gerenzanensis* qui, en présence de LK, produit des activités POX après avoir consommé l'ensemble du glucose à disposition (Casciello *et al.*, 2017).

III : Effet sur les résidus et composés phénoliques

Modifications des résidus

L'IRTF est généralement une méthode analytique adaptée pour donner une indication rapide et qualitative de l'évolution chimique des lignocelluloses après croissance microbienne (Fackler and Schwanninger, 2012). Toutefois, la plupart des bandes ne sont pas attribuables à des constituants spécifiques en raison de possibles recouvrements de bandes de vibration associées à la cellulose, les hémicelluloses et la lignine ou d'autres produits de la fermentation ou du métabolisme microbien, dans notre cas, potentiellement en interaction avec les lignocelluloses (Schwanninger *et al.*, 2004; Adapa *et al.*, 2011). L'analyse des spectres infrarouges (avec et sans croissance bactérienne) montre que les substrats lignifiés sont modifiés après croissance. Dans le cas de la paille de blé (PB), la diminution de l'absorption des bandes de vibration dans la région 1200 et 900 cm^{-1} correspond principalement à la région d'absorption des polysaccharides (Schwanninger *et al.*, 2004; Bekiaris *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). La bactérie *TX* ne produisant pas d'activité celullolytique, nous pouvons en déduire que ces modifications portent principalement sur les hémicelluloses. En revanche, l'absence de variation d'intensité des bandes de vibration correspondant au domaine aromatique (1200-1700 cm^{-1}) suggère un effet peu marqué de la bactérie sur le compartiment lignine de la paille de blé. Ce résultat est concordant avec l'analyse infrarouge de la paille de blé après croissance de la bactérie *Streptomyces viridosporus* (Zeng *et al.*, 2013). Les auteurs ont principalement observé une modification des bandes correspondant aux hémicelluloses et suggèrent une possible variation de bandes attribuées à la lignine. En revanche, de nombreux travaux ont mis en évidence l'action

ligninolytique de différents champignons sur la biomasse lignocellulosique grâce à la spectroscopie infrarouge (Fackler and Schwanninger, 2012). Par exemple, après culture du champignon *Ganoderma lobatum*, les spectres IR de PB montrent une baisse d'absorbance à 1505 cm^{-1} attribuée à la lignine (Hermosilla *et al.*, 2017). Contrairement aux résultats obtenus sur la PB, les variations de spectres IR de PBEV après culture bactérienne correspondent à des augmentations d'intensité dans la région des polysaccharides (1200-900 cm^{-1}). L'hypothèse formulée est qu'une partie du xylane ajouté en complémentation dans les milieux de culture se serait physiquement lié au résidu de PBEV au cours de la culture. Ce résultat suggère que *TX* utilise moins de xylane en présence de PBEV, comme l'indique l'analyse des sucres dans les milieux de culture. En effet, dans les cultures complémentées par du xylane, sa perte atteint 92% dans le cas de la PB contre 72% dans le cas de PBEV, en fin d'expérimentation. Cette hypothèse est en accord avec les croissances deux fois plus faibles observées sur la PBEV par rapport aux substrats PB et LK complémentés. A notre connaissance, aucune donnée n'est décrite dans la littérature sur l'analyse infrarouge des substrats explosés à la vapeur après culture microbienne. Récemment, il a été montré que les spectres infrarouges de biomasses explosées à la vapeur varient par l'intensité plus élevée des bandes de la région de la lignine (1512 et 1600 cm^{-1}), suite à la disparition des sucres provoquée par le sécrétome d'un champignon cellulolytique, *T. reesei* (Paës *et al.*, 2019). Après culture de *TX* en présence de LK complémentée, les modifications sont principalement liées à la diminution d'intensité des bandes d'absorption du xylane. Toutefois la modification de la bande 1035 cm^{-1} pourrait refléter une altération des groupements aliphatiques ou aromatiques dans la lignine (Kumar *et al.*, 2015; Abdelaziz and Hulteberg, 2017). En effet, la culture de champignons et de bactéries comme *Serratia marcescens*, *Penicillium simplicissimum* et *Pandoraea* sp. ISTKB en présence de LK entraîne aussi la modification des bandes d'absorbance 1115 et/ou 1035 cm^{-1} qui ont été attribuées à la lignine (Manangeeswaran *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014b; Kumar *et al.*, 2015). Il reste néanmoins très difficile de conclure sur l'altération des lignines kraft dans ces études, en effet l'analyse infrarouge porte généralement sur les milieux de culture contenant la lignine, avec ou sans croissance bactérienne.

Les variations mises en évidence dans notre étude ne sont pas suffisantes pour conclure à une modification ou dégradation de la lignine. En effet, ces modifications semblent principalement dues à la diminution du xylane. C'est pourquoi une analyse RMN a été effectuée pour identifier plus spécifiquement de potentielles modifications de la lignine par la croissance de *TX*. En effet à notre connaissance, l'action des bactéries sur les substrats lignifiés complexes comme la paille de blé est rarement étudiée par des approches en spectroscopie RMN en phase liquide (Akinosho *et al.*, 2017).

L'analyse des spectres RMN-2D des substrats PB et PBEV ne met pas en évidence une variation significative de la lignine dans ces substrats après culture bactérienne. En effet, les ratios S/G ainsi que les pourcentages des principales liaisons inter-unités de la lignine (alkyle aryle éther, phénylcoumarane, résinol), des résidus PB et PBEV avec et sans croissance ne sont pas significativement différents et ne permettent pas de conclure à des modifications de la lignine par la croissance de *TX*. De même, l'analyse RMN 2D de peuplier ne montre pas de variations structurales majeures de la lignine par la bactérie cellulolytique *Clostridium thermocellum* (Akinosho *et al.*, 2017). Dans le cas des cultures avec la lignine kraft, l'analyse des milieux avec LK par RMN du phosphore ne permet pas de conclure à des modifications significatives des groupements hydroxyles de la lignine car les résidus n'ont pu être entièrement solubilisés après dérivation et donc peuvent ne pas contenir toutes les structures de départ et/ou altérées par *TX*. De plus, dans ce cas, l'analyse porte sur l'ensemble des composés retrouvés dans le milieu, et pas uniquement la lignine kraft résiduelle, dont des composés phénoliques libérés dans le milieu de culture par la fermentation ou l'autoclavage.

Modifications des composés dans les milieux de cultures

Les composés aromatiques détectés dans les milieux de culture après 30h sans croissance diffèrent selon les substrats lignifiés. L'acide vanillique est le principal monomère phénolique quantifié dans les milieux avec LK contrairement aux milieux avec PB et PBEV où sont détectés d'autres composés phénoliques, notamment l'acide p-coumarique PCA et l'acide férulique (FA), di-férulique (Di-FA) ainsi que la vanilline. La présence de ces composés dans les milieux sans croissance bactérienne peut provenir d'une modification des substrats après autoclavage, avec la rupture partielle de liaisons esters entre acides phénoliques avec la lignine ou les hémicelluloses et une altération des unités de la lignine conduisant à la libération de différents composés phénoliques à partir des unités Hydroxyphényle (*p*-hydroxybenzaldéhyde, *p*H ; acide *p*-hydroxybenzoïque, *p*HA), guaiacyle (vanilline, V ; acide vanillique,VA) et syringyle (acide syringique, SA ; syringaldéhyde, S).

Les teneurs en acides phénoliques présents dans les milieux de cultures sans croissance représentent 6,6 et 5,6 % pour la PB et la PBEV respectivement. Ces quantités d'acides phénoliques libérées sont faibles par rapport au potentiel total présent dans ces substrats. Après croissance bactérienne, la teneur en acides phénoliques passe à 12,7 et 4,2 % pour la PB et la PBEV respectivement, ce qui suggère une libération d'acides phénoliques après croissance bactérienne sur PB et une diminution sur PBEV. Pour la LK, la teneur en composés phénoliques libéré dans les milieux de cultures sans croissance ne représente que 0,1 % du potentiel totales

en équivalent phénol. Après croissance bactérienne, la teneur en composé phénoliques augmente très légèrement principalement due à la libération de VA dans le milieu de culture. Dans l'ensemble des milieux avec croissance bactérienne, des variations de concentration en composés phénoliques sont observés et dépendent des substrats utilisés. En effet, en présence de PB une augmentation des teneurs en *p*CA, FA, di-FA et SA, ainsi qu'une diminution de VA et V sont observées. Après culture de la bactérie avec la PBEV, les teneurs en *p*HA, FA et VA augmentent contrairement aux teneurs en *p*CA, V et *p*H. Enfin sur la LK, une augmentation importante des VA, ainsi qu'une diminution des *p*H sont observées après croissance.

L'évolution des acides phénoliques libérés en présence de PB, peuvent provenir des acides phénoliques liés aux hémicelluloses ou à la lignine. En effet, les activités hémicellulolytiques tels que les estérases sécrétées par *TX*, peuvent cliver les liaisons esters ou bien encore l'action d'activités ligninolytiques qui peuvent cliver les liaisons éthers pour expliquer la libération d'acides phénoliques (Iiyama *et al.*, 1990; Rakotoarivonina *et al.*, 2014). En ce qui concerne la PBEV, la plus faible présence de FA par rapport à la PB, peut s'expliquer pas une teneur en hémicelluloses plus faible dans ce substrat (Li *et al.*, 2007). La diminution en *p*CA et V, corrélé avec la libération de *p*HA et VA, semble indiquer un mécanisme de métabolisation duent à des activités ligninolytiques des composés phénolique par *TX* en présence de PBEV, de même que la libération de VA en présence de LK (Ravi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence pour la première fois que *TX* est capable de s'adapter à la présence de composés phénoliques dans son environnement. Toutefois, compte tenu des limites expérimentales discutées dans les sections ci-dessus, il n'est pas possible de conclure sur une ligninolyse de lignine polymérique, ou sur un catabolisme de phénols de petite masse, et provenant de diverses sources (les LC et le métabolisme de *TX*, principalement).

Plusieurs études ont également rapporté une relation entre la libération d'acides phénoliques, ainsi que celle des composés aromatiques issus de la PB après la croissance de bactéries sur ce substrat (Ball *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 1990; Tuncer and Ball, 2002; Tuncer *et al.*, 2004b). En présence de PB, *Rhodococcus jostii* RHA1, les acides vanillique et férulique sont libérés après croissance bactérienne (Sainsbury *et al.*, 2013). Sur la LK, de nombreuses études rapportent des modifications de milieux de culture et des productions de composés aromatiques après croissance bactérienne. En effet, *Comamonas* sp. B-9 consomme la vanilline et l'acide vanillique après 7 jours de croissance sur LK, pour produire des alcools et des aldéhydes (Chen *et al.*, 2012a). En revanche, *Bacillus ligniniphilus* L1, tout comme TX, produit et/ou libère de

grande quantité d'acide vanillique à partir de la LK, avec une diminution de la concentration en vanilline dans le milieu de culture (Zhu *et al.*, 2017).

IV : Identification d'oxydoreductases clés par approches omiques et caractérisation d'enzyme d'intérêt

Globalement, sur l'ensemble des substrats lignifiés, les protéines sont sur-exprimées, au niveau IC (entre 56 et 59 %), ce qui suggère une activité métabolique plus importante sur ces substrats complexes par rapport au xylane. En revanche, le nombre de protéines EC sur-exprimées est beaucoup plus important en présence de PB et PBEV que de LK, ce qui s'explique par le fait que la PB et la PBEV sont des substrats plus complexes que la LK. La bactérie doit mettre en œuvre une plus grande diversité de protéines EC pour utiliser ces substrats. Dans tous les cas, plusieurs oxydoréductases et hémicellulases sont communes aux différents substrats lignifiés et xylane mais avec des niveaux d'expression variables. D'autres protéines sont uniquement sur-exprimées en présence de substrats lignifiés. Sur PB et PBEV, des enzymes comme des déshydrogénases, des aryl alcool oxydases, des cytochrome C oxydases et des enzymes de stress comme les superoxydes dismutases sont sur-exprimées. Nos résultats sont similaires à ceux rapportés dans d'autres études de protéomiques en présence de substrats complexes (Brown *et al.*, 2011; DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018).

Une étude protéomique récente réalisée en présence de PB (avec de la cellulose comme témoin) chez *Pedobacter* O48 et *Luteibacter* L214, deux bactéries retrouvées dans le sol organique d'une forêt de chênes, montre la sur-expression des mêmes types d'oxydoréductases en présence de PB (López-Mondéjar *et al.*, 2016). Parmi ces enzymes, une manganèse superoxyde dismutase, une cytochrome C oxydase et une 6-phosphogluconate déshydrogénase sont sur-exprimées 1,3 et 2,0 fois ; 1,5 et 1,6 fois ; 1,6 fois et 1,1 chez *Luteibacter* L214 et *Pedobacter* O48 respectivement en présence de PB (López-Mondéjar *et al.*, 2016).

En présence de LK, les oxydoréductases sur-exprimées chez *TX* ont également été retrouvées sur-exprimées chez d'autres bactéries ligninolytiques comme *Bacillus ligniniphilus* L1, *Pandoraea sp* ISTKB ou *Enterobacter lignolyticus* SCF1 (DeAngelis *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Une ferredoxine et une peroxyrédoxine réductase sont exprimées 2 et 2,6 fois respectivement sur LK (avec du glucose comme témoin) par *Bacillus ligniniphilus* L1. Ces mêmes types d'enzymes sont exprimés entre 2 et 3,1 fois chez *TX.* Une catalase/peroxydase est aussi sur-exprimée 3,5 fois chez *Enterobacter lignolyticus* SCF1 en présence de LK avec du xylane comme témoin, alors que la catalase/peroxydase de *TX* est sur-exprimée 4,8 fois sur LK

par rapport au xylane (DeAngelis *et al.*, 2013). De nombreuses autres oxydoréductases incluant des aldo/keto réductases, des alcool déshydrogénases, des Enoyl-[acyl-carrier-protein] réductases [NADH] sont sur-exprimées par *Pandoraea* sp. ISTKB, et par *Cedecea lapagei* une bactérie intestinale de grillons en présence de LK, ou liqueur noir riche en lignines (Kumar *et al.*, 2018; Mathews *et al.*, 2019).

Les oxydoréductases sur-exprimées en présence des substrats lignifiés chez *TX* sont en particulier la manganèse superoxyde dismutase, la glutathionne peroxydase, une NADH peroxyrédoxine réductase, des copper amine oxydases et des ferrédoxines oxydoréductases. Récemment, de nombreuses études ont observé ces oxydoréductases en présence de substrats lignifiés en réponse au stress et pour détoxifier les milieux de culture (en présence de lignine et de ces dérivés) (Bandounas *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018; Mathews *et al.*, 2019). En effet, les glutathionne peroxydases et les peroxyrédoxines ont été identifiées comme des acteurs antioxydants qui protègent les cellules contre le peroxyde d'hydrogène et les espèces d'oxygènes réactives (ROS), tandis que les Aldo/keto réductases sont plutôt associées à la détoxification des composés carbonylés (Bandounas *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018; Mathews *et al.*, 2019). La manganèse superoxyde dismutase, est probablement impliquée dans la dégradation de la lignine ou la détoxification de ses dérivés (Rashid *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018). Les copper amine oxydases permettent la production d'aldéhyde et de peroxyde d'hydrogène par l'oxydation d'amines primaires et pourraient avoir un rôle dans la dégradation de la lignine avec notamment la rupture de cycles aromatiques (Kishishita *et al.*, 2003; Kameshwar and Qin, 2017; Nagakubo *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2019). L'enoyl-[acyl-carrier-protein] réductase [NADH] est une enzyme capable de dégrader certains phénols et en particulier le triclosan qui est bactériostatique et peut inhiber la croissance bactérienne, d'où la production de celle-ci par *TX* pour détoxifier le milieu de culture (Huang *et al.*, 2016). Une alkylperoxydase (AhpD) est présente uniquement en présence de LK chez *TX*, cette enzyme aurait un rôle dans le métabolisme de l'acide protocatéchique (Ito *et al.*, 2006). Enfin, la 3-Oxoacyl-[Acyl-carrier-portein] réductase, (uniquement exprimée en présence de PB chez *TX*), est identifiée comme une enzyme capable de détoxifier les composés furfurals, qui sont issus de la dégradation des hémicelluloses et sont inhibiteurs de la croissance bactérienne (Allen *et al.*, 2010; Mathews *et al.*, 2019). Ainsi, notre approche permet de mettre en évidence l'expression de nombreuses oxydoréductases en présence de substrats lignifiés de teneurs variables en lignines. Ces enzymes pourraient être impliquées soit dans le métabolisme des molécules aromatiques soit pour lutter contre le stress soit lors de procédés de détoxification de molécules aromatiques.

Il est aussi important de préciser que de nombreux transporteurs (19, 16 et 21 protéines IC et EC pour la PB, PBEV et la LK respectivement) dont des transporteurs de type ABC sont sur-exprimés par *TX* en présence de substrats lignifiés (les plus exprimés sont TXYL_03945 et TXYL_09615 au niveau EC et TXYL_05395 et TXYL_15045 au niveau IC). Dans la littérature, ces protéines transporteurs ABC ont aussi été retrouvées sur-exprimées en présence de lignine et de ces dérivés (Brown *et al.*, 2011; DeAngelis *et al.*, 2013; Raut *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Ces résultats peuvent être mis en lien avec les mécanismes d'absorption des composés aromatiques à travers la membrane des bactéries qui se font souvent par des transporteurs actifs. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la capacité de ces transporteurs ABC, à transporter à travers la membrane divers composés aromatiques, notamment les acides *p*-hydroxybenzoique, gallique, vanillique, syringique, *p*-coumarique, protocatéchique, férulique et di-férulique (Giuliani *et al.*, 2011; MacLean *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013; Salmon *et al.*, 2013; Vermaas *et al.*, 2019).

Plusieurs oxydoreductases ont été ainsi identifiées par analyse protéomique. Parmi ces enzymes, les deux enzymes les plus fortement exprimées tous substrats lignifiés confondus sont une enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] et une catalase-peroxydase. Nous avons choisi de caractériser cette dernière du fait de ses implications connues dans le catabolisme des lignines des peroxydases. Les catalase/peroxydases sont des enzymes bifonctionnelles. Leur classification enzymatique n'est pas claire car, outre leur activité catalase (EC 1.11.1.6), elles présentent une activité peroxydase similaire à celle des peroxydases classiques (EC 1.11.1.7). Actuellement 544 catalase/peroxydase sont répertoriées dans RedoxiBase (http://peroxibase.toulouse.inra.fr/home; consulté le 16/01/20) dont 339 bactériennes. Ces enzymes oxydent les substrats artificiels typiques de la peroxydase (tels que la o-dianisidine, le gaïacol, l'ABTS ou le pyrogallol) et possèdent une activité catalasique (plus faible par rapport aux activités catalases typiques) (Bernroitner *et al.*, 2009). Ces catalase-peroxydases sont physiologiquement actives principalement en tant que catalases avec un rôle protecteur contre l'H_2O_2 mais leur fonctionnalité peroxydase *in vivo* reste inconnue (Bernroitner *et al.*, 2009). De plus, il a été signalé que ces enzymes ont également des activités d'halogénation et des activités de NADH oxydase (Jakopitsch *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004).

La catalase/peroxydase (Tx-3231) a été exprimée et produite avec succès. La caractérisation a permis de déterminer des températures optimales des activités catalase et peroxydase de 30 et 55°C, et des pH optimaux de 8 et 7 respectivement. Sachant que *TX* est une bactérie thermophile qui possède une croissance optimale à température élevée et à pH neutre,

ces premiers résultats de caractérisation suggèrent que l'activité peroxydase serait prépondérante dans les conditions physiologiques optimales de la bactérie. Plusieurs peroxydases sont annotées dans le génome de *TX*. Seules deux enzymes IC sont sur-exprimées en présence de substrats lignifiés. Cette catalase/peroxydase possède un niveau d'expression élevé. Il est donc possible qu'elle participe aux activités phénol-oxydases (majoritairement peroxydase) détectées chez *TX*.

Récemment, une catalase/peroxydase de *Sphingobacterium* sp. a été produite et caractérisée, cette protéine de 86 kDa est active en présence d'H_2O_2 et d'ABTS ou de guaïacol, ainsi qu'en présence de plusieurs colorants. Cependant, cette enzyme recombinante n'a montré aucune réaction détectable sur la paille de blé et la lignine kraft. Les auteurs ont conclu que cette enzyme ne serait pas responsable de l'activité d'oxydation de la lignine chez *Sphingobacterium* sp. (Rashid *et al.*, 2015). En revanche, une catalase/peroxydase avec une température optimale de 75°C a été caractérisée chez *Amycolatopsis* sp. 75iv2 et cette enzyme a permis la dégradation d'un dimère de lignine (guaiacylglycerol-β-guaiacol ether) (Brown *et al.*, 2011).

Enfin, plusieurs autres études mettent en avant l'implication possible de catalase/peroxydase dans des activités peroxydases en présence de substrats lignifiés. *Pandoraea* sp. B-6, *Ensifer adhaerens* et *Bacillus* sp. des bactéries ligninolytiques, sont capables de croître sur LK, avec des activités peroxydases et dont la seule peroxydase identifiée dans leurs génomes est une catalase/peroxydase. Les auteurs suggèrent que ces catalases/peroxydases seraient responsables des activités peroxydases détectées en présence de LK (Liu *et al.*, 2019b; A., Falade *et al.*, 2019a; Falade *et al.*, 2019b).

Discussion générale et perspective

Le principal objectif de la thèse était d'explorer le potentiel ligninolytique de *Thermobacillus xylanilyticus*, une bactérie connue pour son activité hémicellulolytique importante. Plusieurs applications sont visées comme l'identification du mode de fonctionnement de *T. xylanilyticus* en présence de substrats lignifiés (capacités métaboliques de la bactérie) mais également l'identification des biocatalyseurs efficaces (oxydoréductases ou hémicellulases) qui pourraient être importants lors de l'utilisation et le fractionnement de ces substrats lignifiés. Plusieurs approches ont été mises en œuvre afin d'identifier les verrous pour l'utilisation ou le fractionnement des substrats lignifiés par cette bactérie : 1) croissance bactérienne en présence de différents substrats lignifiés ayant des compositions et teneurs variables en lignines (PB, PBEV et LK); 2) dosages d'activités phénol-oxydases et xylanases dans les différents compartiments cellulaires ; 3) identification des protéines ainsi que des molécules aromatiques produites durant la croissance ; 4) l'impact de la croissance bactérienne sur les résidus lignifiés. L'ensemble de ces approches nous a permis d'apporter des éléments de compréhension sur le comportement et le métabolisme de *TX* en présence de différents substrats lignifiés, ainsi que l'identification de protéines qui sont potentiellement impliquées dans la ligninolyse ou le métabolisme des composés aromatiques, permettant notamment la détoxification du milieu de culture.

Concernant la croissance, *TX* est capable d'utiliser les différents substrats lignifiés PB, LK et PBEV comme unique source de C. Cette croissance est toujours précédée par un temps de latence de durée plus ou moins important. Des protéines et des activités enzymatiques sont produites dès le début de la croissance en quantité et avec une séquence de production variables en fonction des substrats. Ceci suggère une adaptation de la bactérie aux différentes biomasses ainsi qu'aux molécules potentiellement inhibitrices présentes dans ces milieux qui pourraient être issues du prétraitement (cas du PBEV) ou issues de l'autoclavage du milieu de culture (cas des trois substrats). En effet des molécules aromatiques sont détectées dans le milieu de culture après autoclavage (milieu témoin) et une baisse d'un certain nombre de ces molécules est observée après croissance microbienne. Nous avons observé la consommation de molécules aromatiques comme la vanilline et le *p*-hydroxybenzaldhéyde sur l'ensemble des substrats. En même temps, nous avons observé la production d'acide vanillique en présence de PBEV et LK qui est probablement liée au métabolisme intracellulaire des molécules aromatiques. *TX* semble donc utiliser ces molécules, par contre nous ne pouvons pas déterminer à quel moment puisque le dosage des molécules phénoliques n'a été effectué qu'en fin de croissance. L'analyse protéomique, montrant un grand nombre d'oxydoréductases potentiellement reliées au

métabolisme des composés aromatiques (manganèse superoxyde dismutase, glutathionne peroxydase, NADH peroxyredoxine réductase, des copper amine oxydases et des ferredoxines oxydoréductases) sur-exprimées uniquement sur l'ensemble des substrats lignifiés, semble indiquer la capacité de *TX* à lutter contre le stress et détoxifier les milieux de culture contenant ces molécules aromatiques. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes moléculaires mis en œuvre par la bactérie pour s'adapter au milieu de culture (contenant des lignines et de molécules aromatiques) pendant la phase de latence et lors de la croissance. Ceci permettrait de valider sa capacité de détoxification ou non. Une première approche pour vérifier ces hypothèses serait de confirmer l'aptitude de *TX* à utiliser réellement les molécules aromatiques (en présence de monomères aromatiques), mais aussi d'autres types d'inhibiteurs de fermentation.

Un point clé de la thèse est la compréhension du mode de fonctionnement de cette bactérie en présence de substrats lignifiés et sa capacité à transformer les lignines et à produire des molécules aromatiques tout en produisant des activités d'intérêt. Concernant la production d'activités phénol-oxydases (POX), elles sont détectées tout au long des différentes cultures microbiennes, mais l'intensité de leurs activités reste faible. Par contre, la bactérie semble développer des stratégies différentes selon la biomasse. En présence de PBEV et PB, les activités POX EC sont produites en début de croissance puis elles diminuent alors que les activités IC augmentent. Sur LK, les activités produites sont essentiellement intracellulaires. On peut suggérer qu'en présence de PB et PBEV les activités POX EC induites permettraient de dépolymériser la lignine en molécules aromatiques, ces dernières seront internalisées et induiraient une production de POX IC. Sur LK, sa richesse en molécules aromatiques entraine directement l'activation rapide d'activités POX IC qui pourraient être impliquées dans le métabolisme intracellulaire. Cette production de POX s'accompagne d'une coproduction d'activités xylanases EC et une baisse importante de sucres dans les substrats, confirmée par la composition chimique de substrats et la modification importante des bandes d'absorption des polysaccharides en IRTF. Ceci n'est pas surprenant puisque la bactérie est hémicellulolytique. Elle utilise donc le xylane mais également les hémicelluloses incluses dans la biomasse quand celle-ci est accessible (paille de blé), grâce aux activités hémicellulasiques qu'elle produit. Concernant les variations de molécules phénoliques, bien qu'une dynamique de production d'activité POX ait été mise en évidence, nous n'avons pas pu faire un lien direct entre la présence de ces activités et la présence de molécules aromatiques dans le milieu pour plusieurs raisons :

-les activités POX détectées sont faibles, ce qui pourrait induire de faibles modifications sur les lignines complexes.

-plusieurs hémicellulases peuvent être coproduites par TX avec les xylanases, en particulier des estérases (dont plusieurs ont été identifiées par analyse protéomique) ; ces enzymes peuvent également libérer des molécules phénoliques comme les acides férulique, *p*-coumarique et diféruliques, comme observée après culture sur paille de blé

-la bactérie pourrait avoir consommé un certain nombre de molécules aromatiques ce qui ne permet pas d'évaluer la part des molécules libérées lors d'un fractionnement éventuel.

-la caractérisation des substrats n'a pas permis non plus d'identifier des modifications majeures dans les structures des lignines. Les activités POX mesurées étant faibles, les modifications des lignines sont probablement peu visibles.

Dans tous les cas, nous avons observé la libération de molécules phénoliques (acides férulique, *p*-coumarique, *p*-hydroxybenzoïque et vanillique) variable en fonction des substrats. Cette production est probablement liée à l'arsenal enzymatique produite par *TX* lors de la croissance (des hémicellulases comme des estérases, mais également des oxydoréductases liées au métabolisme intracellulaire des molécules aromatiques). Bien que les concentrations produites restent faibles, la capacité de bioproduction de molécules aromatiques de cette bactérie serait intéressante à explorer.

Une poursuite de la compréhension du fonctionnement de *TX* en présence de substrats lignifiés semble également importante afin d'identifier les applications potentielles de cette bactérie. Dans un premier temps il est important de se poser des questions sur la manière de préparer les biomasses dans les milieux de culture. L'autoclavage libérant déjà des molécules aromatiques pouvant être directement utilisées par la bactérie, d'autres moyens de stérilisation des substrats comme l'irradiation seraient peut-être plus judicieux. Ces méthodes permettraient de ne pas libérer directement des molécules phénoliques dans le milieu et d'évaluer correctement l'effet de la bactérie sur les polymères de lignines et substrats lignifiés. Pour pouvoir identifier correctement les modifications des substrats, des quantités de culture plus importantes mais également des cultures plus longues seraient nécessaires car il a été démontré que le catabolisme des composés aromatiques et des lignines chez les bactéries est plus important bien après la fin de la phase exponentielle de croissance. Ceci pourrait entrainer une augmentation des niveaux d'activités produites, des modifications sur les substrats et des molécules aromatiques libérées. Dans ce cas, il faudrait aussi limiter la sporulation de la bactérie par la complémentation avec d'autres sources de carbone complexes riches en hémicellulose (son de blé ou paille de blé) qui sont aussi connues pour induire la production d'enzymes chez *TX*. Dans tous les cas, l'utilisation de substrats marqués (par exemple au ^{13}C) permettrait à la fois de montrer le catabolisme des

lignines et des substrats lignifiés, en suivant leurs minéralisations et les modifications des résidus. De plus, cette approche faciliterait l'analyse RMN-2D des substrats lignifiés. L'évaluation des activités phénol-oxydases devrait s'accompagner d'une évaluation plus complète des activités hémicellulases (activités débranchantes comme les estérases) afin de mettre en évidence les synergies enzymatiques mises en œuvre par la bactérie lors de l'utilisation des substrats lignifiés et la libération des acides phénoliques pariétaux de la paille de blé.

Enfin, une autre perspective de cette étude est l'identification d'enzymes efficaces de fractionnement des lignines et des lignocelluloses. Bien que les activités phénol-oxydases produites par la bactérie soient faibles, les approches que nous avons utilisées (particulièrement l'approche protéomique) ont permis d'identifier des enzymes (hémicellulases et oxydoréductases) dont les niveaux d'expression suggèrent une implication dans l'utilisation des substrats lignifiés. Parmi les hémicellulases, nous avons identifié des estérases (féruloyl estérases) spécifiques des substrats lignifiés. Concernant les oxydoréductases, bien que dans le génome de *TX* plusieurs laccases putatives (multicopper oxidase) aient été identifiées, aucune d'entre elles n'a été détectée en protéomique sur les différents substrats. Ceci peut expliquer l'absence d'activité laccase dans les milieux de culture. Aucune activité lignine peroxydase n'a été identifiée dans le génome de *TX*, cependant nous avons détecté des activités peroxydases majoritairement présentes aussi bien dans les compartiments IC que EC. Nous avons identifié de nombreuses peroxydases (dont une catalase peroxydase thermoactive) ainsi que plusieurs oxydoréductases IC qui pourraient être impliquées dans ces activités. Concernant l'approche que nous avons développée, les résultats sont similaires à des données omiques obtenues chez de nombreuses bactéries identifiées comme ligninolytiques dans la littérature. Ceci souligne l'intérêt d'approfondir le fonctionnement de *TX* en présence de substrats aromatiques et d'exploiter la diversité des oxydoréductases (IC ou EC). La caractérisation de ces enzymes permettrait de préciser leur rôle dans le métabolisme et le fractionnement des lignines ainsi que la libération de molécules aromatiques par le biais d'études de synergie enzymatique. Une autre approche intéressante serait d'appliquer directement des cocktails enzymatiques adaptés issus de cultures de *TX* en présence de différents substrats. Dans ce cas, une amélioration de la production d'enzymes et particulièrement l'induction des activités ligninolytiques par la bactérie serait au préalable nécessaire. Dans tous les cas, la mise en place de différentes approches analytiques (analyse des monomères ou oligomères phénoliques dans les milieux réactionnels (LC/MS-MS)), la composition des substrats ainsi que leurs structures et leurs tailles (SEC, RMN,…) sont indispensables afin d'identifier les verrous sur le fractionnement enzymatique des lignines et des substrats lignifiés.

Bibliographie

Abadulla, E., Robra, K.H., Gübitz, G.M., Silva, L.M. and Cavaco-Paulo, A. (2000) Enzymatic Decolorization of Textile Dyeing Effluents. *Text. Res. J.*, **70**, 409–414.

Abd-elsalam, H.E. and El-hanafy, A.A. (2009) Lignin Biodegradation with Ligninolytic Bacterial Strain and Comparison of Bacillus subtilis and Bacillus sp . Isolated from Egyptian Soil. , **5**, 39–44.

Abdelaziz, O.Y., Brink, D.P., Prothmann, J., et al. (2016) Biological valorization of low molecular weight lignin. *Biotechnol. Adv.*, **34**, 1318–1346.

Abdelaziz, O.Y. and Hulteberg, C.P. (2017) Physicochemical Characterisation of Technical Lignins for Their Potential Valorisation. *Waste and Biomass Valorization*, **8**, 859–869.

Abe, T., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2005) A tetrahydrofolate-dependent O-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **187**, 2030–2037.

Achterholt, S., Priefert, H. and Steinbüchel, A. (2000) Identification of Amycolatopsis sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 799–807.

Adapa, P.K., Schonenau, L.G., Canam, T. and Dumonceaux, T. (2011) Quantitative Analysis of Lignocellulosic Components of Non-Treated and Steam Exploded Barley, Canola, Oat and Wheat Straw Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Sci. Technol.*, **1**, 177–188.

Adav, S.S., Ng, C.S., Arulmani, M. and Sze, S.K. (2010) Quantitative iTRAQ secretome analysis of cellulolytic thermobifida fusca. *J. Proteome Res.*, **9**, 3016–3024.

ADEME (2017) *Biomasse énergie et produits biosourcés*,.

Aemprapat, S. and Williams, P.A. (1998) Implications of the xylQ gene of TOL plasmid pWl02 for the evolution of aromatic catabolic pathways. , **144**, 1387–1396.

Agarwal, U.P. (2006) Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: Distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (Picea mariana). *Planta*, **224**, 1141–1153.

Ahmad, M., Roberts, J.N., Hardiman, E.M., Singh, R., Eltis, L.D. and Bugg, T.D.H. (2011) Identification of DypB from rhodococcus jostii RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry*, **50**, 5096–5107.

Ahmad, M., Taylor, C.R., Pink, D., Burton, K., Eastwood, D., Bending, G.D. and Bugg, T.D.H. (2010) Development of novel assays for lignin degradation: Comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Mol. Biosyst.*, **6**, 815–821.

Akin, D. (2008) Plant cell wall aromatics: infl uence on degradation of biomass. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **2**, 288–303.

Akinosho, H.O., Yoo, C.G., Dumitrache, A., Natzke, J., Muchero, W., Brown, S.D. and Ragauskas, A.J. (2017) Elucidating the Structural Changes to Populus Lignin during Consolidated Bioprocessing with Clostridium thermocellum. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **5**, 7486–7491.

Aldrich, T.L., Frantz, B., Gill, J.F., Kilbane, J.J. and Chakrabarty, A.M. (1987) Cloning and complete

nucleotide sequence determination of the catB gene encoding m,m-muconate lactonizing enzyme. *Gene*, **52**, 185–195.

Alessi, A.M., Bird, S.M., Bennett, J.P., et al. (2017) Revealing the insoluble metasecretome of lignocellulose-degrading microbial communities. *Sci. Rep.*, **7**, 1–10.

Alessi, A.M., Bird, S.M., Oates, N.C., et al. (2018) Defining functional diversity for lignocellulose degradation in a microbial community using multi-omics studies. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 1–16.

Alkahem Albalawi, T.H., Rhoads, D.D. and Barabotea, R.D. (2017) Draft Genome Sequence of Anoxybacillus sp. Strain UARK-01, a New Thermophilic Lignin-Utilizing Bacterium Isolated from Soil in Arkansas, USA. , **5**, 1–2.

Allen, S.A., Clark, W., McCaffery, J.M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P.J., Liu, Z.L. and Gorsich, S.W. (2010) Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnol. Biofuels*, **3**, 1–10.

Allison, S.D. (2006) Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: Implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry*, **81**, 361–373.

Alvira, P., Negro, M.J., Ballesteros, I., González, A. and Ballesteros, M. (2016) Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production. *Bioethanol*, **2**, 66–75.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, **101**, 4851–4861.

Ander, P. and Eriksson, K.E. (1976) The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum. *Arch. Microbiol.*, **109**, 1–8.

Anderson, E.M., Stone, M.L., Katahira, R., Reed, M., Beckham, G.T. and Román-Leshkov, Y. (2017) Flowthrough Reductive Catalytic Fractionation of Biomass. *Joule*, **1**, 613–622.

Antonopoulos, V.T., Hernandez, M., Arias, M.E., Mavrakos, E. and Ball, A.S. (2001) The use of extracellular enzymes from Streptomyces albus ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 92–97.

Araki, T., Umeda, S., Kamimura, N., et al. (2019) Regulation of vanillate and syringate catabolism by a MarR-type transcriptional regulator DesR in Sphingobium sp. SYK-6. *Sci. Rep.*, **9**, 18036.

Arias, M.E., Blánquez, A., Hernández, M., Rodríguez, J., Ball, A.S., Jiménez-Morillo, N.T., González-Vila, F.J. and González-Pérez, J.A. (2016) Role of a thermostable laccase produced by Streptomyces ipomoeae in the degradation of wheat straw lignin in solid state fermentation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **122**, 202–208.

Armstrong, Z., Mewis, K., Strachan, C. and Hallam, S.J. (2015) Biocatalysts for biomass deconstruction from environmental genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **29**, 18–25.

Arora, P.K., Srivastava, A. and Singh, V.P. (2014) Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives. *J. Hazard. Mater.*, **266**, 42–59.

Asina, F., Brzonova, I., Voeller, K., Kozliak, E., Kubátová, A., Yao, B. and Ji, Y. (2016) Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. *Bioresour. Technol.*, **220**, 414–424.

Asina, F.N.U., Brzonova, I., Kozliak, E., Kubátová, A. and Ji, Y. (2017) Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **77**, 1179–1205.

Aston, J.E., Apel, W.A., Lee, B.D., Thompson, D.N., Lacey, J.A., Newby, D.T., Reed, D.W. and Thompson, V.S. (2016) Degradation of phenolic compounds by the lignocellulose deconstructing thermoacidophilic bacterium Alicyclobacillus Acidocaldarius. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 13–23.

Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B. and Paës, G. (2017) Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol. Biofuels*, **10**, 1–16.

Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C. and Horecker, B.L. (1962) The D-galactose oxidase of Polyporus circinatus. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2736–2743.

Azadi, P., Inderwildi, O.R., Farnood, R. and King, D.A. (2013) Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **21**, 506–523.

Bach, C.E., Warnock, D.D., Horn, D.J. Van, Weintraub, M.N., Sinsabaugh, R.L., Allison, S.D. and German, D.P. (2013) Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, l-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type. *Soil Biol. Biochem.*, **67**, 183–191.

Balakshin, M., Capanema, E., Gracz, H., Chang, H. min and Jameel, H. (2011) Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta*, **233**, 1097–1110.

Baldrian, P. (2006) Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 215–242.

Ball, A.S., Betts, W.B. and McCarthy, A.J. (1989) Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1642–4.

Ball, A.S., Godden, B., Helvenstein, P., Penninckx, M.J. and McCarthy, A.J. (1990) Lignocarbohydrate solubilization from straw by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3017–3022.

Ball, A.S. and Mccarthy, A.J. (1988) Sacchariiication of Straw by Actinomycete Enzymes. *Microbiology*, **134**, 2139–2147.

Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P. and Ballesteros, M. (2006) Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Twenty-Seventh Symp. Biotechnol. Fuels Chem.*, **129**, 496–508.

Bandounas, L., Pinkse, M., Winde, J.H. De and Ruijssenaars, H.J. (2013) Identification of a quinone dehydrogenase from a Bacillus sp. involved in the decolourization of the lignin-model dye, Azure B. *N. Biotechnol.*, **30**, 196–204.

Bandounas, L., Wierckx, N.J.P., Winde, J.H. de and Ruijssenaars, H.J. (2011) Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol.*, **11**, 94.

Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. and Hammel, K.E. (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.*, **354**, 297–300.

Barnhart-Dailey, M.C., Ye, D., Hayes, D.C., Maes, D., Simoes, C.T., Appelhans, L., Carroll-Portillo, A., Kent, M.S. and Timlin, J.A. (2019) Internalization and accumulation of model lignin breakdown products in bacteria and fungi. *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 1–19.

Barry, K.P. and Taylor, E.A. (2013) Characterizing the promiscuity of LigAB, a lignin catabolite degrading extradiol dioxygenase from Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *Biochemistry*, **52**, 6724–6736.

Barton, N., Horbal, L., Starck, S., Kohlstedt, M., Luzhetskyy, A. and Wittmann, C. (2018) Enabling the valorization of guaiacol-based lignin: Integrated chemical and biochemical production of cis,cis-muconic acid using metabolically engineered Amycolatopsis sp ATCC 39116. *Metab. Eng.*, **45**, 200–210.

Beaugrand, J., Chambat, G., Wong, V.W.K., et al. (2004a) Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans. *Carbohydr. Res.*, **339**, 2529–2540.

Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P. and Chabbert, B. (2004b) Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7108–7117.

Becker, J., Kuhl, M., Kohlstedt, M., Starck, S. and Wittmann, C. (2018) Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for the production of cis, cis-muconic acid from lignin. *Microb. Cell Fact.*, **17**, 1–14.

Becker, J. and Wittmann, C. (2019) A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. *Biotechnol. Adv.*

Beckham, G.T., Johnson, C.W., Karp, E.M., Salvachúa, D. and Vardon, D.R. (2016) Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **42**, 40–53.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 326–338.

Bekiaris, G., Lindedam, J., Peltre, C., Decker, S.R., Turner, G.B., Magid, J. and Bruun, S. (2015) Rapid estimation of sugar release from winter wheat straw during bioethanol production using FTIR-photoacoustic spectroscopy. *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 1–12.

Belmokhtar, N., Habrant, A., Lopes Ferreira, N. and Chabbert, B. (2013) Changes in Phenolics Distribution After Chemical Pretreatment and Enzymatic Conversion of Miscanthus × giganteus Internode. *Bioenergy Res.*, **6**, 506–518.

Benamrouche, S., Croônier, D., Debeire, P. and Chabbert, B. (2002) A chemical and histological study on the effect of (1 → 4)-β-endo-xylanase treatment on wheat bran. *J. Cereal Sci.*, **36**, 253–260.

Bento-Silva, A., Vaz Patto, M.C. and Rosário Bronze, M. do (2018) Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chem.*, **246**, 360–378.

Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M., Kilburn, D. and Saddler, J. (2005) Weak Lignin-Binding Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **121**, 163–170.

Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Peschek, G.A. and Obinger, C. (2009) Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.*, **60**, 423–440.

Bhowmick, G. De, Sarmah, A.K. and Sen, R. (2018) Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresour. Technol.*, **247**, 1144–1154.

Billings, A.F., Fortney, J.L., Hazen, T.C., et al. (2015) Genome sequence and description of the anaerobic lignin-degrading bacterium Tolumonas lignolytica sp. nov. *Stand. Genomic Sci.*, **10**, 1–11.

Bloois, E. Van, Torres Pazmiño, D.E., Winter, R.T. and Fraaije, M.W. (2010) A robust and extracellular heme-containing peroxidase from Thermobifida fusca as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **86**, 1419–1430.

Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 519–546.

Boukari, I., O'Donohue, M., Rémond, C. and Chabbert, B. (2011) Probing a family GH11 endo-β-1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **72**, 130–138.

Boukari, I., Putaux, J.L., Cathala, B., Barakat, A., Saake, B., Rémond, C., O'Donohue, M. and Chabbert, B. (2009) In vitro model assemblies to study the impact of lignin-carbohydrate interactions on the enzymatic conversion of xylan. *Biomacromolecules*, **10**, 2489–2498.

Bourbonnais, R. and Paice, M.G. (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by Trametes versicolor laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 823–827.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P. and Yaguchi, M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1876–1880.

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. , **254**, 248–254.

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P. and Welton, T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.*, **15**, 550–583.

Brissos, V., Tavares, D., Sousa, A.C., Robalo, M.P. and Martins, L.O. (2017) Engineering a Bacterial DyP-Type Peroxidase for Enhanced Oxidation of Lignin-Related Phenolics at Alkaline pH. *ACS Catal.*, **7**, 3454–3465.

Broeker, J., Mechelke, M., Baudrexl, M., Mennerich, D., Hornburg, D., Mann, M., Schwarz, W.H., Liebl, W. and Zverlov, V. V. (2018) The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium Clostridium stercorarium: Comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 1–18.

Brown, M.E., Barros, T. and Chang, M.C.Y. (2012) Identification and Characterization of a Multifunctional Dye Peroxidase from a Lignin-Reactive Bacterium. *ACS Chem. Biol.*, **7**, 2074–2081.

Brown, M.E. and Chang, M.C.Y. (2014) Exploring bacterial lignin degradation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 19:1–7.

Brown, M.E., Walker, M.C., Nakashige, T.G., Iavarone, A.T. and Chang, M.C.Y. (2011) Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: Application to microbial lignin degradation. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 18006–18009.

Bruijnincx, P.C.A., Rinaldi, R. and Weckhuysen, B.M. (2015) Unlocking the potential of a sleeping giant: lignins as sustainable raw materials for renewable fuels, chemicals and materials. *Green Chem.*, **17**, 4860–

4861.

Brzonova, I., Kozliak, E., Kubátová, A., Chebeir, M., Qin, W., Christopher, L. and Ji, Y. (2014) Kenaf biomass biodecomposition by basidiomycetes and actinobacteria in submerged fermentation for production of carbohydrates and phenolic compounds. *Bioresour. Technol.*, **173**, 352–360.

Buchan, A., Collier, L.S., Neidle, E.L. and Moran, M.A. (2000) Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine Roseobacter lineage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4662–4672.

Bugg, Timothy, Ahmad, M., Hardiman, E.M. and Rahmanpour, R. (2011a) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 1883–1896.

Bugg, T, Ahmad, M., Hardiman, E. and Singh, R. (2011b) The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 394–400.

Bunzel, M., Heuermann, B., Kim, H. and Ralph, J. (2008) Peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid esters. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10368–10375.

Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P. and Steinhart, H. (2006) Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6409–6418.

Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C. and Steinhart, H. (2005) Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 5845–5850.

Busse-Wicher, M., Gomes, T.C.F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N.J., Bolam, D.N., Skaf, M.S. and Dupree, P. (2014) The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **79**, 492–506.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á.T., Romero, J., Gutiérrez, A. and Río, J.C. del (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.*, **40**, 1264–1271.

Camarero, S., Martinez, M.J. and Martinéz, Á.T. (2014) Understanding lignin biodegradation for the improved utilization of plant biomass in mod ern biorefi neries. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **8**, 615–625.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. and Martínez, Á.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10324–10330.

Cao, L., Yu, I.K.M., Liu, Y., Ruan, X., Tsang, D.C.W., Hunt, A.J., Ok, Y.S., Song, H. and Zhang, S. (2018) Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. *Bioresour. Technol.*, **269**, 465–475.

Carbona, S. La, Sauvageot, N., Giard, J.C., Benachour, A., Posteraro, B., Auffray, Y., Sanguinetti, M. and Hartke, A. (2007) Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of Enterococcus faecalis. *Mol. Microbiol.*, **66**, 1148–1163.

Casciello, C., Tonin, F., Berini, F., Fasoli, E., Marinelli, F., Pollegioni, L. and Rosini, E. (2017) A valuable peroxidase activity from the novel species Nonomuraea gerenzanensis growing on alkali lignin. *Biotechnol. Reports*, **13**, 49–57.

Ceballos, S.J., Yu, C., Claypool, J.T., Singer, S.W., Simmons, B.A., Thelen, M.P., Simmons, C.W. and VanderGheynst, J.S. (2017) Development and characterization of a thermophilic, lignin degrading microbiota. *Process Biochem.*, **63**, 193–203.

Cerdan, P., Wasserfallen, A., Rekik, M., Timmis, K.N. and Harayama, S. (1994) Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of pseudomonas putida and its relationship to cell growth. *J. Bacteriol.*, **176**, 6074–6081.

Chai, L.Y., Chen, Y.H., Tang, C.J., Yang, Z.H., Zheng, Y. and Shi, Y. (2014) Depolymerization and decolorization of kraft lignin by bacterium Comamonas sp. B-9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 1907–1912.

Chakar, F.S. and Ragauskas, A.J. (2004) Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Ind. Crops Prod.*, **20**, 131–141.

Chan, J.C., Paice, M.G. and Zhang, X. (2019) Enzymatic oxidation of lignin: challenges and barriers toward practical applications. *ChemCatChem*.

Chandel, A.K., Garlapati, V.K., Singh, A.K., Antunes, F.A.F. and Silva, S.S. da (2018) The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresour. Technol.*, **264**, 370–381.

Chandra, R., Raj, A., Purohit, H.J. and Kapley, A. (2007) Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste. *Chemosphere*, **67**, 839–846.

Chang, Y.C., Choi, D.B., Takamizawa, K. and Kikuchi, S. (2014) Isolation of Bacillus sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresour. Technol.*, **152**, 429–436.

Chávez, R., Bull, P. and Eyzaguirre, J. (2006) The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. *J. Biotechnol.*, **123**, 413–433.

Chen, C., Shrestha, R., Jia, K., Gao, P.F., Geisbrecht, B. V., Bossmann, S.H., Shi, J. and Li, P. (2015) Characterization of dye-decolorizing peroxidase (DyP) from Thermomonospora curvata reveals unique catalytic properties of A-type DyPs. *J. Biol. Chem.*, **290**, 23447–23463.

Chen, C.L., Potthast, A., Rosenau, T., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G., Nagai, D. and Miyakoshi, T. (2000) Laccase-catalyzed oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propene using ABTS as mediator. *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, **8**, 213–219.

Chen, G.Q. and Wu, Q. (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, **26**, 6565–6578.

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H. and Han, S. (2017) A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process. Technol.*, **160**, 196–206.

Chen, Y.H., Chai, L.Y., Zhu, Y.H., Yang, Z.H., Zheng, Y. and Zhang, H. (2012a) Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain Comamonas sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. *J. Appl. Microbiol.*, **112**, 900–906.

Chen, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zheng, Y., Shi, Y. and Zhang, H. (2012b) Kraft lignin biodegradation

by Novosphingobium sp. B-7 and analysis of the degradation process. *Bioresour. Technol.*, **123**, 682–685.

Chen, Z. and Wan, C. (2017) Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **73**, 610–621.

Cherubini, F. (2010) The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.*, **51**, 1412–1421.

Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P. and Cherchi, F. (2012) Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, **46**, 25–35.

Chio, C., Sain, M. and Qin, W. (2019) Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **107**, 232–249.

Christopher, L.P., Yao, B. and Ji, Y. (2014) Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front. Energy Res.*, **2**, 1–13.

Clark, J.H. (2017) From waste to wealth using green chemistry: The way to long term stability. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **8**, 10–13.

Clark, J.H., Luque, R. and Matharu, A.S. (2012) Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **3**, 183–207.

Clark, T.A. and Mackie, K.L. (1987) Steam explosion of the softwood pinus radiata with sulphur dioxide addition. I. Process optimisation. *J. Wood Chem. Technol.*, **7**, 373–403.

Collins, M.N., Nechifor, M., Tanasă, F., Zănoagă, M., McLoughlin, A., Stróżyk, M.A., Culebras, M. and Teacă, C.A. (2019) Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications – A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **131**, 828–849.

Connerton, I., Cummings, N., Harris, G.W., Debeire, P. and Breton, C. (1999) A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: Evidence for surface aromatic clusters. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1433**, 110–121.

Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 850–861.

Cosgrove, D.J. (2014) Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **22**, 122–131.

Cosgrove, D.J. and Jarvis, M.C. (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.*, **3**, 1–6.

Crawford, D.L. (1978) Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 1041–1045.

Crestini, C., Crucianelli, M., Orlandi, M. and Saladino, R. (2010) Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. *Catal. Today*, **156**, 8–22.

Crestini, C., Melone, F., Sette, M. and Saladino, R. (2011) Milled Wood Lignin: A Linear Oligomer. *Biomacromolecules*, **12**, 3928–3935.

Cui, L., Liu, Z., Si, C., Hui, L., Kang, N. and Zhao, T. (2012) Influence of steam explosion pretreatment on the composition and structure of wheat straw. *BioResources*, **7**, 4202–4213.

D'haeseleer, P., Gladden, J.M., Allgaier, M., et al. (2013) Proteogenomic Analysis of a Thermophilic Bacterial Consortium Adapted to Deconstruct Switchgrass. *PLoS One*, **8**.

Dale, B. (2018) Time to Rethink Cellulosic Biofuels? *Biofuels, Bioprod. Biorefining*.

Daou, M., Piumi, F., Cullen, D., Record, E. and Faulds, C.B. (2016) Heterologous production and characterization of two glyoxal oxidases from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 4867–4875.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A. and Qin, W. (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, **1**, 36–50.

Davis, J.R. and Sello, J.K. (2010) Regulation of genes in Streptomyces bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. , 921–929.

Davis, K.M., Rover, M., Brown, R.C., Bai, X., Wen, Z. and Jarboe, L.R. (2016) Recovery and utilization of lignin monomers as part of the biorefinery approach. *Energies*, **9**, 1–28.

DeAngelis, K.M., Sharma, D., Varney, R., et al. (2013) Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in Enterobacter lignolyticus SCF1. *Front. Microbiol.*, **4**, 1–14.

Debeche, T., Cummings, N., Connerton, I., Debeire, P., Donohue, M.J.O. and Connerton, I.A.N. (2000) Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable α -l-Arabinofuranosidase from Thermobacillus xylanilyticus , *Appl. Environ. Microbiol.*., **4**,26–29.

Debeire-Gosselin, M., Loonis, M., Samin, E. and Debeire, P. (1992) Purification and properties of a 22kDa endoxylanase excreted by a new strain of thermophilic bacillus. *Xylans and Xylanases*, 463–466.

Díaz, E. (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: A paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.*, **7**, 173–180.

Díaz, E., Jiménez, J.I. and Nogales, J. (2013) Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24**, 431–442.

Ding, S., Liu, Y., Zeng, Y., Himmel, M., Baker, J. and Bayer, E. (2012) How does plant cell wall architecture correlate with enzyme digestibility? *Science (80).*, **338**, 1055–60.

Ding, W., Si, M., Zhang, W., Zhang, Y., Chen, C., Zhang, L., Lu, Z., Chen, S. and Shen, X. (2015) Functional characterization of a vanillin dehydrogenase in Corynebacterium glutamicum. *Sci. Rep.*, **5**, 8044.

Domínguez-Robles, J., Sánchez, R., Díaz-Carrasco, P., Espinosa, E., García-Domínguez, M.T. and Rodríguez, A. (2017) Isolation and characterization of lignins from wheat straw: Application as binder in lithium batteries. *Int. J. Biol. Macromol.*, **104**, 909–918.

Draths, K.M. and Frost, J.W. (1994) Environmentally Compatible Synthesis of Adipic Acid from d-Glucose. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 399–400.

Duan, J., Huo, X., Du, W.J., Liang, J.D., Wang, D.Q. and Yang, S.C. (2016) Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated anaerobic bacterial strain, Acetoanaerobium sp. WJDL-Y2. *Lett. Appl. Microbiol.*, **62**, 55–

62.

Dupoiron, S., Lameloise, M.L., Bedu, M., Lewandowski, R., Fargues, C., Allais, F., Teixeira, A.R.S., Rakotoarivonina, H. and Rémond, C. (2018) Recovering ferulic acid from wheat bran enzymatic hydrolysate by a novel and non-thermal process associating weak anion-exchange and electrodialysis. *Sep. Purif. Technol.*, **200**, 75–83.

Dupoiron, S., Lameloise, M.L., Pommet, M., Bennaceur, O., Lewandowski, R., Allais, F., Teixeira, A.R.S., Rémond, C. and Rakotoarivonina, H. (2017) A novel and integrative process: From enzymatic fractionation of wheat bran with a hemicellulasic cocktail to the recovery of ferulic acid by weak anion exchange resin. *Ind. Crops Prod.*, **105**, 148–155.

Duval, A. and Lawoko, M. (2014) Reactive & Functional Polymers A review on lignin-based polymeric , micro- and nano-structured materials. , **85**, 78–96.

Emtiazi, G. and Nahvi, I. (2000) Multi-enzyme production by Cellulomonas sp. grown on wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, **19**, 31–37.

Eronen, P., Österberg, M., Heikkinen, S., Tenkanen, M. and Laine, J. (2011) Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. *Carbohydr. Polym.*, **86**, 1281–1290.

Fackler, K. and Schwanninger, M. (2012) How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 587–599.

Faix, O. and Bottcher, J.H. (1992) The influence of particle size and concentration in transmission and diffuse reflectance spectroscopy of wood. *Holz als Roh- und Werkst.*, **50**, 221–226.

Falade, A., Jaouani, A., Mabinya, L., Okoh, A. and Nwodo, U. (2019a) Exoproduction and molecular characterization of peroxidase from Ensifer adhaerens. *Appl. Sci.*, **9**, 1–15.

Falade, A.O., Mabinya, L. V., Okoh, A.I. and Nwodo, U.U. (2019b) Studies on peroxidase production and detection of Sporotrichum thermophile-like catalase-peroxidase gene in a Bacillus species isolated from Hogsback forest reserve, South Africa. *Heliyon*, **5**.

Falade, A.O., Mabinya, L. V., Okoh, A.I. and Nwodo, U.U. (2019c) Agrowastes utilization by Raoultella ornithinolytica for optimal extracellular peroxidase activity. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **66**, 60–67.

Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L. V. and Okoh, A.I. (2017) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen*, **6**, 1–14.

Fawal, N., Li, Q., Savelli, B., Brette, M., Passaia, G., Fabre, M., Mathé, C. and Dunand, C. (2013) PeroxiBase: A database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 441–444.

Fernandes, A.N., Thomas, L.H., Altaner, C.M., Callow, P., Forsyth, V.T., Apperley, D.C., Kennedy, C.J. and Jarvis, M.C. (2011) Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**.

Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Romero, A., Hammel, K.E., Medrano, F.J. and Martínez, A.T. (2014) Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: Heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 1–23.

Fernández-Rodríguez, J., Erdocia, X., Hernández-Ramos, F., Alriols, M.G. and Labidi, J. (2019) Lignin Separation and Fractionation by Ultrafiltration, *Academic press*

Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C. and Murali, N. (2006) Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy and Fuels*, **20**, 1727–1737.

Ferraz, A. and Durán, N. (1995) Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete Chrysonilia sitophila. *Biodegradation*, **6**, 265–274.

Ferreira-Leitão, V.S., Carvalho, M.E.A. de and Bon, E.P.S. (2007) Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods. *Dye. Pigment.*, **74**, 230–236.

Figueiredo, P., Lintinen, K., Hirvonen, J.T., Kostiainen, M.A. and Santos, H.A. (2018) Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.*, **93**, 233–269.

Floudas, D., Binder, M., Riley, R., et al. (2012) The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science,* **336**, 1715–1719.

Fuchs, G., Boll, M. and Heider, J. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds- From one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 803–816.

Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. and Seeger, M. (2014) Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 4781–4794.

Fukuda, M., Watanabe, S., Yoshida, S., Itoh, H., Itoh, Y., Kamio, Y. and Kaneko, J. (2010) Cell surface xylanases of the glycoside hydrolase family 10 are essential for xylan utilization by Paenibacillus sp. W-61 as generators of xylo-oligosaccharide inducers for the xylanase genes. *J. Bacteriol.*, **192**, 2210–2219.

Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H. and Bunzel, M. (2005) Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry*, **66**, 363–371.

Galbe, M. and Zacchi, G. (2012) Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, **46**, 70–78.

Galkin, M. V. and Samec, J.S.M. (2016) Lignin Valorization through Catalytic Lignocellulose Fractionation: A Fundamental Platform for the Future Biorefinery. *ChemSusChem*, **9**, 1544–1558.

Gall, D.L., Kontur, W.S., Kim, H., Li, Y., Ralph, J., Donohue, T.J. and Noguera, D.R. (2018) In Vitro Enzymatic Depolymerization of Lignin with Release of Syringyl, Guaiacyl, and Tricin Units. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, 1–17.

German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L. and Allison, S.D. (2011) Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 1387–1397.

Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.-M. (1999) Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediat. J.*, **3**, 1–26.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. and Sannia, G. (2010) Laccases: A never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 369–385.

Gierer, J. (1980) Chemical aspects of kraft pulping. *Wood Sci. Technol.*, **14**, 241–266.

Gillet, S., Aguedo, M., Petitjean, L., Morais, A.R.C., Costa Lopes, A.M. Da, Łukasik, R.M. and Anastas, P.T. (2017) Lignin transformations for high value applications: Towards targeted modifications using green chemistry. *Green Chem.*, **19**, 4200–4233.

Giuliani, S.E., Frank, A.M., Corgliano, D.M., Seifert, C., Hauser, L. and Collart, F.R. (2011) Environment sensing and response mediated by ABC transporters. *BMC Genomics*, **12**, 1–14.

Glaser, R. and Venus, J. (2017) Model-based characterisation of growth performance and L-lactic acid production with high optical purity by thermophilic Bacillus coagulans in a lignin-supplemented mixed substrate medium. *N. Biotechnol.*, **37**, 180–193.

Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. and Gold, M.H. (1983) An extracellular H2O2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. , **114**, 1077–1083.

Glenn, K., Gold, H. and Agarose, B. (1985) Purification and Characterization of an Extracellular Mn (ll) -Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium. *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 329–341.

Godden, B., Legon, T., Helvenstein, P. and Penninckx, M. (1989) Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a Streptomyces sp. growing on lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 285–292.

Gonzalo, G. de, Colpa, D.I., Habib, M.H.M. and Fraaije, M.W. (2016) Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J. Biotechnol.*, 236:110–19.

Gosselink, R.J.A., Jong, E. De, Guran, B. and Abächerli, A. (2004) Co-ordination network for lignin - Standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). *Ind. Crops Prod.*, **20**, 121–129.

Granata, A. and Argyropoulos, D.S. (1995) 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a Reagent for the Accurate Determination of the Uncondensed and Condensed Phenolic Moieties in Lignins. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1538–1544.

Grandclément, C., Seyssiecq, I., Piram, A., Wong-Wah-Chung, P., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N. and Doumenq, P. (2017) From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Res.*, **111**, 297–317.

Grethlein, H. (1985) The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Nat. Biotechnol.*, **3**, 155–160.

Grossman, A. and Wilfred, V. (2019) Lignin-based polymers and nanomaterials. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 112–120.

Guan, Z.B., Song, C.M., Zhang, N., Zhou, W., Xu, C.W., Zhou, L.X., Zhao, H., Cai, Y.J. and Liao, X.R. (2014) Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from Bacillus pumilus W3. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **101**, 1–6.

Guillén, F., Martinez, A.T. and Martinez, M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus Pleurotus eryngii. *Eur. J. Biochem.*, **209**, 603–611.

Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C. and Martínez, A.T. (1997) Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus Pleurotus eryngii leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 190–199.

Gutierrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus Pleurotus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1783–1788.

Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M. and Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **27**.

Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresour. Technol.*, **89**, 17–34.

Hammel, K.E. and Cullen, D. (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 349–355.

Hara, H., Masai, E., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2000) The 4-oxalomesaconate hydratase gene, involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway, is essential to vanillate and syringate degradation in Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **182**, 6950–6957.

Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. and Timmis, K.N. (1986) Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product. *J. Bacteriol.*, **167**, 455–461.

Harris, G.W., Pickersgill, R.W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J.P., Breton, C. and Pérez, S. (1997) Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **29**, 77–86.

Have, R. Ten and Teunissen, P.J.M. (2001) Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.*, **101**, 3397–3413.

Hedenström, M., Wiklund-Lindström, S., Öman, T., Lu, F., Gerber, L., Schatz, P., Sundberg, B. and Ralph, J. (2009) Identification of lignin and polysaccharide modifications in populus wood by chemometric analysis of 2D NMR spectra from dissolved cell walls. *Mol. Plant*, **2**, 933–942.

Heikkinen, H., Elder, T., Maaheimo, H., Rovio, S., Rahikainen, J., Kruus, K. and Tamminen, T. (2014) Impact of steam explosion on the wheat straw lignin structure studied by solution-state nuclear magnetic resonance and density functional methods. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10437–10444.

Henriksson, G., Ander, P., Pettersson, B. and Pettersson, G. (1995) Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from Phanerochaete chrysosporium as a wood-degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 790–796.

Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**, 309–316.

Herbaut, M., Zoghlami, A., Habrant, A., Falourd, X., Foucat, L., Chabbert, B. and Paës, G. (2018) Multimodal analysis of pretreated biomass species highlights generic markers of lignocellulose recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 1–17.

Hermosilla, E., Schalchli, H., Mutis, A. and Diez, M.C. (2017) Combined effect of enzyme inducers and nitrate on selective lignin degradation in wheat straw by Ganoderma lobatum. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **24**, 21984–21996.

Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Montiel, M.D., Rodríguez, J., Pérez, M.I., Bocchini, P., Galletti, G.C. and Arias, M.E. (2001) Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry as a useful technique to evaluate the ligninolytic action of streptomycetes on wheat straw. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **58–59**, 539–551.

Higuchi, Y., Aoki, S., Takenami, H., et al. (2018) Bacterial Catabolism of β-Hydroxypropiovanillone and β-Hydroxypropiosyringone Produced in the Reductive Cleavage of Arylglycerol-β-Aryl Ether in Lignin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, 1–21.

Higuchi, Y., Kato, R., Tsubota, K., Kamimura, N., Westwood, N.J. and Masai, E. (2019) Discovery of novel enzyme genes involved in the conversion of an arylglycerol-β-aryl ether metabolite and their use in generating a metabolic pathway for lignin valorization. *Metab. Eng.*, **55**, 258–267.

Himmel, M., Ding, S., Johnson, D., Adney, W., Nimlos, M., Brady, J. and Foust, T. (2007) Biomass Recalcitrance_Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, **316**, 804–7.

Hofrichter, M. (2002) Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.*, **30**, 454–466.

Hooda, R., Bhardwaj, N.K. and Singh, P. (2015) Screening and Identification of Ligninolytic Bacteria for the Treatment of Pulp and Paper Mill Effluent. *Water. Air. Soil Pollut.*, **226**.

Hu, J., Zhang, Q. and Lee, D.J. (2018) Kraft lignin biorefinery: A perspective. *Bioresour. Technol.*, **247**, 1181–1183.

Huang, X.F., Santhanam, N., Badri, D. V., Hunter, W.J., Manter, D.K., Decker, S.R., Vivanco, J.M. and Reardon, K.F. (2013) Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils. *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 1616–1626.

Huang, Y.H., Lin, J.S., Ma, J.C. and Wang, H.H. (2016) Functional characterization of triclosan-resistant enoyl-acyl-carrier protein reductase (fabV) in pseudomonas aeruginosa. *Front. Microbiol.*, **7**, 1–13.

Husson, E., Auxenfans, T., Herbaut, M., Baralle, M., Lambertyn, V., Rakotoarivonina, H., Rémond, C. and Sarazin, C. (2018) Sequential and simultaneous strategies for biorefining of wheat straw using room temperature ionic liquids, xylanases and cellulases. *Bioresour. Technol.*, **251**, 280–287.

Iiyama, K., Lam, T.B.T. and Stone, B. (1990) Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*, **29**, 733–737.

Iiyama, K., Lam Thi Bach Tuyet and Stone, B.A. (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.*, **104**, 315–320.

Iiyama, K. and Wallis, A.F.A. (1988) An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci. Technol.*, **22**, 271–280.

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. and Mann, M. (2005) Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. , 1265–1272.

Isikgor, F.H. and Becer, C.R. (2015) Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, **6**, 4497–4559.

Ito, K., Arai, R., Fusatomi, E., et al. (2006) Crystal structure of the conserved protein TTHA0727 from Thermus thermophilus HB8 at 1.9 Å resolution: A CMD family member distinct from carboxymuconolactone decarboxylase (CMD) and AhpD . *Protein Sci.*, **15**, 1187–1192.

Jackson, C.A., Couger, M.B., Prabhakaran, M., Ramachandriya, K.D., Canaan, P. and Fathepure, B.Z. (2017) Isolation and characterization of Rhizobium sp. strain YS-1r that degrades lignin in plant biomass. *J. Appl. Microbiol.*, **122**, 940–952.

Jakopitsch, C., Regelsberger, G., Furtmüller, P.G., Rüker, F., Peschek, G.A. and Obinger, C. (2001) Catalase-peroxidase from Synechocystis is capable of chlorination and bromination reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 682–687.

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świderska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A. and Paszczyński, A. (2017) Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**, 941–962.

Jing, D. and Wang, J. (2012) Controlling the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from Streptomyces cinnamomensis by medium formulation. *Biotechnol. Biofuels*, **5**, 1–7.

Johnson, C.W., Abraham, P.E., Linger, J.G., Khanna, P., Hettich, R.L. and Beckham, G.T. (2017) Eliminating a global regulator of carbon catabolite repression enhances the conversion of aromatic lignin monomers to muconate in Pseudomonas putida KT2440. *Metab. Eng. Commun.*, **5**, 19–25.

Johnson, C.W. and Beckham, G.T. (2015) Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. *Metab. Eng.*, **28**, 240–247.

Johnson, C.W., Salvachúa, D., Rorrer, N.A., et al. (2019) Innovative Chemicals and Materials from Bacterial Aromatic Catabolic Pathways. *Joule*, **3**, 1523–1537.

Johnson, D.B., Moore, W.E. and Zank, L.C. (1961) The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi*, **44**, 793–789.

Jong, E. de, Berkel, W.J.H.V.A.N., Zwan, R.P.V.A.N.D.E.R. and Bont, J.A.M.D.E. (1992) Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from. *Febs*, **657**, 651–657.

Jönsson, L.J. and Martín, C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.*, **199**, 103–112.

Jørgensen, H., Kristensen, J.B. and Felby, C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **1**, 119–134.

Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, K.B.R. and Olsson, L. (2004) Growth and enzyme production by three Penicillium species on monosaccharides. *J. Biotechnol.*, **109**, 295–299.

Jørgensen, H., Mørkeberg, A., Krogh, K.B.R. and Olsson, L. (2005) Production of cellulases and hemicellulases by three Penicillium species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 42–48.

Jung, D.H., Kim, E.J., Jung, E., Kazlauskas, R.J., Choi, K.Y. and Kim, B.G. (2016) Production of p-

hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by Burkholderia glumae BGR1. *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 1493–1503.

Kai, D., Tan, M.J., Chee, P.L., Chua, Y.K., Yap, Y.L. and Loh, X.J. (2016) Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem.*, **18**, 1175–1200.

Kameshwar, A.K.S. and Qin, W. (2017) Gene expression metadata analysis reveals molecular mechanisms employed by Phanerochaete chrysosporium during lignin degradation and detoxification of plant extractives. *Curr. Genet.*, **63**, 877–894.

Kamimura, N., Sakamoto, S., Mitsuda, N., Masai, E. and Kajita, S. (2019) Advances in microbial lignin degradation and its applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 179–186.

Kamimura, N., Takahashi, K., Mori, K., Araki, T., Fujita, M., Higuchi, Y. and Masai, E. (2017a) Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism. *Environ. Microbiol. Rep.*, **9**, 679–705.

Kamimura, N., Goto, T., Takahashi, K., Kasai, D., Otsuka, Y., Nakamura, M., Katayama, Y., Fukuda, M. and Masai, E. (2017b) A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde. *Sci. Rep.*, **7**, 1–12.

Kamm, B. and Kamm, M. (2004) Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 137–145.

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P. and Angelidaki, I. (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour. Technol.*, **100**, 2562–2568.

Karam, J. and Nicell, J.A. (1999) Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**, 141–153.

Kasai, D., Fujinami, T., Abe, T., Mase, K., Katayama, Y., Fukuda, M. and Masai, E. (2009) Uncovering the protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes. *J. Bacteriol.*, **191**, 6758–6768.

Kasai, D., Masai, E., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2007) Degradation of 3-O-methylgallate in Sphingomonas paucimobilis SYK-6 by pathways involving protocatechuate 4,5-dioxygenase. *FEMS Microbiol. Lett.*, **274**, 323–328.

Kasai, D., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2004) Characterization of the 3-O-methylgallate dioxygenase gene and evidence of multiple 3-O-methylgallate catabolic pathways in Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **186**, 4951–4959.

Kasai, D., Masai, E., Miyauchi, K., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2005) Characterization of the gallate dioxygenase gene: Three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **187**, 5067–5074.

Kerr, T.J., Kerr, R.D. and Benner, R. (1983) Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1201–126.

Kersten, P.J. (1990) Glyoxal oxidase of Phanerochaete chrysosporium: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 2936–2940.

Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K. (1985) The ligninase of Phanerochaete chrysosporium generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2609–2612.

Kidby, D. and Davidson, D. (1973) Ferricyanide Estimation of Sugars in the Nanomole Range. *Anal. Biochem.*, **55**, 321–325.

Kim, H. and Ralph, J. (2014) A gel-state 2D-NMR method for plant cell wall profiling and analysis: A model study with the amorphous cellulose and xylan from ball-milled cotton linters. *RSC Adv.*, **4**, 7549–7560.

Kim, S.J. and Shoda, M. (1999) Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus Geotrichum candidum Dec 1. *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 114–119.

Kirby, R. (2005) Actinomycetes and lignin degradation. *Adv. Appl. Microbiol.*, **58**, 125–168.

Kirk, T.K. and Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. , 465–505.

Kishishita, S., Okajima, T., Kim, M., Yamaguchi, H., Hirota, S., Suzuki, S., Kuroda, S., Tanizawa, K. and Mure, M. (2003) Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: Spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1041–1055.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B. and Ahring, B.K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 10–26.

Kohlstedt, M., Starck, S., Barton, N., et al. (2018) From lignin to nylon: Cascaded chemical and biochemical conversion using metabolically engineered Pseudomonas putida. *Metab. Eng.*, **47**, 279–293.

Kontur, W.S., Olmsted, C.N., Yusko, L.M., et al. (2019) A heterodimeric glutathione S-transferase that stereospecifically breaks lignin's (R)-aryl ether bond reveals the diversity of bacterial -etherases. *J. Biol. Chem.*, **294**, 1877–1890.

Kosa, M. and Ragauskas, A.J. (2012) Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous Rhodococci. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 891–900.

Kosa, M. and Ragauskas, A.J. (2013) Lignin to lipid bioconversion by oleaginous Rhodococci. *Green Chem.*, **15**, 2070–2074.

Kukor, J.J., Olsen, R.H. and Ballou, D.P. (1988) Cloning and expression of the catA and catBC gene clusters from Pseudomonas aeruginosa PAO. *J. Bacteriol.*, **170**, 4458–4465.

Kumar, L., Arantes, V., Chandra, R. and Saddler, J. (2012) The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.*, **103**, 201–208.

Kumar, M., Singh, J., Singh, M.K., Singhal, A. and Thakur, I.S. (2015) Investigating the degradation process of kraft lignin by β-proteobacterium, Pandoraea sp. ISTKB. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**, 15690–15702.

Kumar, M., Singhal, A., Verma, P.K. and Thakur, I.S. (2017) Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoate from Lignin Derivatives by Pandoraea sp. ISTKB. *ACS Omega*, **2**, 9156–9163.

Kumar, Madan, Verma, S., Gazara, R.K., Kumar, Manish, Pandey, A., Verma, P.K. and Thakur, I.S. (2018) Genomic and proteomic analysis of lignin degrading and polyhydroxyalkanoate accumulating β - proteobacterium Pandoraea sp . ISTKB. *Biotechnol. Biofuels*, 1–23.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

Lagaert, S., Pollet, A., Courtin, C.M. and Volckaert, G. (2014) β-Xylosidases and α-L-arabinofuranosidases: Accessory enzymes for arabinoxylan degradation. *Biotechnol. Adv.*, **32**, 316–332.

Lapierre, C., Voxeur, A., Boutet, S. and Ralph, J. (2019) Arabinose Conjugates Diagnostic of Ferulate-Ferulate and Ferulate-Monolignol Cross-Coupling Are Released by Mild Acidolysis of Grass Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.*

Lapierre, C., Voxeur, A., Karlen, S.D., Helm, R.F. and Ralph, J. (2018) Evaluation of Feruloylated and p-Coumaroylated Arabinosyl Units in Grass Arabinoxylans by Acidolysis in Dioxane/Methanol. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 5418–5424.

Lau, P.C., Bergeron, H., Labbé, D., Wang, Y., Brousseau, R. and Gibson, D.T. (1994) Sequence and expression of the todGIH genes involved in the last three steps of toluene degradation by Pseudomonas putida F1. , **146**, 7–13.

Laurichesse, S. and Avérous, L. (2014) Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog. Polym. Sci.*, **39**, 1266–1290.

Lawoko, M., Henriksson, G. and Gellerstedt, G. (2005) Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules*, **6**, 3467–3473.

Lequart, C., Nuzillard, J.M., Kurek, B. and Debeire, P. (1999) Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, **319**, 102–111.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 1–14.

Li, C., Zhao, X., Wang, A., Huber, G.W. and Zhang, T. (2015) Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. *Chem. Rev.*, **115**, 11559–11624.

Li, H., Pu, Y., Kumar, R., Ragauskas, A.J. and Wyman, C.E. (2014) Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 485–492.

Li, J., Henriksson, G. and Gellerstedt, G. (2007) Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.*, **98**, 3061–3068.

Li, M., Pu, Y. and Ragauskas, A.J. (2016) Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance. *Front. Chem.*, **4**, 1–8.

Li, T. and Takkellapati, S. (2018) The current and emerging sources of technical lignins and their applications. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **12**, 756–787.

Lin, L., Cheng, Y., Pu, Y., et al. (2016) Systems biology-guided biodesign of consolidated lignin conversion. *Green Chem.*, **18**, 5536–5547.

Linger, J.G., Vardon, D.R., Guarnieri, M.T., et al. (2014) Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 12013–12018.

Liu, D., Yan, X., Si, M., Deng, X., Min, X., Shi, Y. and Chai, L. (2019) Bioconversion of lignin into bioplastics by Pandoraea sp. B-6: molecular mechanism. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **26**, 2761–2770.

Liu, Y., Hu, T., Wu, Z., Zeng, G., Huang, D., Shen, Y., He, X., Lai, M. and He, Y. (2014a) Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 14004–14013.

Liu, Y., Hu, T., Wu, Z., Zeng, G., Huang, D., Shen, Y., He, X., Lai, M. and He, Y. (2014b) Study on biodegradation process of lignin by FTIR and DSC. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 14004–14013.

Liu, Z.H., Le, R.K., Kosa, M., Yang, B., Yuan, J. and Ragauskas, A.J. (2019) Identifying and creating pathways to improve biological lignin valorization. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **105**, 349–362.

Loh, K.C. and Tan, C.P.P. (2000) Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **64**, 756–763.

Lončar, N., Colpa, D.I. and Fraaije, M.W. (2016) Exploring the biocatalytic potential of a DyP-type peroxidase by profiling the substrate acceptance of Thermobifida fusca DyP peroxidase. *Tetrahedron*, **72**, 7276–7281.

López-Mondéjar, R., Algora, C. and Baldrian, P. (2019) Lignocellulolytic systems of soil bacteria: A vast and diverse toolbox for biotechnological conversion processes. *Biotechnol. Adv.*, **37**.

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K. and Baldrian, P. (2016) Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci. Rep.*, **6**, 1–12.

Lotfi, G. (2014) Lignin-degrading Bacteria. *Journal of agroalimentary*., **20**, 64-68.

Lu, C., Wang, H., Luo, Y. and Guo, L. (2010) An efficient system for pre-delignification of gramineous biofuel feedstock in vitro: Application of a laccase from Pycnoporus sanguineus H275. *Process Biochem.*, **45**, 1141–1147.

Lu, F., Ralph, J., Morreel, K., Messens, E. and Boerjan, W. (2004) Preparation and relevance of a cross-coupling product between sinapyl alcohol and sinapyl p-hydroxybenzoate. *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 2888–2890.

Lubbers, R.J.M., Dilokpimol, A., Visser, J., Mäkelä, M.R., Hildén, K.S. and Vries, R.P. de (2019) A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi. *Biotechnol. Adv.*

Ma, J., Zhang, K., Liao, H., et al. (2016) Genomic and secretomic insight into lignocellulolytic system of an endophytic bacterium Pantoea ananatis Sd-1. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 1–15.

MacLean, A.M., Haerty, W., Brian Golding, G. and Finan, T.M. (2011) The LysR-type PcaQ protein regulates expression of a protocatechuate-inducible ABC-type transport system in Sinorhizobium meliloti. *Microbiology*, **157**, 2522–2533.

Malgas, S., Mafa, M.S., Mkabayi, L. and Pletschke, B.I. (2019) A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1–13.

Mallinson, S.J.B., Machovina, M.M., Silveira, R.L., et al. (2018) A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion. *Nat. Commun.*, **9**, 1–12.

Mamma, D., Kalogeris, E., Papadopoulos, N., Hatzinikolaou, D.G., Christrakopoulos, P. and Kekos, D.

(2004) Biodegradation of phenol by acclimatized Pseudomonas putida cells using glucose as an added growth substrate. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.*, **39**, 2093–2104.

Manangeeswaran, M., Ramalingam, V. V., Kumar, K. and Mohan, N. (2007) Degradation of indulin, a kraft pine lignin, by Serratia marcescens. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, **42**, 321–327.

Mansfield, S.D., Kim, H., Lu, F. and Ralph, J. (2012) Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nat. Protoc.*, **7**, 1579–1589.

Mansouri, N.E. El and Salvadó, J. (2007) Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Ind. Crops Prod.*, **26**, 116–124.

Mansouri, N.E. El and Salvadó, J. (2006) Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Ind. Crops Prod.*, **24**, 8–16.

Mansouri, N.E. El, Yuan, Q. and Huang, F. (2011) Characterization of alkaline lignins for use in phenol-formaldehyde and epoxy resins. *BioResources*, **6**, 2647–2662.

Martínez, A.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., et al. (2017) Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.*, **35**, 815–831.

Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. and Río, J.C. Del (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.*, **8**, 195–204.

Masai, E., Momose, K., Hara, H., Nishikawa, S., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2000) Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway in Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **182**, 6651–6658.

Masai, E., Shinohara, S., Hara, H., Nishikawa, S., Katayama, Y. and Fukuda, M. (1999) Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid hydrolase involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway of Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *J. Bacteriol.*, **181**, 55–62.

Masai, E., Yamamoto, Y., Inoue, T., Takamura, K., Hara, H., Kasai, D., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2007) Characterization of ligV essential for catabolism of vanillin by Sphingomonas paucimobilis SYK-6. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2487–2492.

Mate, D.M. and Alcalde, M. (2017) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb. Biotechnol.*, **10**, 1457–1467.

Mathews, S.L., Epps, M.J., Kevin Blackburn, R., Goshe, M.B., Grunden, A.M. and Dunn, R.R. (2019) Public questions spur the discovery of new bacterial species associated with lignin bioconversion of industrialwaste. *R. Soc. Open Sci.*, **6**.

Mathews, S.L., Grunden, A.M. and Pawlak, J. (2016) Degradation of lignocellulose and lignin by Paenibacillus glucanolyticus. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **110**, 79–86.

McCann, M.C. and Carpita, N.C. (2015) Biomass recalcitrance: A multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. *J. Exp. Bot.*, 66(14): 4009–18.

McCarthy, A.J. and Broda, P. (1984) Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against [14C]lignin-labelled wheat lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2905–2913.

McCarty, N.S. and Ledesma-Amaro, R. (2019) Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **37**, 181–197.

McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W.L., et al. (2006) The complete genome of Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 15582–15587.

Meienhofer, J., Czombos, J. and Maeda, H. (1971) Reduction of disulfide bonds in peptides and proteins by dithiothreitol in liquid ammonia. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3080–3081.

Mercer, D.K., Iqbal, M., Miller, P.G.G. and McCarthy, A.J. (1996) Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2186–2190.

Mikiashvili, N., Wasser, S.P., Nevo, E. and Elisashvili, V. (2006) Effects of carbon and nitrogen sources on Pleurotus ostreatus ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 999–1002.

Min, K., Gong, G., Woo, H.M., Kim, Y. and Um, Y. (2015) A dye-decolorizing peroxidase from Bacillus subtilis exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and β-ether lignin dimer. *Sci. Rep.*, **5**, 1–8.

Mishra, S. and Imlay, J. (2012) Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.*, **525**, 145–160.

Mitra, A., Kitamura, Y., Gasson, M.J., Narbad, A., Parr, A.J., Payne, J., Rhodes, M.J.C., Sewter, C. and Walton, N.J. (1999) 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL) - An enzyme of phenylpropanoid chain cleavage from pseudomonas. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 10–16.

Moen, M.A. and Hammel, K.E. (1994) Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of Phanerochaete chrysosporium is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1956–1961.

Mohan, K. and Phale, P.S. (2017) Carbon Source-Dependent Inducible Metabolism of Veratryl Alcohol and Ferulic Acid in Pseudomonas putida CSV86. , **83**, 1–12.

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.P. and Carrère, H. (2014) Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, **32**, 934–951.

Moon, Y.H., Iakiviak, M., Bauer, S., Mackie, R.I. and Cann, I.K.O. (2011) Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium ruminococcus albus 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5157–5169.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, **96**, 673–686.

Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J. and Mansfield, S.D. (2016) Designer lignins: Harnessing the plasticity of lignification. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **37**, 190–200.

Mycroft, Z., Gomis, M., Mines, P., Law, P. and Bugg, T.D.H. (2015) Biocatalytic conversion of lignin to aromatic dicarboxylic acids in Rhodococcus jostii RHA1 by re-routing aromatic degradation pathways.

Green Chem., **17**, 4974–4979.

Nagakubo, T., Kumano, T., Ohta, T., Hashimoto, Y. and Kobayashi, M. (2019) Copper amine oxidases catalyze the oxidative deamination and hydrolysis of cyclic imines. *Nat. Commun.*, **10**, 1–12.

Naik, S.N., Goud, V. V., Rout, P.K. and Dalai, A.K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **14**, 578–597.

Nešvera, J., Rucká, L. and Pátek, M. (2015) Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Adv. Appl. Microbiol.*, **93**, 107–160.

Nguyen, N.A., Bowland, C.C. and Naskar, A.K. (2018) A general method to improve 3D-printability and inter-layer adhesion in lignin-based composites. *Appl. Mater. Today*, **12**, 138–152.

Ni, J., Wu, Y.T., Tao, F., Peng, Y. and Xu, P. (2018) A Coenzyme-Free Biocatalyst for the Value-Added Utilization of Lignin-Derived Aromatics. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 16001–16005.

Niladevi, K.N., Jacob, N. and Prema, P. (2008) Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in Streptomyces psammoticus: Purification and characterization. *Process Biochem.*, **43**, 654–660.

Nishimura, H., Kamiya, A., Nagata, T., Katahira, M. and Watanabe, T. (2018) Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Sci. Rep.*, **8**, 1–11.

Nishiyama, Y. (2009) Structure and properties of the cellulose microfibril. *J. Wood Sci.*, **55**, 241–249.

Octave, S. and Thomas, D. (2009) Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, **91**, 659–664.

Odier, E., Janin, G. and Monties, B. (1981) Poplar lignin decomposition by gram-negative aerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 337–41.

Ohta, Y., Nishi, S., Hasegawa, R. and Hatada, Y. (2015) Combination of six enzymes of a marine Novosphingobium converts the stereoisomers of β-O-4 lignin model dimers into the respective monomers. *Sci. Rep.*, **5**, 2–15.

Olsen, J.P., Alasepp, K., Kari, J., Cruys-Bagger, N., Borch, K. and Westh, P. (2016) Mechanism of product inhibition for cellobiohydrolase Cel7A during hydrolysis of insoluble cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 1178–1186.

Paës, G., Navarro, D., Benoit, Y., et al. (2019) Tracking of enzymatic biomass deconstruction by fungal secretomes highlights markers of lignocellulose recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 1–14.

Palamuru, S., Dellas, N., Pearce, S.L., Warden, A.C., Oakeshott, J.G. and Pandey, G. (2015) Phylogenetic and kinetic characterization of a suite of dehydrogenases from a newly isolated bacterium, strain SG61-1L, that catalyze the turnover of guaiacylglycerol-β-guaiacyl ether stereoisomers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 8164–8176.

Palazzolo, M.A. and Kurina-Sanz, M. (2016) Microbial utilization of lignin: available biotechnologies for its degradation and valorization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **32**.

Paliwal, R., Rawat, A.P., Rawat, M. and Rai, J.P.N. (2012) Bioligninolysis: Recent updates for biotechnological solution. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **167**, 1865–1889.

Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.*, **74**, 25–33.

Pamidipati, S. and Ahmed, A. (2017) Degradation of Lignin in Agricultural Residues by locally Isolated Fungus Neurospora discreta. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **181**, 1561–1572.

Pan, C., Oda, Y., Lankford, P.K., Zhang, B., Samatova, N.F., Pelletier, D.A., Harwood, C.S. and Hettich, R.L. (2008) Characterization of anaerobic catabolism of p-coumarate in Rhodopseudomonas palustris by integrating transcriptomics and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 938–948.

Pandey, M.P. and Kim, C.S. (2011) Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. *Chem. Eng. Technol.*, **34**, 29–41.

Pauly, M. and Keegstra, K. (2010) Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13**, 304–311.

Pereira, J.H., Heins, R.A., Gall, D.L., et al. (2016) Structural and biochemical characterization of the early and late enzymes in the lignin β-aryl ether cleavage pathway from sphingobium sp. SYK-6. *J. Biol. Chem.*, **291**, 10228–10238.

Pereira, P.H.F., Waldron, K.W., Wilson, D.R., Cunha, A.P., Brito, E.S. d., Rodrigues, T.H.S., Rosa, M.F. and Azeredo, H.M.C. (2017) Wheat straw hemicelluloses added with cellulose nanocrystals and citric acid. Effect on film physical properties. *Carbohydr. Polym.*, **164**, 317–324.

Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K. and Martínez, A.T. (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J. Mol. Biol.*, **354**, 385–402.

Perez, J.M., Kontur, W.S., Alherech, M., Coplien, J., Karlen, S.D., Stahl, S.S., Donohue, T.J. and Noguera, D.R. (2019) Funneling aromatic products of chemically depolymerized lignin into 2-pyrone-4-6-dicarboxylic acid with: Novosphingobium aromaticivorans. *Green Chem.*, **21**, 1340–1350.

Pérez, S. and Mazeau, K. (2004) Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses. *Polysaccharides*.

Picart, P., Liu, H., Grande, P.M., et al. (2017) Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 6277–6287.

Picart, P., María, P.D. De and Schallmey, A. (2015) From gene to biorefinery: Microbial β-etherases as promising biocatalysts for lignin valorization. *Front. Microbiol.*, **6**, 1–8.

Piumi, F., Levasseur, A., Navarro, D., Zhou, S., Mathieu, Y., Ropartz, D., Ludwig, R., Faulds, C.B. and Record, E. (2014) A novel glucose dehydrogenase from the white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus: production in Aspergillus niger and physicochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 10105–10118.

Podkaminer, K.K., Guss, A.M., Trajano, H.L., Hogsett, D.A. and Lynd, L.R. (2012) Characterization of xylan utilization and discovery of a new endoxylanase in Thermoanaerobacterium saccharolyticum through targeted gene deletions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 8441–8447.

Pollegioni, L., Tonin, F. and Rosini, E. (2015) Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.*, **282**, 1190–1213.

Polymenakou, P.N. and Stephanou, E.G. (2005) Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. *Biodegradation*, **16**, 403–413.

Priefert, H., Rabenhorst, J. and Steinbüchel, A. (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 296–314.

Priyadarshinee, R., Kumar, A., Mandal, T. and Dasguptamandal, D. (2015) Improving the perspective of raw eucalyptus kraft pulp for industrial applications through autochthonous bacterial mediated delignification. *Ind. Crops Prod.*, **74**, 293–303.

Pu, Y., Hu, F., Huang, F. and Ragauskas, A.J. (2015) Lignin structural alterations in thermochemical pretreatments with limited delignification. *Bioenergy Res.*, **8**, 992–1003.

Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., et al. (2014) Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science.*, **344**.

Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., et al. (2006) The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science.*, **311**, 484-489.

Rahmanpour, R., Rea, D., Jamshidi, S., Fülöp, V. and Bugg, T.D.H. (2016) Structure of Thermobifida fusca DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **594**, 54–60.

Raj, A., Chandra, R., Reddy, M.M.K., Purohit, H.J. and Kapley, A. (2007) Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, Aneurinibacillus aneurinilyticus from the sludge of a pulp paper mill. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 793–799.

Rakotoarivonina, H., Hermant, B., Aubry, N., Rabenoelina, F., Baillieul, F. and Rémond, C. (2014) Dynamic study of how the bacterial breakdown of plant cell walls allows the reconstitution of efficient hemicellulasic cocktails. *Bioresour. Technol.*, **170**, 331–341.

Rakotoarivonina, H., Hermant, B., Chabbert, B., Touzel, J.P. and Remond, C. (2011) A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium Thermobacillus xylanilyticus releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 541–552.

Rakotoarivonina, H., Hermant, B., Monthe, N. and Rémond, C. (2012) The hemicellulolytic enzyme arsenal of Thermobacillus xylanilyticus depends on the composition of biomass used for growth. *Microb. Cell Fact.*, **11**, 1–12.

Rakotoarivonina, H., Revol, P.V., Aubry, N. and Rémond, C. (2016) The use of thermostable bacterial hemicellulases improves the conversion of lignocellulosic biomass to valuable molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 7577–7590.

Rakotovelo, A. (2017) Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phénoliques To cite this version : HAL Id : tel-01501415 École Doctorale des Sciences Chimiques.

Ralph, J. (2010) Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.*, **9**, 65–83.

Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., et al. (2004a) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.*, **3**, 29–60.

Ralph, J., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Lapierre, C. and Barrière, Y. (2004b) Genetic and molecular basis

of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. *Comptes Rendus - Biol.*, **327**, 467–479.

Ralph, J., Lapierre, C. and Boerjan, W. (2019) Lignin structure and its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 240–249.

Rashid, G.M.M., Taylor, C.R., Liu, Y., Zhang, X., Rea, D., Fülöp, V. and Bugg, T.D.H. (2015) Identification of Manganese Superoxide Dismutase from Sphingobacterium sp. T2 as a Novel Bacterial Enzyme for Lignin Oxidation. *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2286–2294.

Raut, M.P., Couto, N., Pham, T.K., Evans, C., Noirel, J. and Wright, P.C. (2016) Quantitative proteomic analysis of the influence of lignin on biofuel production by Clostridium acetobutylicum ATCC 824. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 1–16.

Ravi, K., Abdelaziz, O.Y., Nöbel, M., García-Hidalgo, J., Gorwa-Grauslund, M.F., Hulteberg, C.P. and Lidén, G. (2019) Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin. *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 1–14.

Ravi, K., García-Hidalgo, J., Brink, D.P., Skyvell, M., Gorwa-Grauslund, M.F. and Lidén, G. (2019) Physiological characterization and sequence analysis of a syringate-consuming Actinobacterium. *Bioresour. Technol.*, **285**.

Ravi, K., García-Hidalgo, J., Gorwa-Grauslund, M.F. and Lidén, G. (2017) Conversion of lignin model compounds by Pseudomonas putida KT2440 and isolates from compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **101**, 5059–5070.

Regalado, V., Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., La Fuente, G. De and Falcon, M.A. (1997) Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus Fusarium proliferatum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3716–3718.

Reiter, J., Strittmatter, H., Wiemann, L.O., Schieder, D. and Sieber, V. (2013) Enzymatic cleavage of lignin β-O-4 aryl ether bonds via net internal hydrogen transfer. *Green Chem.*, **15**, 1373–1381.

Remond-Zilliox, C., Debeire, P., Reis, D. and Vian, B. (1997) Immunolocalization of a purified xylanase during hydrolysis of wheat straw stems. *Int. J. Plant Sci.*, **158**, 769–777.

Rémond, C., Aubry, N., Crônier, D., Noël, S., Martel, F., Roge, B., Rakotoarivonina, H., Debeire, P. and Chabbert, B. (2010) Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6712–6717.

Rémond, C., Boukari, I., Chambat, G. and O'Donohue, M. (2008) Action of a GH 51 α-l-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.*, **72**, 424–430.

Ren, Z., You, W., Wu, S., Poetsch, A. and Xu, C. (2019) Secretomic analyses of Ruminiclostridium papyrosolvens reveal its enzymatic basis for lignocellulose degradation. *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 1–14.

Río, J.C. del, Lino, A.G., Colodette, J.L., Lima, C.F., Gutiérrez, A., Martínez, Á.T., Lu, F., Ralph, J. and Rencoret, J. (2015) Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy*, **81**, 322–338.

Río, J.C. Del, Rencoret, J., Prinsen, P., Martínez, Á.T., Ralph, J. and Gutiérrez, A. (2012) Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage

methods. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 5922–5935.

Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.*, **24**, 219–226.

Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G. and Rossell, C.E.V. (2012) Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.*, **35**, 274–279.

Rodriguez, A., Salvachúa, D., Katahira, R., et al. (2017) Base-Catalyzed Depolymerization of Solid Lignin-Rich Streams Enables Microbial Conversion. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **5**, 8171–8180.

Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. and Martínez, M.J. (2004) Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: The role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.*, **36**, 909–916.

Roth, S. and Spiess, A.C. (2015) Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**, 2285–2313.

Ruijssenaars, H.J. and Hartmans, S. (2004) A cloned Bacillus halodurans multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 177–182.

Sainsbury, P.D., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Otani, H., Seghezzi, N., Eltis, L.D. and Bugg, T.D.H. (2013) Breaking down lignin to high-value chemicals: The conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of rhodococcus jostii RHA1. *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2151–2156.

Sainsbury, P.D., Mineyeva, Y., Mycroft, Z. and Bugg, T.D.H. (2015) Chemical intervention in bacterial lignin degradation pathways: Development of selective inhibitors for intradiol and extradiol catechol dioxygenases. *Bioorg. Chem.*, **60**, 102–109.

Salmon, R.C., Cliff, M.J., Rafferty, J.B. and Kelly, D.J. (2013) The CouPSTU and TarPQM Transporters in Rhodopseudomonas palustris: Redundant, Promiscuous Uptake Systems for Lignin-Derived Aromatic Substrates. *PLoS One*, **8**, 1–13.

Salvachúa, D., Johnson, C.W., Singer, C.A., Rohrer, H., Peterson, D.J., Black, B.A., Knapp, A. and Beckham, G.T. (2018) Bioprocess development for muconic acid production from aromatic compounds and lignin. *Green Chem.*, **20**, 5007–5019.

Salvachúa, D., Karp, E.M., Nimlos, C.T., Vardon, D.R. and Beckham, G.T. (2015) Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria. *Green Chem.*, **17**, 4951–4967.

Samain, Eric, Debeire, P., Debeire-Gosselin, M. and Touzel, J.P. (1991) Xylanase, souches de bacillus productrices de xylanase et leurs utilisations. *Eur. Pat. Off.*, 1–19.

Samain, E., Debeire, P. and Touzel, J.P. (1997) High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic Bacillus strain. *J. Biotechnol.*, **58**, 71–78.

Samain, E, Touzel, J.P., Brodel, B. and Debeire, P. (1991) Isolation of a thermophilic bacterium producing high levels of xylanase. *Prog. Biotechnol.*, **v. 7**.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, **27**, 185–194.

Santiago, R., Barros-Rios, J. and Malvar, R.A. (2013) Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6960–6980.

Santos, A., Mendes, S., Brissos, V. and Martins, L.O. (2014) New dye-decolorizing peroxidases from Bacillus subtilis and Pseudomonas putida MET94: Towards biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 2053–2065.

Saulnier, L., Crépeau, M.J., Lahaye, M., Thibault, J.F., Garcia-Conesa, M.T., Kroon, P.A. and Williamson, G. (1999) Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydr. Res.*, **320**, 82–92.

Schales, O. and Schales, S.S. (1945) A simple method for the determination of glucose in blood. *Arch. Biochem.*, **8**, 285–292.

Scheller, H.V. and Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 263–289.

Schutyser, W., Renders, T., Bosch, S. Van Den, Koelewijn, S.F., Beckham, G.T. and Sels, B.F. (2018) Chemicals from lignin: An interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem. Soc. Rev.*, **47**, 852–908.

Schwanninger, M., Rodrigues, J.C., Pereira, H. and Hinterstoisser, B. (2004) Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vib. Spectrosc.*, **36**, 23–40.

Segura, A., Bünz, P. V., D'Argenio, D.A. and Ornston, L.N. (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing vanA and vanB, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in Acinetobacter. *J. Bacteriol.*, **181**, 3494–3504.

Seigle-Murandi, F., Guiraud, P., Croize, J., Falsen, E. and Eriksson, K.L. (1996) Bacteria Are Omnipresent on Phanerochaete chrysosporium Burdsall. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2477–2481.

Sena-Martins, G., Almeida-Vara, E. and Duarte, J.C. (2008) Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Ind. Crops Prod.*, **27**, 189–195.

Sharma, P., Kumari, S., Bishnoi, M., Lal, S. and Bishnoi, N.R. (2018) Isolation and screening of thermophilic lignolytic bacterial strains for lignin degrading enzymes. *Integr. Res. Adv.*, **5**, 26–29.

Sharma, S., Kumar, R., Gaur, R., Agrawal, R., Gupta, R.P., Tuli, D.K. and Das, B. (2015) Pilot scale study on steam explosion and mass balance for higher sugar recovery from rice straw. *Bioresour. Technol.*, **175**, 350–357.

Shi, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zhang, H., Chen, R., Chen, Y. and Zheng, Y. (2013a) Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-proteobacterium Cupriavidus basilensis B-8. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 1–14.

Shi, Y., Chai, L., Tang, C., Yang, Z., Zheng, Y., Chen, Y. and Jing, Q. (2013b) Biochemical investigation of kraft lignin degradation by pandoraea sp. B-6 isolated from bamboo slips. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **36**, 1957–1965.

Shi, Y., Yan, X., Li, Q., Wang, X., liu, M., Xie, S., Chai, L. and Yuan, J. (2017) Directed bioconversion of Kraft

lignin to polyhydroxyalkanoate by Cupriavidus basilensis B-8 without any pretreatment. *Process Biochem.*, **52**, 238–242.

Shingler, V., Powlowski, J. and Marklund, U. (1992) Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of Pseudomonas sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, **174**, 711–724.

Shinoda, E., Takahashi, K., Abe, N., Kamimura, N., Sonoki, T. and Masai, E. (2019) Isolation of a novel platform bacterium for lignin valorization and its application in glucose-free cis,cis-muconate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 1071–1080.

Shu, L., Chiou, Y.M., Orville, A.M., Miller, M.A., Lipscomb, J.D. and Que, L. (1999) X-ray Absorption Spectroscopic Studies of the Fe(II) Active Site of Catechol 2,3-Dioxygenase. Implications for the Extradiol Cleavage Mechanism. *Biochemistry*, **34**, 6649–6659.

Shuai, L., Amiri, M.T. and Luterbacher, J.S. (2016) Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry The in fl uence of interunit carbon e carbon linkages during lignin upgrading. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **2**, 59–63.

Singh, B.N., Raghubanshi, A.S., Koffas, M. and Gupta, V.K. (2019) Biotechnology Advances. *Biotechnol. Adv.*, **37**, 1–4.

Singh, G., Capalash, N., Goel, R. and Sharma, P. (2007) A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ-proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 794–799.

Singh, R. and Eltis, L.D. (2015) The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, **574**, 56–65.

Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Carpena, X., Fita, I. and Loewen, P.C. (2004) Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 43098–43106.

Singh, R.L., Singh, P.K. and Singh, R.P. (2015) Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **104**, 21–31.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R.O., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D. (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *NREL Tech. Rep.*, 1–14.

Somerville, C. (2006) Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 53–78.

Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., et al. (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science (80-.).*, **306**, 2206–2211.

Sonoki, T., Takahashi, K., Sugita, H., Hatamura, M., Azuma, Y., Sato, T., Suzuki, S., Kamimura, N. and Masai, E. (2018) Glucose-Free cis,cis-Muconic Acid Production via New Metabolic Designs Corresponding to the Heterogeneity of Lignin. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **6**, 1256–1264.

Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E. and Vukojević, J. (2006) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleurotus species. *Enzyme Microb. Technol.*, **38**, 65–73.

Stewart, D. (2008) Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and

economics. *Ind. Crops Prod.*, **27**, 202–207.

Strachan, C.R., Singh, R., VanInsberghe, D., Ievdokymenko, K., Budwill, K., Mohn, W.W., Eltis, L.D. and Hallam, S.J. (2014) Metagenomic scaffolds enable combinatorial lignin transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 10143–10148.

Strassberger, Z., Tanase, S. and Rothenberg, G. (2014) The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv.*, **4**, 25310–25318.

Studer, M.H., DeMartini, J.D., Davis, M.F., Sykes, R.W., Davison, B., Keller, M., Tuskan, G.A. and Wyman, C.E. (2011) Lignin content in natural Populus variants affects sugar release. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**, 6300–6305.

Suemori, A., Nakajima, K., Kurane, R. and Nakamura, Y. (1995) Physicochemical analysis Immunological analysis. , **17**, 1063–1068.

Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P. and Baird, M.S. (2005) Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.*, **340**, 97–106.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresour. Technol.*, **83**, 1–11.

Sun, Z., Bottari, G., Afanasenko, A., Stuart, M.C.A., Deuss, P.J., Fridrich, B. and Barta, K. (2018) Complete lignocellulose conversion with integrated catalyst recycling yielding valuable aromatics and fuels. *Nat. Catal.*, **1**, 82–92.

Sunna, A. and Antranikian, G. (1997) Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**, 39–67.

Swoboda, B.E. and Massey, V. (1965) Purification and Properties of the Glucose Oxidase From Aspergillus. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2209–2215.

Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. (2008) *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*,.

Talebnia, F., Karakashev, D. and Angelidaki, I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, **101**, 4744–4753.

Tan, S.H., Tang, L.M., Xie, Z.X., Pan, C.N. and Chen, K.Q. (2013) Effect of pentagon-heptagon defect on thermal transport properties in graphene nanoribbons. *Carbon N. Y.*, **65**, 181–186.

Tanamura, K., Abe, T., Kamimura, N., et al. (2011) Characterization of the third glutathione S-transferase gene involved in enantioselective cleavage of the β-aryl ether by Sphingobium sp. strain SYK-6. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2404–2407.

Tauber, H. (1953) Oxidation of pyrogallol by crystalline catalase. *J. Biol. Chem.*, **205**, 395–401.

Taylor, C.R., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Sainsbury, P.D., Norris, P.R. and Bugg, T.D.H. (2012a) Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 521–530.

Taylor, C.R., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Sainsbury, P.D., Norris, P.R. and Bugg, T.D.H. (2012b) Isolation

of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 521–530.

Ten, E. and Vermerris, W. (2013) Functionalized polymers from lignocellulosic biomass: State of the art. *Polymers (Basel).*, **5**, 600–642.

Tian, J.H., Pourcher, A.M., Bouchez, T., Gelhaye, E. and Peu, P. (2014) Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 9527–44.

Tian, J.H., Pourcher, A.M. and Peu, P. (2016) Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin and lignin-related compounds. *Lett. Appl. Microbiol.*, **63**, 30–37.

Tinikul, R., Chenprakhon, P., Maenpuen, S. and Chaiyen, P. (2018) Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. *Biotechnol. J.*, **13**, 1–12.

Tobimatsu, Y. and Schuetz, M. (2019) Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 75–81.

Touzel, J.P., Donohue, M.O., Debeire, P., Samain, E. and Breton, C. (2000) Thermobacillus xylanilyticus gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. , **50**, 315–320.

Tribot, A., Amer, G., Abdou Alio, M., et al. (2019) Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. *Eur. Polym. J.*, **112**, 228–240.

Trojanowski, J., Haider, K. and Sundman, V. (1977) Decomposition of 14C-Labelled Lignin and Phenols by a Nocardia sp. *Cultures*, **114**, 149–153.

Tuck, C.O., Pérez, E., Horváth, I.T., Sheldon, R.A. and Poliakoff, M. (2012) Valorization of biomass: Deriving more value from waste. *Science.*, **337**, 695–699.

Tuncer, M. and Ball, A. (2002) Degradation of lignocellulose by extracellular enzymes produced by Thermomonospora fusca BD25. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 608–611.

Tuncer, M., Kuru, A., Isikli, M., Sahin, N. and Çelenk, F.G. (2004a) Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by Streptomyces sp. F2621 isolated in Turkey. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 783–791.

Tuncer, M., Kuru, A., Isikli, M., Sahin, N. and Çelenk, F.G. (2004b) Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by Streptomyces sp. F2621 isolated in Turkey. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 783–791.

Tuncer, M., Kuru, A., Sahin, N., Isikli, M. and Isik, K. (2009) Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by Streptomyces sp. F6616 isolated in Turkey. *Ann. Microbiol.*, **59**, 323–334.

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresour. Technol.*, **72**, 169–183.

Turbe-Doan, A., Arfi, Y., Record, E., Estrada-Alvarado, I. and Levasseur, A. (2013) Heterologous production of cellobiose dehydrogenases from the basidiomycete Coprinopsis cinerea and the ascomycete Podospora anserina and their effect on saccharification of wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**,

4873–4885.

Ulmer, D.C., Leisola, M.S.A., Schmidt, B.H. and Fiechter, A. (1983) Rapid degradation of isolated lignins by Phanerochaete chrysosporium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1795–1801.

Upton, B.M. and Kasko, A.M. (2016) Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: Review and perspective. *Chem. Rev.*, **116**, 2275–2306.

Vaillancourt, F., Bolin, J. and Eltis, L. (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 241–267.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.*, **153**, 895–905.

Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J.H., Ralph, J. and Boerjan, W. (2012) Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol.*, **196**, 978–1000.

Vardon, D.R., Franden, M.A., Johnson, C.W., Karp, E.M., Guarnieri, M.T., Linger, J.G., Salm, M.J., Strathmann, T.J. and Beckham, G.T. (2015) Adipic acid production from lignin. *Energy Environ. Sci.*, **8**, 617–628.

Vermaas, J. V., Dixon, R.A., Chen, F., Mansfield, S.D., Boerjan, W., Ralph, J., Crowley, M.F. and Beckham, G.T. (2019) Passive membrane transport of lignin-related compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 23117–23123.

Vermaas, J. V., Petridis, L., Qi, X., Schulz, R., Lindner, B. and Smith, J.C. (2015) Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 1–16.

Větrovský, T., Steffen, K.T. and Baldrian, P. (2014) Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil Actinobacteria. *PLoS One*, **9**.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**, 335–350.

Vishtal, A. and Kraslawski, A. (2011) Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, **6**, 3547–3568.

Volc, J. and Erikkson, K.-E. (1988) Pyranose 2-Oxidase from Phanerochaete chrysosporium. *Methods Enzymol.*, **161**, 316–322.

Wang, Z., Qin, M., Fu, Y., Yuan, M., Chen, Y. and Tian, M. (2013a) Response of chemical profile and enzymatic digestibility to size reduction of woody biomass. *Ind. Crops Prod.*, **50**, 510–516.

Wang, F., Xie, H., Chen, W., Wang, E.T., Du, F.G. and Song, A.D. (2013b) Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.*, **144**, 572–578.

Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A. and Yang, B. (2019) From lignin to valuable products–strategies, challenges, and prospects. *Bioresour. Technol.*, **271**, 449–461.

Wang, J., Liang, J. and Gao, S. (2018) Biodegradation of Lignin Monomers Vanillic, p-Coumaric, and Syringic Acid by the Bacterial Strain, Sphingobacterium sp. HY-H. *Curr. Microbiol.*, **75**, 1156–1164.

Wang, S.J. and Loh, K.C. (1999) Facilitation of cometabolic degradation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate. *Biodegradation*, **10**, 261–269.

Wang, W., Zhang, C., Sun, X., Su, S., Li, Q. and Linhardt, R.J. (2017) Efficient, environmentally-friendly and specific valorization of lignin: promising role of non-radical lignolytic enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 0.

Wei, Z., Zeng, G., Huang, F., Kosa, M., Huang, D. and Ragauskas, A.J. (2015) Bioconversion of oxygen-pretreated Kraft lignin to microbial lipid with oleaginous Rhodococcus opacus DSM 1069. *Green Chem.*, **17**, 2784–2789. Available at: http://dx.doi.org/10.1039/c5gc00422e.

Weng, J.K., Li, X., Bonawitz, N.D. and Chapple, C. (2008) Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 166–172.

Wild, P.J. De, Huijgen, W.J.J. and Gosselink, R.J.A. (2014) Lignin pyrolysis for profi table lignocellulosic biorefi neries. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **8**, 645–657.

Wilhelm, R.C., Singh, R., Eltis, L.D. and Mohn, W.W. (2019) Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *ISME J.*, **13**, 413–429.

Woo, H.L., Ballor, N.R., Hazen, T.C., et al. (2014) Complete genome sequence of the lignin-degrading bacterium Klebsiella sp. strain BRL6-2. *Stand. Genomic Sci.*, **9**, 1–9.

Wu, J., Xiao, Y.Z. and Yu, H.Q. (2005) Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresour. Technol.*, **96**, 1357–1363.

Wu, W., Dutta, T., Varman, A.M., Eudes, A., Manalansan, B., Loqué, D. and Singh, S. (2017) Lignin Valorization: Two Hybrid Biochemical Routes for the Conversion of Polymeric Lignin into Value-added Chemicals. *Sci. Rep.*, **7**, 1–13.

Wu, W., Liu, F. and Singh, S. (2018) Toward engineering E. coli with an autoregulatory system for lignin valorization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 2970–2975.

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B. and Ladisch, M. (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.*, **48**, 54–60.

Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Han, H., Zhao, S., Kakade, A., Khan, A., Du, D. and Li, X. (2018) Lignin depolymerization and utilization by bacteria. *Bioresour. Technol.*, **269**, 557–566.

Xu, Z., Lei, P., Zhai, R., Wen, Z. and Jin, M. (2019) Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: Microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. *Biotechnol. Biofuels*, **12**, 1–19.

Xu, Z., Qin, L., Cai, M., Hua, W. and Jin, M. (2018) Biodegradation of kraft lignin by newly isolated Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas putida, and Ochrobactrum tritici strains. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **25**, 14171–14181.

Yan, L., Chen, P., Zhang, S., Li, S., Yan, X., Wang, N., Liang, N. and Li, H. (2016) Biotransformation of ferulic acid to vanillin in the packed bed-stirred fermentors. *Sci. Rep.*, **6**, 1–12.

Yang, Y.S., Zhou, J.T., Lu, H., Yuan, Y.L. and Zhao, L.H. (2011) Isolation and characterization of a fungus Aspergillus sp. strain F-3 capable of degrading alkali lignin. *Biodegradation*, **22**, 1017–1027.

Yoshida, T. and Sugano, Y. (2015) A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Arch. Biochem. Biophys.*, **574**, 49–55.

Yu, T., Wu, W., Liang, W., Lever, M.A., Hinrichs, K.U. and Wang, F. (2018) Growth of sedimentary Bathyarchaeota on lignin as an energy source. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 6022–6027.

Yu, W., Liu, W., Huang, H., Zheng, F., Wang, X., Wu, Y., Li, K., Xie, X. and Jin, Y. (2014) Application of a novel alkali-tolerant thermostable DyP-type peroxidase from saccharomonospora viridis DSM 43017 in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *PLoS One*, **9**, 1–11.

Zago, A., Degrassi, G. and Bruschi, C. V. (1995) Cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli of the Bacillus pumilus gene for ferulic acid decarboxylase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4484–4486.

Zakzeski, J., Bruijnincx, P.C.A., Jongerius, A.L. and Weckhuysen, B.M. (2010) The Catalytic Valorization of Ligning for the Production of Renewable Chemicals. *Chem. Rev.*, **110**, 3552–3599.

Zeng, J., Singh, D., Laskar, D.D. and Chen, S. (2013) Degradation of native wheat straw lignin by Streptomyces viridosporus T7A. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **10**, 165–174.

Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S. and Ding, S.Y. (2014) Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **27**, 98–45.

Zhang, S., Jiang, M., Zhou, Z., Zhao, M. and Li, Y. (2012) Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by Phanerochaete chrysosporium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **75**, 89–95.

Zhang, Y., Culhaoglu, T., Pollet, B., Melin, C., Denoue, D., Barrière, Y., Baumberger, S. and Méchin, V. (2011) Impact of lignin structure and cell wall reticulation on maize cell wall degradability. *16th Int. Symp. Wood, Fiber Pulping Chem. - Proceedings, ISWFPC*, **2**, 942–948.

Zhao, X., Zhang, L. and Liu, D. (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, **6**, 465–482.

Zhao, Z., Crespi, V.H., Kubicki, J.D., Cosgrove, D.J. and Zhong, L. (2014) Molecular dynamics simulation study of xyloglucan adsorption on cellulose surfaces: Effects of surface hydrophobicity and side-chain variation. *Cellulose*, **21**, 1025–1039.

Zhou, C.H., Xia, X., Lin, C.X., Tong, D.S. and Beltramini, J. (2011) Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5588–5617.

Zhu, D., Si, H., Zhang, P., Geng, A., Zhang, W., Yang, B., Qian, W.J., Gabriel, M. and Sun, J. (2018) Genomics and biochemistry investigation on the metabolic pathway of milled wood and alkali lignin-derived aromatic metabolites of Comamonas serinivorans SP-35. *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 1–15.

Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W.J. and Yang, B. (2017) Biodegradation of alkaline lignin by Bacillus ligniniphilus L1. *Biotechnol. Biofuels*, **10**, 1–14.

Zhu, N., Yang, J., Ji, L., Liu, J., Yang, Y. and Yuan, H. (2016) Metagenomic and metaproteomic analyses of a corn stover-adapted microbial consortium EMSD5 reveal its taxonomic and enzymatic basis for degrading lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels*, **9**, 1–23.

Zhu, P., Abdelaziz, O.Y., Hulteberg, C.P. and Riisager, A. (2019) New Synthetic Approaches to Biofuels from Lignocellulosic Biomass.

Zilliox, C. and Debeire, P. (1998) Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 58–63.

Zimmermann, W. (1990) Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.*, **13**, 119–130.

Zurawski, J. V., Conway, J.M., Lee, L.L., Simpson, H.J., Izquierdo, J.A., Blumer-Schuette, S., Nookaew, I., Adams, M.W.W. and Kelly, R.M. (2015) Comparative analysis of extremely thermophilic Caldicellulosiruptor species reveals common and unique cellular strategies for plant biomass utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 7159–7170.

Résumé

Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel ligninolytique de la bactérie *Thermobacillus xylanilyliticus*, en étudiant son comportement en présence de différents substrats riches en lignine, comme la paille de blé, la paille de blé explosée à la vapeur et la lignine kraft. Après avoir caractérisé ces substrats, des cultures ont été réalisées en présence de ces substrats complémentés ou non avec du xylane Des activités phénol-oxydases ont été mises en évidence avec des profils dépendant de la nature de ces substrats. Par la suite, les modifications des résidus et des milieux de culture ont été évaluées pour mesurer l'impact de la croissance bactérienne. Les changements observés sur les résidus n'ont pu être reliés de manière certaine à la dégradation de la lignine. En revanche, dans les milieux de culture, des modifications des concentrations de plusieurs molécules phénoliques ont été observées et pourraient être reliées au métabolisme de ces composés par la bactérie. Pour identifier les enzymes responsables des activités phénol-oxydases et des modifications de composés phénoliques, les protéines produites par la bactérie et spécifiquement induites en présence de substrats riches en lignine ont été étudiées. Plusieurs protéines ont été identifiées comme des enzymes ayant potentiellement un rôle dans le métabolisme des composés aromatiques et/ou dans la réponse au stress probablement due à la présence de ces composés phénoliques. Enfin, parmi les enzymes identifiées, une catalase/peroxydase a été clonée, produite et caractérisée. Cette enzyme est thermoactive, et possède une activité peroxydase optimale, à pH 7 et 55°C.

Mots clés : *Thermobacillus xylanilyticus*, Lignine, Molécules aromatiques, Oxydoréductases, Valorisation, Bioraffinerie.

In this study, we evaluated the ligninolytic potential of the bacterium *Thermobacillus xylanilyliticus* by studying its behaviour in the presence of different lignin-rich substrates, such as wheat straw, steam-exploded wheat straw and kraft lignin. After characterizing these lignified substrates, cultures were carried out with these substrates supplemented or not with xylan. Phenol-oxidases activities were produced with dissimilar profiles depending on the nature of the substrates used. Subsequently, modifications in residues and culture media were evaluated to measure the impact of bacterial growth. The changes observed in the residues could not be reliably related to the lignin degradation. On the other hand, modifications of phenolic compounds concentrations were observed in the culture media and could be related to the metabolism of these molecules by the bacterium. To identify enzymes related to phenol oxidases activities and modifications of phenolic compounds, the proteins produced by the bacterium and induced by lignin rich substrates were studied. Several proteins were identified as enzymes with a potential role in the metabolism of aromatic compounds and/or in stress response probably due to the presence of these phenolic compounds. Finally, a catalase/peroxidase was cloned, produced and characterized. This enzyme is thermoactive, with a peroxidase optimal activity, at pH 7 and 55°C.

Keywords: *Thermobacillus xylanilyticus*, Lignin, Aromatic compounds, Oxidoreductases, Valorization, Biorefinery.