



Université de Reims Champagne-Ardenne
Ecole doctorale Sciences Technologies Santé 358

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biochimie et Biologie moléculaire

Etude de la saccharification enzymatique du miscanthus par des cocktails cellulolytiques de *Trichoderma reesei*

Par

Nassim BELMOKHTAR

Le 04 juillet 2012

Directeur de thèse : Pr Philippe DEBEIRE

Co-encadrement :

Dr Brigitte CHABBERT, Chargé de Recherche, INRA, Reims

Dr Nicolas LOPES-FERREIRA, Ingénieur de Recherche, IFPEN, Rueil-Malmaison

Jury de soutenance :

Rapporteurs :

Pr Catherine LAPIERRE, Professeur AgroParisTech, Thiverval-Grignon

Pr Dominique LACHENAL, LGP2 (Chimie des procédés), Grenoble INP-Pagora

Examineurs :

Pr Jean-Claude SIGOILLOT, Professeur à l'ESIL/INRA, Marseille

Pr Caroline REMOND, Professeur à l'URCA, Reims

IFP Energies nouvelles, Département Biotechnologie, Rueil-Malmaison
UMR 614 INRA-URCA Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims

*À mon épouse, à mon défunt père, à ma très
chère maman et à mes frères et sœurs*

C'est grâce à votre soutien que ce travail a été rendu possible !

Remerciements

Je tiens à profiter de ces quelques lignes pour adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux qui m'ont encouragé, poussé et aidé à accomplir ce travail de thèse. Ma gratitude va d'abord à M^{me} Brigitte CHABBERT et M Nicolas LOPES FERREIRA pour leur confiance et leurs précieux conseils tout au long de cette aventure.

Je remercie également les membres du jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à la fondation TUCK pour avoir financé ce projet de thèse.

Mes remerciements vont enfin, à ma famille et mon épouse qui n'ont cessé de me soutenir tout au long de cette thèse.

A tous merci !

Productions scientifiques

Articles :

- **Changes in phenolics distribution after chemical pretreatment and enzymatic conversion of *Miscanthus x giganteus* internode**
Belmokhtar N., Habrant A., Lopes Ferreira N. and Chabbert B.
Accepted in BioEnergy Research – DOI 10.1007/s12155-012-9275-2
- **Impact of acid pretreatments and cellulolytic cocktails of *Trichoderma reesei* on the hydrolysis of miscanthus**
Belmokhtar N., Chabbert B. and Lopes Ferreira N.
Submitted to Enzyme and Microbial Technology

Article de conférence :

- **Impact of acid and alkali pretreatment of *Miscanthus giganteus* on cell-wall lignin and hydroxycinnamic acids in relation to degradation by polysaccharide-active enzymes**
Belmokhtar N., Habrant A., Lopes Ferreira N. and Chabbert B.
Italic 6 - Proceeding book – SCIENCE & TECHNOLOGY OF BIOMASSES: ADVANCES AND CHALLENGES; September 5-8,2011, TUSCIA UNIVERSITY, VITERBO, ITALY

Présentations orales :

- **Impact de prétraitements chimiques sur les phénols pariétaux et la saccharification enzymatique de miscanthus**
Belmokhtar N., Habrant A., Lopes Ferreira N., Chabbert B.
Journées du Réseau Français des Parois - 6, 7 et 8 Juin 2011 à Lille (France)
- **Impact of acid and alkali pretreatment of *Miscanthus x giganteus* on cell-wall lignin and hydroxycinnamic acids in relation to degradation by polysaccharide-active enzymes**
Belmokhtar N., Habrant A., Lopes-Ferreira N., Chabbert B.
Italic 6 – September 2011- Rome (Italy)

Communication par affiche (poster) :

- **Impact of acid and alkali pretreatment of *Miscanthus x giganteus* on cell-wall lignin and hydroxycinnamic acids in relation to degradation by polysaccharide-active enzymes**
Belmokhtar N., Habrant A., Lopes-Ferreira N., Chabbert B.
Annual meeting of International Academy of Wood Science (IAWS) – September 2011- Stockholm (Sweden)

Liste des abréviations

ABF : Arabinofuranosidase
AFEX : Ammonia Fiber Explosion
AFM : Atomic force microscopy
AIE : Agence Internationale de l'Energie
AXE : Acétyl-xylane-estérase
BGL : β -glucosidase
BRIC : Brésil, Russie, Inde et Chine
BXL : β -xylosidase
CAZy : Carbohydrate-Active Enzymes database
CBH : Cellobiohydrolase
CBM : Carbohydrate Binding Domain
CD : Catalytic Domain
DAP : Dilute Acid Pretreatment
Di-FA : Déhydrodimères d'acides féruliques
DP : Degré de polymérisation
EC : Enzyme Comitee
EG: Endoglucanase
ETBE : Ethyl t-Butyl Ether
FA : Acide férulique (ferulic acid)
FT-IR : Infrarouge à transformée de fourrier
G : Unités guaïacyle
GH : Glycoside Hydrolase
H : Unités *p*-hydroxyphényle
IFPEN : IFP Energies nouvelles
Ktep : Kilo tonne équivalent Pétrole
LCC : Lignines Carbohydrates Complexes
LM : Lamelle moyenne
M : Monomères de lignines
MAN : Mannanase
Mb : Millions de barils
MS : Matière sèche

Liste des abréviations

Par : Parenchyme

pCA : Acide p-coumarique (p-coumaric acid)

S : Unités syringyles

S1 : Sous-couche 1

S2 : Sous-couche 2

S3 : Sous-couche 3

SAA : Soaking in Aqueous Ammonia

Scl : Sclérenchyme

SHF : Saccharification Hydrolysis and Fermentation

SSF : Simultaneous saccharification and fermentation

Tétra-FA : Déhydrotétramères d'acides féruliques

Tri-FA : Déhydrotrimères d'acides féruliques

UIBMB : Union Internationale de la Biochimie et de la Biologie Moléculaire

VS : Vaisseaux

XYN : Xylanase

Liste des figures

Figure 1: Evolution de la consommation de biocarburants utilisés dans les transports de l'Union Européenne des 27 (ktep).....	2
Figure 2: Schéma du procédé de fabrication de bioéthanol de deuxième génération.	4
Figure 3: Illustration de la croissance d'un miscanthus.....	9
Figure 4: Vue partielle d'une coupe transversale d'un entre-nœud de tige de maïs	10
Figure 5: Organisation structurale des parois lignocellulosiques.	11
Figure 6: Structure de base de la cellulose.	12
Figure 7: Structure de base du squelette β -(1,4) des hémicelluloses.	13
Figure 8: Structures chimiques d'une chaîne de xylane réticulée par de l'arabinose, de l'arabinose estérifié, de l'acide glucuronique et de l'acétate.	15
Figure 9: Représentation schématique d'oligomères d'acide férulique.	15
Figure 10: Structures des alcools <i>p</i> -coumarylique, coniférylique et sinapylique (a) précurseur des lignines H, G et S respectivement (b). M : monomères de lignines, P : polymères de lignines	16
Figure 11: Exemples de liaisons éthers labiles (a) et condensées (b) entre monomères de lignines.	17
Figure 12: Représentation schématique des interactions arabinoxylanes-lignines via des liaisons (1) éthers ou esters (2).....	20
Figure 13: Généalogie de souches <i>Trichoderma reesei</i> hyperproductrices de cellulases.	22
Figure 14: Mode d'action synergique des cellulases de <i>Trichoderma reesei</i> sur un substrat cellulosique.....	26
Figure 15: Représentation schématique de la structure modulaire de CBH I, et son mode d'action sur un substrat cellulosique. Les glycosylations sont montrées en rose sur le linker. 27	27
Figure 16: Les trois types de sites actifs principalement retrouvés chez les glycosides hydrolases. (a) La poche de la glucoamylase d' <i>Aspergillus awamori</i> . (b) La fente de l'endoglucanase EG2 de <i>Thermobifida fusca</i> . (c) Le tunnel de la cellobiohydrolase.....	28
Figure 17: Représentation schématique des principaux sites d'hydrolyse enzymatique d'une chaîne d'arabinoxylane.....	29
Figure 18: Représentation schématique de l'impact des prétraitements sur les complexes lignocellulosiques.....	33

Figure 19: Formation de gouttelettes à la surface des parois du xylème de tiges de maïs avant (A) et après (B) prétraitement à l'acide dilué	35
Figure 20: Méthode de criblage des transformants de <i>Trichoderma reesei</i>	85
Figure 21: Obtention de fragments à partir d'entre-nœud n°2 d'une tige de miscanthus.	86
Figure 22: Principe de délétion de gènes par recombinaison homologue (crossing-over)	90
Figure 23: Criblage des candidats délétants cbh1(A) et eg1 (B) par PCR sur ADN génomique. (WT : Wild Type, souche sauvage, Neg : Contrôle négatif)	90
Figure 24: Vérification de l'absence de cellulases CBH1 et EG1 dans les souches délétantes	91
Figure 25: Essais d'immunolocalisation de CBH1 par un anticorps anti-CBH1 sur des parois de miscanthus. (A : sans enzymes, B : 144h d'hydrolyse enzymatique)	93
Figure 26: Essais d'immunolocalisation de CBH1 par un sérum anti-CBH1 sur des parois de miscanthus. (A : sans enzymes, B : 144h d'hydrolyse enzymatique)	93
Figure 27: Impact des prétraitements sur les spectres infrarouges des parois de miscanthus. Natif (bleu), explosé à la vapeur (rouge), prétraité à l'acide sulfurique à 150°C (vert)	121
Figure 28: Spectres infrarouge de miscanthus natif après hydrolyse enzymatique	122
Figure 29: Spectres infrarouge de miscanthus (A) explosé à la vapeur et (B) dilué à l'acide après hydrolyse enzymatique	123
Figure 30: Spectres infrarouges de miscanthus explosé à la vapeur par des cocktails enzymatiques reconstitués.....	124
Figure 31: Analyse en composantes principales des spectres infrarouge du miscanthus natif ou prétraité, avant et après hydrolyse enzymatique	126
Figure 32: Analyse en composante principale des spectres infrarouge du miscanthus prétraité et hydrolysé.	127

Liste des tableaux

Tableau I: Distribution des hémicelluloses au sein des parois végétales	14
Tableau II: Distribution molaire des unités de lignines H, G et S libérées après thioacidolyse	18
Tableau III: Description des trois types fonctionnels de CBM	24
Tableau IV: Liste des enzymes cellulolytiques de <i>Trichoderma reesei</i>	25
Tableau V: Liste des principales hémicellulases de <i>Trichoderma reesei</i>	28
Tableau VI: Conditions de prétraitement AFEX optimales de plusieurs substrats lignocellulosiques.....	39
Tableau VII: Liste des principaux prétraitements et leurs actions	41
Tableau VIII: Oligo-éléments du milieu TR	82
Tableau IX: Plasmides réalisés pour l'expression de cellulases inactives	89
Tableau X: Attribution des spectres infrarouge.	120
Tableau XI: Liste des échantillons analysé en ACP	125

Sommaire

Introduction générale	1
Etude bibliographique	7
1 La biomasse lignocellulosique	7
1.1 L'espèce candidate <i>Miscanthus x giganteus</i>	7
1.2 Anatomie et structure de la biomasse aérienne du miscanthus	9
1.3 Les parois lignocellulosiques	10
1.3.1 Organisation structurale de la paroi végétale	10
1.3.2 Composition chimique de la paroi végétale	12
1.3.3 Interaction des composés pariétaux	19
2 Hydrolyse enzymatique des lignocelluloses	20
2.1 Production des glycosides hydrolases	20
2.2 Fonctions et propriétés des glycosides hydrolases fongiques	23
2.2.1 Structure et organisation modulaire des glycosides hydrolases	23
2.2.2 Les cellulases	24
2.2.3 Les hémicellulases	28
3 Les structures pariétales récalcitrantes à l'hydrolyse enzymatique	31
3.1 Les limitations liées à l'accessibilité au substrat	31
3.2 Inhibition au cours de l'hydrolyse enzymatique	32
4 Amélioration de l'hydrolyse enzymatique	32
4.1 Prétraitement de la biomasse	33
4.1.1 Prétraitement à l'acide dilué	34
4.1.2 Prétraitement en milieux alcalins	35
4.1.3 Le prétraitement hydrothermique	36
4.1.4 Prétraitement par explosion à la vapeur	37
4.1.5 Le prétraitement AFEX	38
4.1.6 Le prétraitement Organosolv	39
4.1.7 Les prétraitements biologiques	40
4.2 Amélioration du processus d'hydrolyse enzymatique	41

4.2.1	Elimination des produits inhibiteurs de cellulases	41
4.2.2	Amélioration des interactions enzymes/substrats	42
4.2.3	Optimisation des cellulases par génie génétique.....	43
4.2.4	Optimisation des cocktails enzymatiques.....	43
Objectifs de la thèse et stratégie de recherche		47
1	Objectifs scientifiques	47
1.1	Premier objectif	47
1.2	Deuxième objectif.....	48
1.3	Troisième objectif.....	48
2	Hypothèses et approches expérimentales	49
CHAPITRE III : Impact des prétraitements chimiques et de l'hydrolyse enzymatique sur la		
distribution des composés phénoliques des parois d'un entre-nœud de tige de miscanthus....		
Abstract		55
Introduction		56
Material and methods		58
1	Plant material	58
2	Chemical pretreatments.....	58
2.1	Dilute acid pretreatment	58
2.2	Soaking in aqueous ammonia	58
3	Chemical analysis	59
3.1	Lignin.....	59
3.2	Phenolic acid esters	59
3.3	Carbohydrate	60
4	Enzymatic hydrolysis	60
5	Microscopic analysis	61
5.1	Sample preparation	61
5.2	Toluidine blue staining	61
5.3	UV transmission micro spectrophotometry	61

Results	62
1 Impact of sulphuric acid and ammonium hydroxide pretreatments on the chemical composition of miscanthus internodes.....	62
2 Impact of acid and alkali pretreatments on saccharification yields and anatomy of miscanthus internode	63
3 Cellular UV micro spectrometry analysis	67
3.1 Lignin and hydroxycinnamic acids distribution in cell types of miscanthus internodes	67
3.2 Impact of pretreatments on lignin and hydroxycinnamic acids distribution	69
3.3 Impact of enzymatic hydrolysis on lignin and hydroxycinnamic acids UV absorption	69
Discussion	71
1 Pretreatments have a distinctive effect on the chemical components and saccharification ability of miscanthus internodes	71
2 Distinct cell wall reactivity to pretreatments and enzymatic saccharification	73
3 Pattern of phenols distribution during pretreatment and saccharification.....	74
Conclusion.....	75
Supplementary data 1	76
Supplementary data 2	77
Chapitre IV : Etude de la progression des cellulases CBH1 et EG1 au sein des parois du miscanthus	81
Objectifs de l'étude.....	81
1 Matériels et méthodes	81
1.1 Croissance de la souche <i>Trichoderma reesei</i>	81
1.2 Analyse des surnageants de cultures.....	82
1.2.1 Dosage des protéines	82
1.2.2 Analyse par électrophorèse	82
1.2.3 Dot-blot	82
1.3 Matériel utilisé pour l'ensemble des constructions génétiques.....	83

1.4	Méthodes de transformation de la souche <i>Trichoderma reesei</i> CL847	84
1.4.1	Obtention des protoplastes (adaptée de Berges, 1991 [358])	84
1.4.2	Transformation	84
1.4.3	Procédé de criblage	84
1.5	Extraction d'ADN génomique	85
1.6	Préparation des échantillons de miscanthus	86
1.7	Prétraitement alcalin	86
1.8	Hydrolyse enzymatique	86
1.9	Observations microscopiques	86
1.10	Immunolocalisation de cellulases	87
2	Résultats et discussion	88
2.1	Production des cellulases CBH1 et EG1	88
2.2	Production de cellulases recombinantes	88
2.2.1	Les vecteurs d'expression	88
2.2.2	Construction de délétants <i>Trichoderma reesei</i> CL847	89
2.2.3	Surexpression de cellulases inactives	91
3	Tentative d'immunolocalisation des cellulases	92
4	Conclusions et perspectives	94
CHAPITRE V : Impact de prétraitements acides sur l'hydrolyse enzymatique du miscanthus		
	par des cocktails enzymatiques complets ou reconstitués	97
	Abstract	99
	Introduction	100
	Results and discussion	102
1	Impact of dilute sulfuric acid and steam explosion pretreatments on the chemical composition of miscanthus	102
2	Analysis of <i>Trichoderma reesei</i> secretomes	103
3	Impact of mild acid pretreatments on glucan conversion	105
4	Saccharification improvement: critical role of β-glucosidase	106
5	Impact of hemicellulases improved secretomes	109

6	Miscanthus hydrolysis with minimal enzyme mixtures	110
	Conclusions	112
	Material and methods	113
1	Enzymatic production	113
2	Enzymes purification	113
3	Enzymatic activities	114
3.1	Cellulase activity Assay	114
3.2	Xylanase activity	114
4	Analytical methods	115
4.1	Carbohydrate analysis	115
4.2	Lignin	116
5	Plant material	116
6	Pretreatments	116
6.1	Dilute sulfuric acid at 150°C	116
6.2	Steam explosion	116
	Annexe : Analyse spectroscopique FT-IR	119
1	Impact des prétraitements sur les parois de miscanthus	120
2	Impact des l'hydrolyse enzymatiques sur les spectres infrarouges	121
3	Analyse en composantes principales	124
	Conclusions	127
	Discussion générale et perspectives	131
1	Discussion générale	131
1.1	Relation entre hétérogénéité tissulaire et saccharification du miscanthus	131
1.2	Progression des cellulases dans les parois du miscanthus prétraité	133
1.3	Optimisation des mélanges enzymatiques et hydrolyse du miscanthus prétraité	134
2	Conclusions et perspectives	135
	Références bibliographiques	141

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les besoins énergétiques mondiaux sont de plus en plus élevés du fait de la croissance démographique et de l'augmentation progressive du niveau de vie des pays en voie de développement. Ces besoins devraient en effet doubler d'ici à 2050 alors que les énergies fossiles représentent toujours le principal moteur de l'économie de toutes les grandes puissances mondiales. En 2006, la consommation énergétique était de 8,1 milliards de tonnes d'équivalent pétrole et atteindra 17 Gigatonnes d'équivalent pétrole à l'horizon 2030. Cela représente un taux de croissance moyen de 1,6 % par an sur les 25 prochaines années selon les prévisions de l'Agence Internationale de l'Energie (AIE). Plus de 86 % de cette production est issue de la combustion d'énergies fossiles à savoir le charbon, le pétrole et le gaz. Ces derniers présentent en effet l'énorme avantage d'être disponibles sous formes très concentrées, facilement transportables et peu coûteuses. La source d'énergie la plus utilisée aujourd'hui est d'origine pétrolifère. Toutefois, cette source n'est pas renouvelable et certains spécialistes situent le fameux pic pétrolier, désignant le moment où la production mondiale de pétrole commencera à décliner, entre 2020 et 2030. Ces prévisions ont été confirmées par l'AIE qui constatait, dans son World Energy Outlook 2010, que la consommation de pétrole a atteint son maximum en 2006 avec 70 millions de barils par jours (Mb/j). Cette valeur se stabilise autour de 68 et 69 Mb/j à l'horizon 2020.

Cet épuisement est accéléré par l'émergence de nouvelles puissances économiques, notamment les BRIC (Brésil, Russie, Inde et Chine), et fait apparaître de nouveaux conflits géopolitiques liés à l'accès à ces ressources énergétiques. Bien avant les hausses des coûts de production ou la faiblesse du dollar, c'est bien la croissance économique des pays émergents qui est le moteur principal de cette évolution.

Le secteur des transports est celui qui dépend le plus du pétrole (95 %), il représente 55 % du pétrole et 28 % de l'énergie mondiale consommés avec une croissance annuelle de 2 % (Source : Agence Internationale de l'Energie AIE 2006) et restera dans les années à venir un des émetteurs les plus importants de gaz à effet de serre. La part des carburants alternatifs dans les transports est pour l'instant très faible. Parmi ces ressources alternatives, les biocarburants apparaissent comme l'une des solutions les plus adaptées pour satisfaire les besoins en énergie du secteur des transports.

Les biocarburants sont amenés à fournir 9,3 % des besoins du secteur des transports en 2030 en utilisant seulement 10 % des résidus végétaux (AIE ; 2008). La consommation des biocarburants, le bioéthanol notamment, est en augmentation croissante depuis dix ans (figure 1).

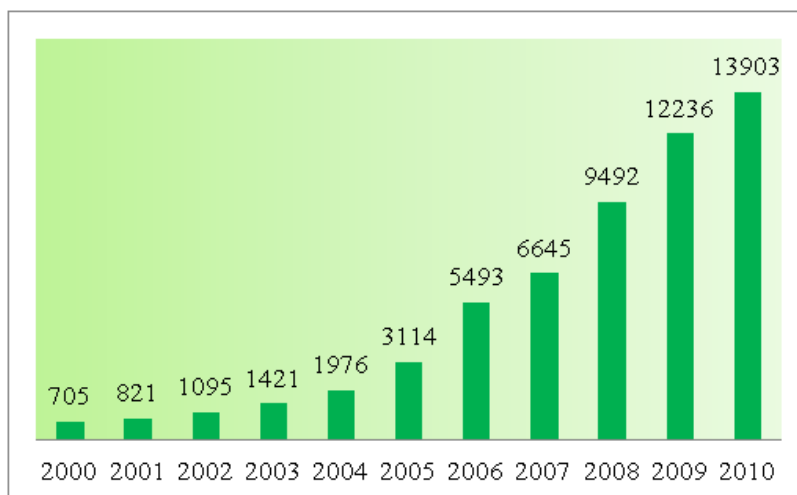


Figure 1: Evolution de la consommation de biocarburants utilisés dans les transports de l'Union Européenne des 27 (ktep).

(Source : 2000 à 2008 Eurostat 2011; 2009 à 2010 EurObserv'ER 2011)

La biomasse végétale utilisée pour fabriquer les biocarburants présente l'avantage de pouvoir être produite localement, de manière renouvelable et en utilisant pour sa croissance le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère. Elle permet donc d'améliorer le bilan des émissions de gaz à effet de serre engendrées par la production et la consommation énergétique [1].

Selon la directive européenne n°2003/30/CE du 08 mai 2003, la définition des biocarburants est la suivante : « combustibles liquides ou gazeux utilisés pour le transport et produits à partir de la biomasse ». Il existe actuellement deux filières industrielles de production de biocarburants à partir des éléments de réserve des plantes [2, 3] et dits de première génération (1G) :

- Le biodiesel constitué d'esters méthyliques d'huiles végétales (colza, tournesol, soja). Ce carburant est utilisé en mélange dans le gazole.

- L'éthanol, issu de la fermentation des sucres contenus dans les plantes sucrières (betteraves, canne à sucre...) et amylacées (maïs, blé...). Il peut être directement incorporé à l'essence ou être transformé en Ethyl t-Butyl Ether (ETBE) avant incorporation.

Ces biocarburants assurent de substantielles réductions des émissions de CO₂ mais présentent l'inconvénient majeur de rentrer en concurrence avec la filière alimentaire et de ne concerner qu'une partie de la plante [4].

Les biocarburants de deuxième génération (2G) sont quant à eux issus de la transformation de la plante entière ou de sa fraction lignocellulosique (non comestible). La fraction lignocellulosique des résidus agricoles (paille de céréales) ou du bois peut ainsi être valorisée. Il est également possible d'utiliser des espèces pour la réalisation de cultures dédiées (miscanthus ou sorgho par exemple). Ces dernières ont l'avantage d'atteindre des rendements très élevés et de ne pas concurrencer directement la filière alimentaire. Les biocarburants 2G peuvent être produits selon deux voies principales : la voie biochimique qui utilise des enzymes pour produire du bioéthanol utilisé par les moteurs à essence, et la voie thermochimique conduisant au biodiesel pour les moteurs diesels mais aussi du kérosène synthétique pour le transport aérien. Une compétition pour le sol existe toutefois entre ces cultures dédiées et la filière alimentaire [3, 5]. Plusieurs unités de production de biocarburants 1G sont actuellement présentes en France alors que ceux de la deuxième génération n'en sont qu'au stade de recherche en laboratoire ou pilote [6].

De la biomasse algale est également explorée depuis peu pour la production de biocarburants par transformation de lipides accumulés après fixation de CO₂ lors de la photosynthèse en conditions autotrophes. Il s'agit de la troisième génération de biocarburants [7, 8].

La biomasse végétale, majoritairement composée de lignocellulose, est la première ressource énergétique renouvelable sur la planète et présente l'intérêt d'utiliser l'énergie solaire pour produire des carbohydrates telle que la cellulose. Cette fraction cellulosique est convertie par des cellulases fongiques en sucres fermentescibles lors du processus de production de bioéthanol de deuxième génération [9] dont les étapes sont résumées dans la figure 2. Le procédé comprend quatre principales étapes : un prétraitement physicochimique, une hydrolyse enzymatique du substrat prétraité via l'utilisation des enzymes (hémi-) cellulolytiques, une étape de fermentation éthanolique par un microorganisme alcooligène et

une séparation de l'éthanol produit par distillation. L'efficacité du procédé requiert aujourd'hui une amélioration globale de chacune des étapes afin d'obtenir un procédé performant quelque soit la nature des substrats lignocellulosiques utilisés. Le procédé le plus simple est appelée SHF (Saccharification Hydrolysis and Fermentation). Il existe cependant des procédés plus intégrés réalisant la saccharification et la fermentation de manière simultanée (SSF) [10].

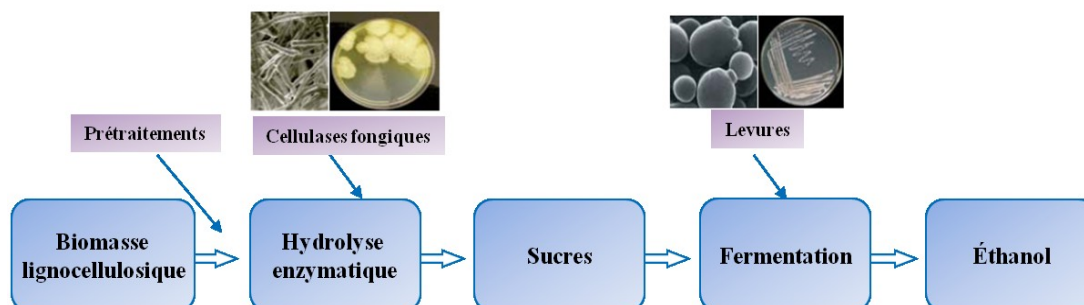


Figure 2: Schéma du procédé de fabrication de bioéthanol de deuxième génération.

L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique est réputée difficile en comparaison avec les ressources amylacées. Elle requiert l'action synergique de plusieurs enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et éventuellement des hémicelluloses dans un système réactionnel hétérogène. L'efficacité d'une telle machinerie dépend des interactions entre les enzymes cellulolytiques, les composants chimiques de la biomasse végétale et les produits formés. L'identification des verrous à la transformation efficace de la cellulose représente un apport intéressant au processus de bioraffinerie pouvant conduire à la réduction du coût de fabrication du bioéthanol de deuxième génération afin qu'il devienne compétitif par rapport aux autres filières.

Après cette introduction générale exposant le contexte de l'étude, le manuscrit comporte une étude bibliographique approfondie concernant la structure et la composition chimique des parois végétales des graminées, les mécanismes d'hydrolyse enzymatique des parois lignocellulosiques et le mode de production des enzymes cellulolytiques. Les résultats de nos recherches sont présentés dans les chapitres III, IV et V. Une annexe a été également rajoutée au chapitre V. La discussion de ces résultats et les principales conclusions sont regroupées dans le chapitre VI. L'ensemble des références bibliographiques sont regroupées en fin du manuscrit.

CHAPITRE I

Etude bibliographique

Etude bibliographique

1 La biomasse lignocellulosique

La biomasse végétale destinée à la production de bioéthanol de deuxième génération peut provenir de déchets agricoles (paille de blé, de riz, d'orge...) et forestiers (peuplier, épicéa, pin...) ou bien être issue de cultures pérennes ou annuelles (switchgrass, bermudagrass etc.) [11, 12]. Les cultures à vocation énergétique ne nécessitent en principe que peu d'intrants et d'eau en comparaison avec les cultures à destination alimentaire. La plupart des plantes explorées aujourd'hui à des fins énergétiques sont des graminées qui appartiennent au groupe des monocotylédones [13]. Le miscanthus est l'une des plantes les plus prometteuses en raison de ses hauts potentiels de rendement de production de biomasse.

1.1 L'espèce candidate *Miscanthus x giganteus*

Anderson fut le premier à décrire la plante miscanthus en 1885. Les espèces du genre "Miscanthus" sont d'origine tropicale ou subtropicale. Elles sont essentiellement retrouvées en Asie du sud-est, au Japon et dans le sud-est de l'Afrique. L'implantation du miscanthus en Europe (Danemark) remonte à 1935 avec l'introduction de rhizomes de l'espèce *Miscanthus x giganteus* prélevés à Yokohama (Japon) montrant un fort potentiel de croissance de cette plante [14].

Actuellement, le genre *Miscanthus* est composé de 20 espèces classées dans 4 sections : Kariyasua, Diandra, Triarrhena et Eumiscanthus [15]. Les critères anatomiques de la panicule florale du miscanthus permettent de distinguer une espèce d'une autre. L'espèce *Miscanthus x giganteus* est la plus étudiée en raison de son potentiel élevé de production en biomasse. Elle est le résultat du croisement interspécifique des deux parents *Miscanthus sacchariflorus* (section « Triarrhena ») et *Miscanthus sinensis* (section « Eumiscanthus ») ayant des caractères anatomiques différents. Cette même espèce est retrouvée dans plusieurs revues sous d'autres appellations telles que «*Miscanthus sinensis giganteus*» ou «*Miscanthus x ogiformis Honda giganteus*». D'après la classification taxonomique établie par Greef & Deuter 1993 [14], cette espèce est décrite comme une monocotylédone pérenne qui appartient à la classe des Angiospermes et à la famille des Graminées.

Le miscanthus est une graminée vivace à rhizomes caractérisée par un métabolisme photosynthétique de type C4 et fait partie du même groupe taxonomique que la canne à sucre.

Ce métabolisme permet de transpirer essentiellement la nuit et d'utiliser plus efficacement le CO₂ en comparaison avec les plantes ayant un métabolisme de type C3 pour fabriquer de la biomasse lignocellulosique. Ceci explique pourquoi, dans les environnements chauds et secs où elles ont initialement évolué, les plantes de type C4 utilisent plus rationnellement l'eau et ont une production de biomasse supérieure à celle des plantes de type C3 [16]. Cependant, cette efficacité requiert souvent une luminosité importante, de l'humidité et un environnement chaud [17]. Or ce n'est pas le cas du miscanthus, qui est capable de conserver une bonne capacité de conversion en biomasse à basse température, autorisant une bonne croissance dans ces conditions.

Les essais d'implantation du miscanthus, en tant que plante énergétique, ont été essentiellement réalisés en Europe et ce depuis 1983 où des études ont montré des rendements proches de 20 tonnes de matière sèche par hectare [18]. Encouragés par ces résultats, de nombreux pays européens, notamment le Danemark, ont mis en place des essais de production de miscanthus pour en déterminer les avantages et les limitations. Il a ainsi été montré une forte productivité et des besoins réduits en fertilisants et en pesticides. Cette productivité est cependant sensible aux variations de température et de pluviométrie. Les jeunes plants de miscanthus apparaissent très sensibles aux basses températures durant la première année de culture [19, 20]. Les données concernant la France sont fournies par les essais réalisés à l'INRA au niveau des sites de Grignon, Lusignan et Estrées Mons [21]. D'autres espèces de miscanthus ont également été expérimentées en Europe pour leur potentiel en biomasse et autres caractéristiques agronomiques [22]. Des essais ont également été réalisés en Amérique du nord pour évaluer l'adaptabilité et la productivité du miscanthus dans ces régions [23].

Le miscanthus repousse chaque année à partir des rhizomes et nécessite une seule phase d'implantation pour plus d'une quinzaine d'années de culture. L'apport d'intrants est nécessaire en première année pour favoriser le développement des racines et restreindre la concurrence des mauvaises herbes qui sont limitées par la suite grâce à la formation d'une litière de surface. Ceci rend cette plante mieux adaptée aux exigences en terme d'impact sur l'environnement local (utilisation de pesticides) et global (émission de gaz à effet de serre) [19, 24, 25]. La croissance rapide du miscanthus se traduit par l'apparition de tiges pouvant atteindre 3 à 4 mètres de hauteur maximale dès l'automne. La période hivernale correspond à mobilisation des éléments nutritifs vers les rhizomes en hiver (vers février), la chute des feuilles et un dessèchement de la plante. La récolte de la biomasse peut être réalisée selon

deux modalités : soit en récolte dite précoce, à l'automne, soit en récolte tardive, en hiver, après la chute des feuilles et le dessèchement de la plante [19].

1.2 Anatomie et structure de la biomasse aérienne du miscanthus

La tige représente l'essentiel de la biomasse aérienne du miscanthus (80 %) [26] et se caractérise par la présence de feuilles et de leurs gaines insérées au niveau des nœuds. Les segments de tige formés entre ces zones sont appelés entre-nœuds (figure 3). La biomasse aérienne récoltée en hiver est donc principalement constituée d'entre-nœuds riches en parois lignocellulosiques. Des analyses chimiques ont montré une certaine variabilité de la teneur en cellulose, hémicelluloses et lignine en fonction de la date de récolte et en fonction du type d'organe aérien [27, 28]. La cellulose est le composant majoritaire des structures pariétales de la tige (40 à 50 % de matière sèche "MS") suivi des hémicelluloses (17-25 % de MS) et des lignines (20-25 % de MS).

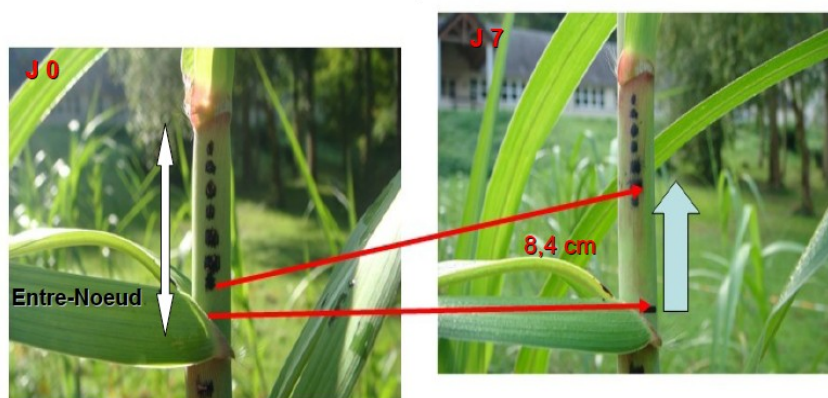


Figure 3: Illustration de la croissance d'un miscanthus [29].

L'architecture tissulaire de la tige des graminées se distingue de celle des dicotylédones par l'absence de méristème secondaire (cambium). Généralement, une couche de cellules à parois épaisses, formant le sclérenchyme épidermique, est observée en périphérie des entre-nœuds. Les tissus conducteurs, entourés de cellules sclérenchymateuses, forment des faisceaux vasculaires répartis sur toute la surface de la tige. Entre ces faisceaux s'intercalent des cellules à parois plus fines formant le parenchyme. Cette organisation tissulaire est commune à plusieurs tiges de graminées telles le miscanthus (*Miscanthus x giganteus*), le maïs (*Zea mays*), la canne à sucre (*Saccharum sp*), le bermudagrass (*Cynodon dactylon*), le switchgrass (*Panicum virgatum*). La figure 4 illustre un exemple de cette organisation de la tige du maïs.

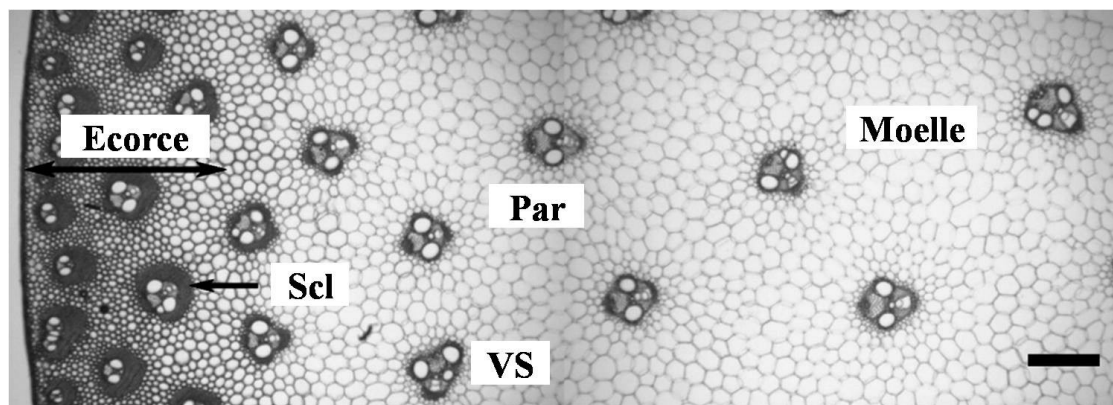


Figure 4: Vue partielle d'une coupe transversale d'un entre-nœud de tige de maïs [30].

Echelle = 500 μ m, Par : parenchyme, Scl= sclérenchyme, VS : vaisseaux.

Les cellules végétales renferment une fraction dite soluble qui regroupe plusieurs composés chimiques tels que les protéines, les glucides non pariétaux et les lipides membranaires. La plupart de ces composés sont facilement extractibles à l'eau chaude (sucres libres sous forme d'amidon), à l'éthanol (les phénols libres) ou à l'éthanol toluène (résines, cires, pigments). A l'exception des espèces ou organes riches en polyphénols, ces composés présenteraient peu d'obstacles à la dégradation enzymatique de la fraction lignocellulosique, non soluble. La nature de la fraction soluble et sa teneur varient selon les espèces, les organes et surtout le stade de maturité de la plante. Il a ainsi été démontré que cette fraction diminue considérablement dans les tissus lignifiés ayant atteint leur stade de maturité [31].

1.3 Les parois lignocellulosiques

1.3.1 Organisation structurale de la paroi végétale

La cellule végétale des biomasses lignocellulosiques est entourée d'une paroi relativement rigide. Cette rigidité est conférée par la l'organisation composite et la lignification des parois. La paroi évolue en fonction de l'âge des tissus végétaux et présente un aspect pluristratifié avec la lamelle moyenne qui assure la jonction entre les cellules, la paroi primaire, et la paroi secondaire [32] (figure 5).

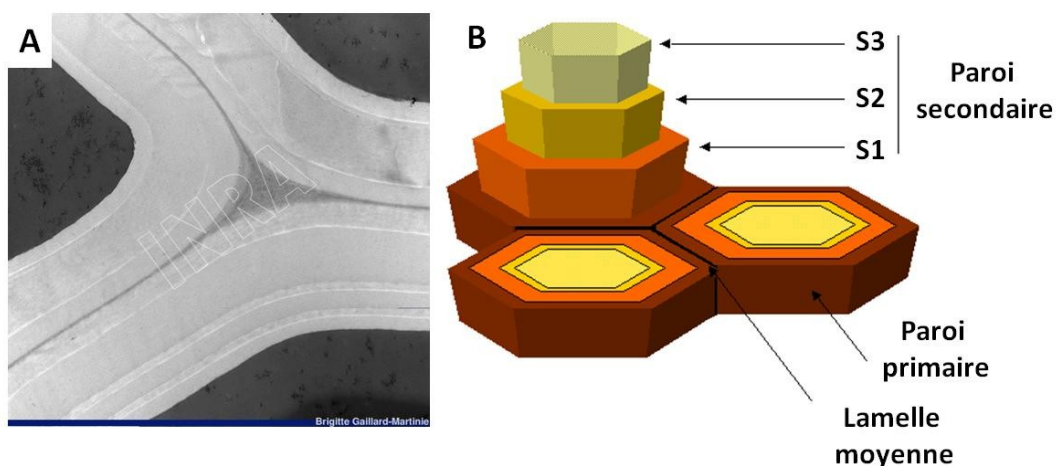


Figure 5: Organisation structurale des parois lignocellulosiques.

Structure pluristratifiée des parois observée au microscope électronique (A) [33] et leur représentation schématisque (B) : Lamelle moyenne (LM), paroi primaire (I) et strates S1, S2 et S3 de la paroi secondaire (II)

La lamelle moyenne sépare les parois primaires de deux cellules végétales contiguës. La paroi primaire est constituée de microfibrilles de cellulose, d'hémicelluloses et de faibles quantités de pectines. On y trouve également des protéines (glycoprotéines et enzymes) et des ions associés à l'eau et la cellulose. L'ensemble lamelle moyenne et paroi primaire est alors d'une épaisseur de 0,1 à 0,2 μm [34-36]. La paroi secondaire est formée quand la phase d'expansion cellulaire ralentit et se caractérise par un dépôt important de cellulose et hémicelluloses. Cette paroi, généralement la plus épaisse, comprend trois sous-couches S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne) qui diffèrent par l'orientation des microfibrilles de cellulose (figure 5) [37]. La paroi a alors une épaisseur de 1 à 3 μm , voire plus. Aux stades de maturation avancés, les lignines commencent à se déposer au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire puis la paroi secondaire. Cette dynamique de la formation des parois génère des gradients de composition dans les strates pariétales; la lamelle moyenne et la paroi primaire ont des concentrations en lignines plus élevées que la paroi secondaire. De même, le long d'un entrenœud de tige de graminée, le degré de lignification varie entre la base et le sommet durant le développement pour s'homogénéiser à maturité de la plante [30]. La structure de la paroi varie donc en fonction de l'espèce mais aussi des conditions physiologiques.

1.3.2 Composition chimique de la paroi végétale

L'architecture moléculaire des parois lignifiées n'a pas encore été complètement élucidée, d'où la difficulté de prédire d'éventuels obstacles à la dégradation enzymatique de parois lignocellulosiques lors de la production de bioéthanol de deuxième génération. Ce complexe hétérogène s'organise autour de trois principaux biopolymères : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines [38].

1.3.2.1 La cellulose

C'est la molécule organique la plus abondante sur terre [39] et le constituant principal des biomasses lignocellulosiques (35 à 50 %). La cellulose est un homopolymère non ramifié résultant de l'enchaînement d'unités β -D-glucose [39, 40]. Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation (DP), peut-être compris entre 100 à 14000 en fonction de l'origine botanique de la cellulose et de la strate pariétale. Ce taux de polymérisation varie aussi en fonction des prétraitements physiques et chimiques appliqués lors des procédés de purification ou de traitement de la biomasse. Le DP de la cellulose dans les parois secondaires est de l'ordre de 13000 à 14000, alors qu'il est plus faible dans les parois primaires avec un DP variant entre 2000 et 6000 [41, 42]. Les monomères β -D-glucose sont reliés entre eux par des liaisons glycosidiques β -(1,4). Le cellobiose, motif de base de la cellulose est formé par deux unités glucose. Sa longueur estimée est de 1,03 nm (figure 6). De multiples liaisons hydrogènes intrachaînes confèrent une linéarité à la chaîne de glucose. Les chaînes linéaires de cellulose sont associées entre elles par de nombreuses liaisons hydrogène ainsi que des interactions de Van Der Waals, conduisant à la formation de microfibrilles dont le diamètre varie de 2 à 4 nm chez les plantes supérieures [43].

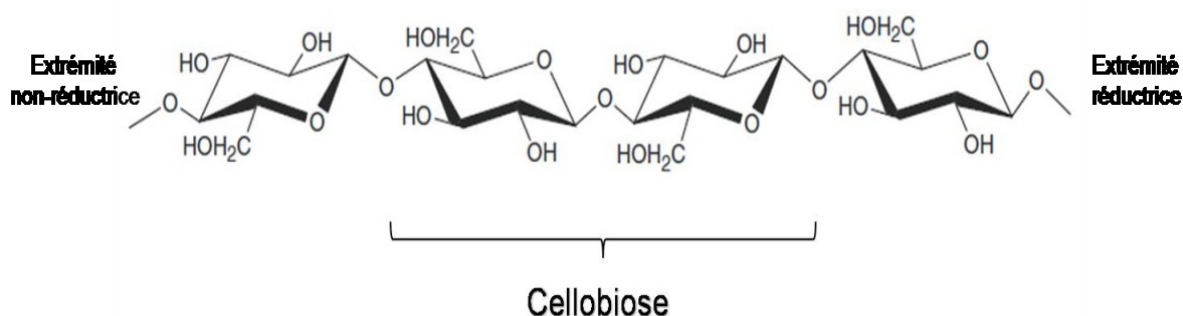


Figure 6: Structure de base de la cellulose.

Les microfibrilles de celluloses sont orientées en parallèle formant des domaines cristallins alternant avec des zones amorphes. Le degré de cristallinité, inférieur à 50 % dans les parois primaires, peut être plus important dans les parois secondaires [41, 44-46]. Cette cristallinité rend la cellulose insoluble dans la plupart des solvants (eau, solutions alcalines diluées, solutions acides...etc.) et particulièrement résistante à l'hydrolyse enzymatique [47]. Il a été démontré que les formes cristallines natives peuvent être transformées en d'autres polymorphes après traitements thermochimiques [9].

1.3.2.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses regroupent un ensemble d'hétéropolysaccharides représentant environ 20 à 40 % de la lignocellulose [48]. Ces polysaccharides comportent un squelette composé de résidus β -(1,4)-D-pyranose où le C1 et le C4 sont en position équatoriale (Figure 7). La chaîne principale peut être ramifiée par des substitutions ou de courtes chaînes latérales pour former des groupes de sucres hétérogènes. Les sucres monomères sont constitués de sucres neutres, de type pentose (xylose et arabinose) et hexose (galactose et mannose) ainsi que des acides uroniques (acide galacturonique et acide glucuronique) [49].

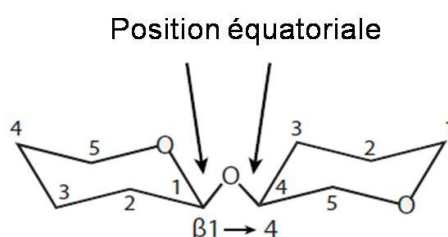


Figure 7: Structure de base du squelette β -(1,4) des hémicelluloses.

Ces constituants vont donner naissance à des composés de structures variables en fonction de l'espèce, des tissus ainsi que de leur stade de maturité à l'instar des autres constituants pariétaux [50, 51]. Les hémicelluloses sont classés en quatre grands groupes :

Les xyloglucanes : Il s'agit de chaînes formées d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons β -(1,4) et de courtes chaînes latérales de xylose. Les xyloglucanes sont essentiellement présents dans les parois primaires.

Les xylanes : Ce sont des polymères linéaires dont la chaîne principale est constituée d'unités xylose liée en β -(1,4) et ramifiée par des substituants en proportion variable (arabinose,

arabinose féruloylé, groupes acétyles, acides glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthyle). Les xylanes sont majoritaires chez les angiospermes.

Les mannanes : Ils sont formés d'unités mannose et glucose liées en β -(1,4) et sont absents chez les graminées et présents en faible proportion chez les Angiospermes.

Les β -glucanes : formés d'unités D-glucose reliées entre elles par des liaisons β -(1,3) ou β -(1,4), ce sont des constituants minoritaires des tissus lignocellulosiques.

La distribution de ces hémicelluloses varie considérablement en fonction des groupes taxonomiques et de la couche pariétale (tableau I).

Tableau I: Distribution des hémicelluloses au sein des parois végétales [49].

	Graminées		Dicotylédones	
<i>Hémicelluloses</i>	<i>Paroi</i>	<i>Paroi</i>	<i>Paroi</i>	<i>Paroi</i>
<i>(% de matière sèche)</i>	<i>primaire</i>	<i>secondaire</i>	<i>primaire</i>	<i>secondaire</i>
Xyloglucanes	2-5	Mineur	20-25	mineur
Arabinoxylanes	20-40	40-50	5	mineur
Mannanes	2	0,5	3-5	2-5
β-glucanes	2-15	Mineur	absent	absent

Les arabinoxylanes sont les hémicelluloses majoritaires des parois végétales des graminées. Les résidus D-xylose de la chaîne principale sont principalement substitués par des résidus L-arabinose en *O*-2 et/ou *O*-3 avec de plus faibles proportions en substituants acétyle ou glucuronique. Chez les graminées, les résidus arabinoses sont également estérifiés par l'acide férulique (FA) en position *O*-5 (figure 8) [49, 52].

L'acide férulique réagit sous l'action d'enzymes oxydatives (peroxydases, laccases etc.) engendrant des radicaux phénoxyles. Cette configuration permet le couplage radicalaire, non enzymatique, donnant naissance à des déhydrodimères (di-FA), déhydrotrimères (tri-FA) et déhydrotetramère (tétra-FA) (figure 9) [53-60]. Ces structures, les di-FA notamment, ont été trouvées dans les parois végétales des graminées et contribuent à la réticulation des chaînes d'arabinoxylanes [61].

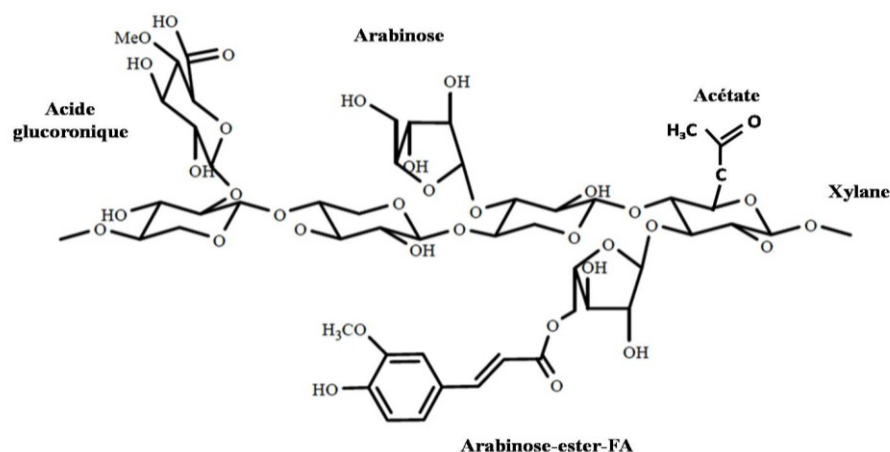


Figure 8: Structures chimiques d'une chaîne de xylane réticulée par de l'arabinose, de l'arabinose estérifié, de l'acide glucuronique et de l'acétate.

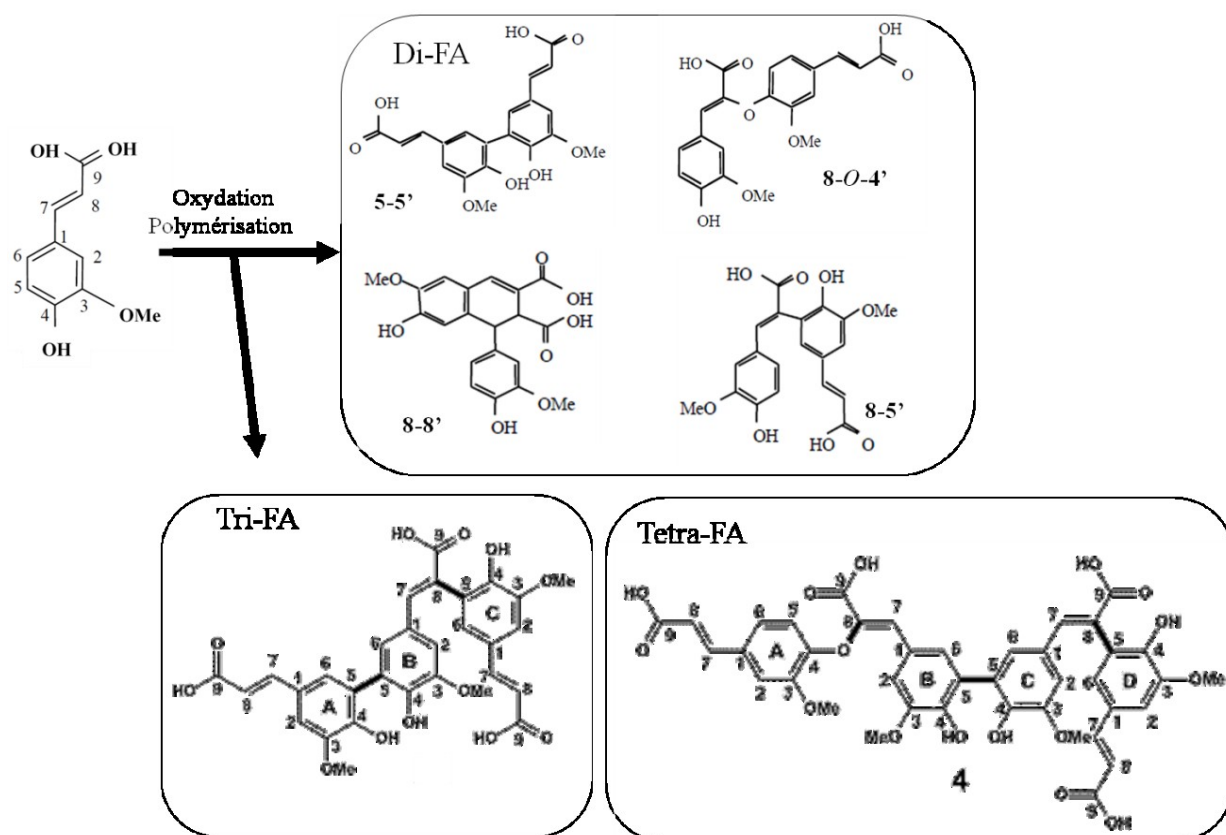


Figure 9: Représentation schématique d'oligomères d'acide férulique.

(Adapté de Bunzel M. et *al.*, 2007 [60]).

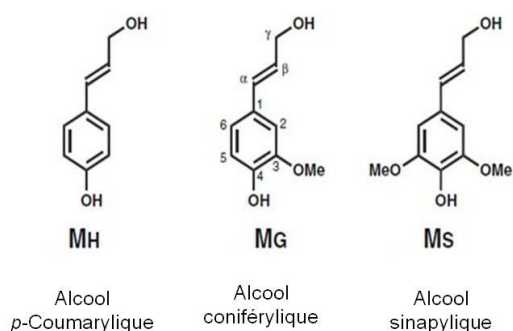
Une étude récente a révélé que les hémicelluloses du miscanthus sont majoritairement constituées de xyloses (18 %) essentiellement substitués par de l'arabinose (1,53 %) et des groupes acétyles (3,46 %) [28]. Différentes formes de di-FA ont été identifiées au sein des parois de l'espèce *Miscanthus x giganteus*. Ces dimères renferment essentiellement des liaisons de type 5-5 et 8-O-4' et dans une moindre mesure des liaisons de type 8-5 et 8-8' [62].

1.3.2.3 Les lignines

Les lignines sont des polymères phénoliques dont la teneur varie de 15 à 25 % de la paroi végétale chez les graminées [61, 63]. Ce polymère donne une résistance physique aux plantes ainsi qu'une protection contre les agressions externes de type biologique ou chimique.

La lignine, du latin «*lignum*» qui signifie bois, est le terme générique utilisé pour désigner des composés polyphénoliques réticulés résultant de la condensation radicalaire de trois alcools phénylpropène ou monolignols: l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Ils diffèrent par leur degré de méthylation et sont les précurseurs des unités *p*-hydroxyphényle (H), guaiacyle (G) et syringyle (S) (figure 10) [61, 64-66].

(a) Monolignols



(b) Unités de lignines

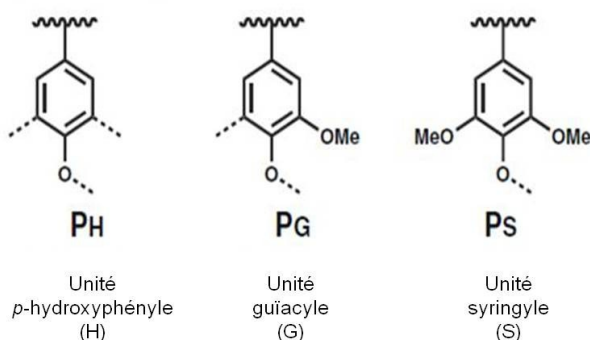
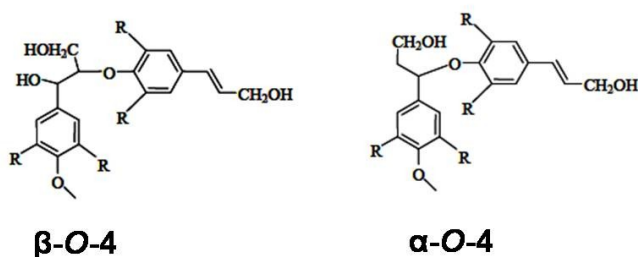


Figure 10: Structures des alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (a) précurseur des lignines H, G et S respectivement (b). M : monomères de lignines, P : polymères de lignines. (D'après Ralph 2010 [56]).

La polymérisation des monolignols dans la paroi végétale débute par la génération de radicaux phénoxyles sous l'action des peroxydases et/ou des laccases. Ces radicaux très réactifs sont alors capables de se coupler spontanément établissant ainsi une liaison covalente

[67]. Ce mode de polymérisation conduit à différents types de liaisons intermonomères classées usuellement en fonction de leur réactivité. Les monomères de lignine sont reliés par des liaisons dites « condensées » (liaisons carbone-carbone et diaryle éther) et par des liaisons « non condensées » qui correspondent aux liaisons éthers labiles de type β -O-4 et α -O-4. Les liaisons β -O-4 sont généralement associées à la présence d'une proportion plus importante d'unité S pour former des chaînes relativement linéaires (figure 11-a). Les liaisons dites « condensées » de type carbone-carbone (5-5, β -5 et β - β) et diaryl éther (4-O-5) sont plus résistantes aux dégradations chimiques (figure 11-b) [61]. La complexité des lignines provient du caractère ni-ordonné et ni-répétitif de l'assemblage des trois unités H, G et S mais aussi en raison du grand nombre de liaisons intermonomériques.

(a) Liaisons labile , non-condensées



(b) Liaisons condensées

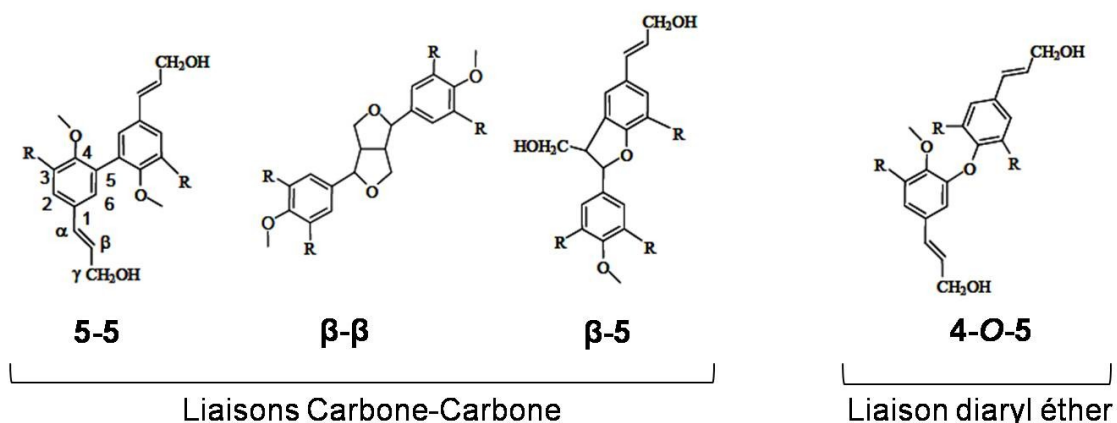


Figure 11: Exemples de liaisons éthers labiles (a) et condensées (b) entre monomères de lignines.

Les lignines varient donc par leur degré de méthoxylation et le type de liaisons intermonomères [64], en fonction de l'origine botanique, de la nature des tissus, des strates pariétales, des organes et de leur stade de maturation [61, 63, 68]. Dans le cas des graminées,

les lignines sont majoritairement constituées d'unités G et S associées à une faible proportion d'unités H (tableau II). De plus, elles sont caractérisées par la présence d'acides *p*-coumariques estérifiés essentiellement sur la position γ de la chaîne phénylpropanoïde des unités syringyles [63, 69].

La polymérisation de l'alcool coniférylique et de petites quantités de d'alcool *p*-coumarylique conduit à la mise en place de lignines de type G et H au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire [70]. Cet alcool coniférylique polymérise avec des quantités croissantes d'alcool sinapylique pour former des lignines de type G et S au niveau de la paroi secondaire [71, 72]. L'augmentation du rapport S/G peut donner une indication de l'évolution et de la maturité des lignines de la plante [73-75]. De nombreuses études ont également mis en évidence une augmentation du rapport S/G au niveau du sclérenchyme en comparaison avec le parenchyme chez les graminées [76, 77]. Ces différences de composition sont accompagnées par des variations structurales. Ainsi, les lignines de type G, principalement rencontrées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des graminées, montrent une structure très ramifiée due à un couplage *via* des liaisons essentiellement condensées. Dans la paroi secondaire des fibres, la lignine est formée par polymérisation d'unités de type G et S principalement connectées par des liaisons labiles de type β -O-4 [61].

Tableau II: Distribution molaire des unités de lignines H, G et S libérées après thioacidolyse (d'après Grabber *et al.*, 2004 [61]).

Exemple de graminées	Unités de lignines		
	H	G	S
Tige de maïs	4	35	61
Paille de blé	5	49	46
Paille de riz	15	45	40

L'étude des lignines des parois de tiges de miscanthus a montré un faible ratio S/G (0,7) et une prédominance des liaisons non-condensées β -O-4' [28]. Une forte proportion des *p*CA des parois du miscanthus sont sous formes estérifiés [28, 62]. Ceci confirme les résultats montrés sur d'autres graminées où l'accumulation d'esters de *p*CA est synonyme de lignification [56].

1.3.3 Interaction des composés pariétaux

La cohésion intrapariétale résulte de la mise en place de liaisons entre les polymères constitutifs lors de la formation des parois. Les domaines faiblement substitués des hémicelluloses tels que les xylanes peuvent établir un nombre important de liaisons hydrogène avec les microfibrilles de cellulose [78]. Les xylanes sont également susceptibles d'interagir de manière non covalente avec les lignines [79]. Des liaisons covalentes de type benzyle ester et benzyle éther sont également établies entre les substitutions d'hémicelluloses et les lignines pour donner un complexe LCC (Lignines Carbohydrates Complexes) [63]. La présence d'acides phénoliques ou hydroxycinnamiques pariétaux (1 à 3% en masse) est une des caractéristiques des graminées [56, 70, 80]. Si l'acide *p*-coumarique ne semble pas être un acteur majeur des interactions hémicelluloses-lignine, l'acide férulique est en revanche fortement impliqué dans la réticulation covalente des constituants pariétaux chez les graminées. Cet acide, estérifié à l'arabinose des hétéroxylanes *via* la fonction carboxylique, peut être par ailleurs associé à la lignine par des liaisons éthers (*via* le groupement hydroxyphényle) [81, 82]. Les dimères, trimères et tétramères féruliques peuvent être impliqués dans ce type de liaisons ajoutant de la complexité et de la robustesse à la matrice pariétale (figure 12). Ces structures agiraient en outre comme points d'initiation de la lignification [83].

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer l'organisation des polymères pariétaux [36, 41, 84-86]. La plupart des informations disponibles décrivent l'agencement des composants pariétaux au sein de la paroi primaire où les hémicelluloses sont étroitement liées aux microfibrilles de cellulose *via* des liaisons hydrogène inter et intrachaînes. L'architecture de la paroi secondaire, qui représente 70 à 80 % de la masse des entre-nœuds des tiges des graminées, reste encore mal connue. Les modèles actuels présentent la paroi comme une matrice amorphe et complexe où les microfibrilles de cellulose sont entourées d'hémicelluloses et de lignines. La dégradation biologique de la fraction cellulosique lors du processus de production de bioéthanol de deuxième génération est limitée non seulement par la présence des lignines (inhibition des enzymes cellulolytiques; interactions non productives) mais aussi par l'organisation même de la paroi végétale qui rend difficile l'accès de ces enzymes à la cellulose.

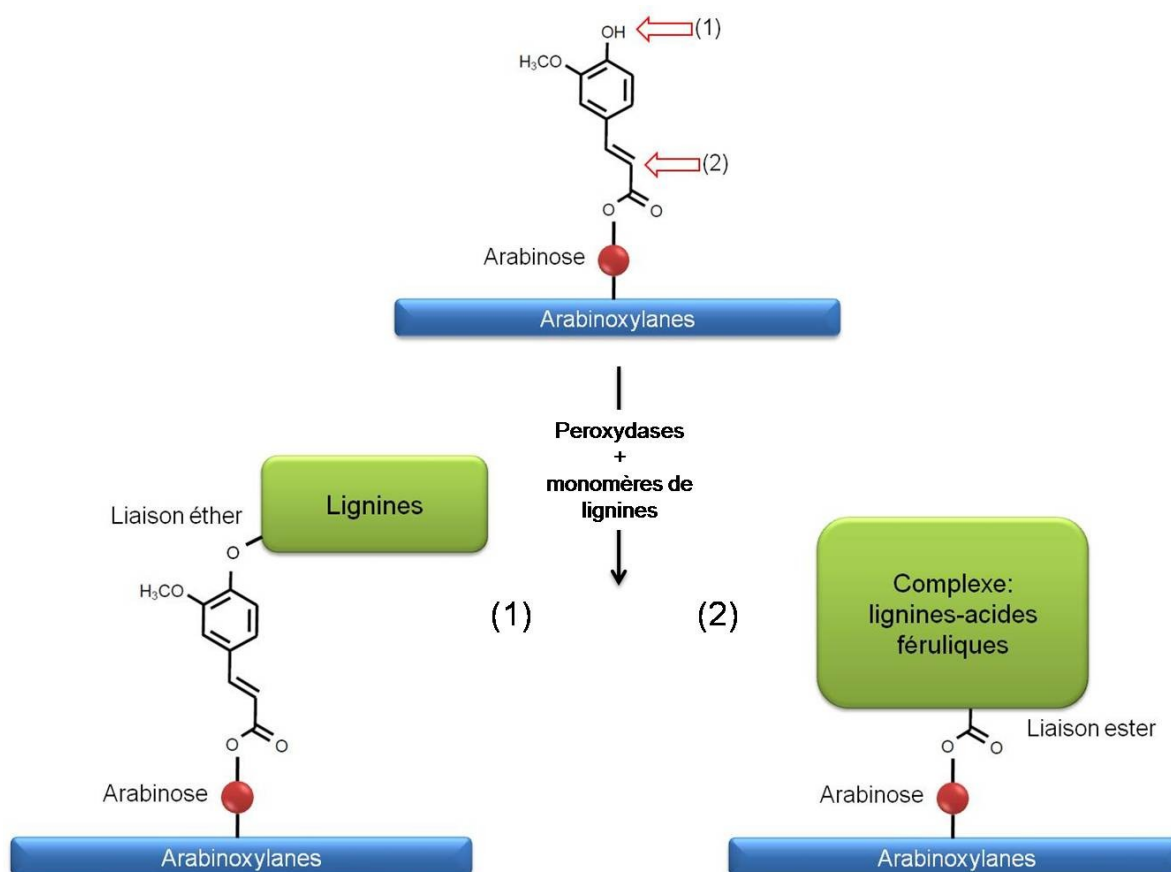


Figure 12: Représentation schématique des interactions arabinoxylanes-lignines via des liaisons (1) éthers ou esters (2). (D'après Ralph *et al.*, 1995 [83]).

2 Hydrolyse enzymatique des lignocelluloses

Les procédés actuellement étudiés font appel à des cellulases afin de convertir la cellulose, contenue dans les parois des tissus végétaux, en unités glucose fermentescibles en éthanol. Ces enzymes proviennent de microorganismes dits "cellulolytiques" qui utilisent les polysaccharides comme source d'énergie. Les cellulases sont soit sécrétées (cas des champignons filamenteux), soit associées à la surface externe des cellules donnant naissance à des complexes enzymatiques nommés cellulosomes (cas des bactéries) [87-89].

2.1 Production des glycosides hydrolases

Les cellulases utilisées en industrie proviennent essentiellement des champignons filamenteux tels que *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* et *Phanerochaete*. Dans le cas de la production de biocarburant de seconde génération, les souches industrielles de *Trichoderma reesei* sont parmi les plus efficaces en terme de potentiel de sécrétion de cellulases [90-94].

Le champignon filamenteux *Trichoderma reesei* est un anamorphe de la souche *Hypocrea jecorina* [95]. Il a été découvert accidentellement pendant la deuxième guerre mondiale, à cause de sa capacité à dégrader les matériaux militaires de l'armée américaine dans les îles Salomon [96]. Il s'agit d'un ascomycète mésophile dont le système cellulolytique est l'un des plus étudiés [97-99] si bien que cette souche a servi de modèle pour décrire la dégradation de la cellulose par les enzymes fongiques. Les gènes et les structures des hydrolases ainsi que les ébauches de modèle de régulation de production des cellulases et des hémicellulases ont d'abord été décrits chez *Trichoderma reesei* [100-106].

Plus récemment, le développement de nouvelles technologies, notamment le séquençage haut-débit, a permis d'obtenir le génome de *Trichoderma reesei* QM6a. Ce génome de 34 Méga paires de bases comprend 7 chromosomes et environ 9100 séquences codantes dont 200 séquences classées comme Glycoside Hydrolases [107]. Ceci permet aujourd'hui d'étudier les mécanismes de régulation et de sécrétions des cellulases de *Trichoderma reesei* via les outils "omiques" [99, 108, 109]. Les meilleures souches industrielles sont issues de programmes d'optimisation combinant l'action de différents agents mutagènes aussi bien chimiques (nitrosoguanidine, éthylméthylsulfonate) que physiques (rayonnements ultra-violets, irradiations par accélérateur linéaire). Les souches hyperproductrices atteignent des rendements de 100 g.L⁻¹ de protéines extracellulaires [110] et produisent une majorité de cellulases [111, 112]. L'une d'entre elle est la souche RUT C30 qui résulte de trois étapes d'optimisation (figure 13). Elle est aujourd'hui considérée comme une souche de référence et a été très largement étudiée [113, 114]. Le département de Biotechnologie de l'IFP Energies nouvelles a également participé, via une collaboration avec la société Cayla, à un des divers programmes ayant abouti à la fin des années 1980 à la création de ces souches hyperproductrices de cellulases [111]. La souche industrielle *Trichoderma reesei* CL847 de l'IFPEN, comme toutes les autres souches optimisées, provient de la seule et unique souche mère QM6a (Figure 13).

L'analyse des génomes de souches améliorées telle que *Trichoderma reesei* RUT C30 a mis en évidence un nombre important de modifications génétiques allant des mutations ponctuelles aux délétions de gènes. Ces modifications concernent différentes fonctions cellulaires telles que la transcription de gènes de cellulases, le transport nucléaire, la stabilité des ARNm et la sécrétion de cellulases. Les analyses transcriptomiques ont démontré par ailleurs que certaines de ces mutations affectent fortement l'assimilation du carbone [115].

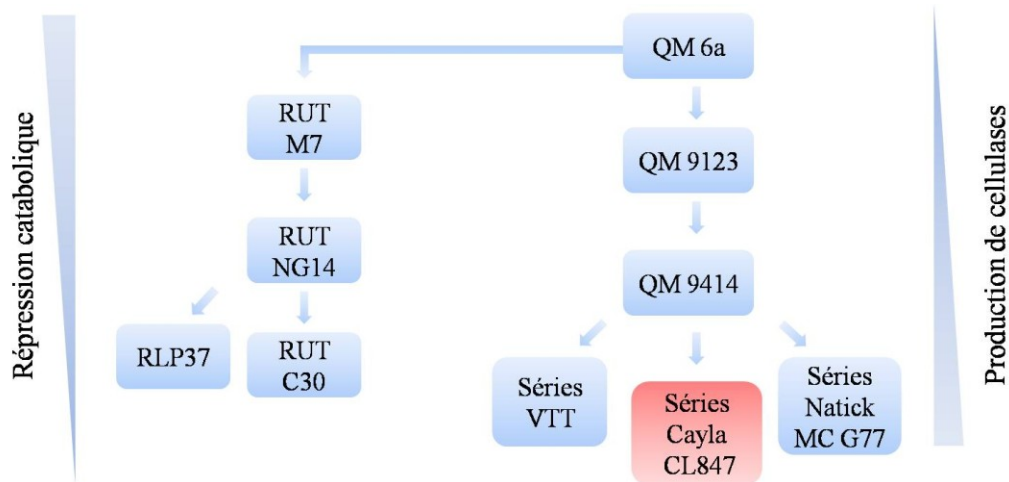


Figure 13: Généalogie de souches *Trichoderma reesei* hyperproductrices de cellulases.

La production d'enzymes cellulolytiques est soumise à une fine régulation au niveau transcriptionnel par la source de carbone présente dans le milieu de culture. Elle est induite en présence de cellulose et ses dérivés ou par ajout du disaccharide sophorose [116]. Cette induction peut également se produire dans un milieu contenant une source de carbone tel que le lactose, comme dans le cas d'une production industrielle [117]. Les souches naturelles de *Trichoderma reesei* disposent en effet d'un système de répression catabolique par le glucose qui réprime l'expression des gènes cellulolytiques via notamment un gène codant pour le répresseur CRE1 [118-120]. Ce système d'activation/répression fait intervenir plusieurs éléments, tels que les facteurs d'activation XYR 1 et ACE 2 et le facteur de répression ACE1, afin de permettre une production adéquate de cellulases et d'hémicellulases [121-123]. L'expression des gènes codant ces facteurs de transcription est altérée dans le cas de souches hyperproductrices de cellulases telle que CL847 [124]. Les souches industrielles dépourvues de ce mécanisme de régulation sont dites "déréprimées" à cause de la présence de glucose dans leur milieu de sélection au cours du processus d'optimisation par génétique classique. Bien que ces mécanismes de régulation soient peu connus, l'analyse du génome de ces souches montre qu'elles étaient dépourvues du gène *cre1*, démontrant ainsi son rôle central dans la répression catabolique par le glucose.

2.2 Fonctions et propriétés des glycosides hydrolases fongiques

2.2.1 Structure et organisation modulaire des glycosides hydrolases

Les glycosides hydrolases sont généralement caractérisées par une structure modulaire incluant un domaine catalytique (Catalytic Domain, CD) et un domaine de liaison aux polysaccharides (Carbohydrate Binding Module, CBM) qui permet l'ancrage de la protéine sur son substrat [125].

L'Union Internationale de la Biochimie et de la Biologie Moléculaire (UIBMB) propose une nomenclature (en EC number) basée sur le type de réactions catalysées par ces enzymes et leurs substrats. Les glycosides hydrolases forment un large groupe d'enzymes catalysant la rupture des liaisons *O*-glycosidiques (EC 3.2.1.x). Le dernier chiffre (x) varie en fonction du substrat transformé. Les cellulases et les xylanases appartiennent par exemple aux groupes EC 3.2.1.4 et EC 3.2.1.8 respectivement. Un autre système de classification tenant compte des aspects structuraux est aujourd'hui proposé et plus largement utilisé. Les glycosides hydrolases sont ainsi regroupées dans des familles notées GH classées en fonction de leurs similarités de structures [126, 127]. Ainsi chaque famille conserve le même mécanisme d'hydrolyse et la même stéréospécificité. La base de donnée CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes database) recense actuellement 130 familles de GH, dont certaines sont multifonctionnelles, et elle est continuellement mise-à-jour [128].

Les CBM sont constitués de 30 à 200 résidus d'acides aminés et permettent l'ancrage de l'enzyme sur son substrat [129, 130]. Ces structures ont été initialement dénommées CBD (Cellulose Binding Domains) en raison de la mise en évidence de plusieurs modules fixés à la cellulose [131, 132]. Ce terme a été retenu jusqu'en 1991 où il a été montré que ces modules peuvent être associés à des saccharides autres que la cellulose. Le terme CBD reste cependant utilisé pour désigner un CBM spécifique de la cellulose.

Les CBM sont classés en 64 familles (CAZy [133]) en fonction de leur homologie de structure primaire [131]. Ces familles présentent d'importantes variations de spécificité de fixation. On retrouve ainsi des CBM capables de reconnaître la cellulose cristalline, la cellulose non-cristalline, la chitine, les β -1,3-glucanes, des xylanes et des mannanes. Certaines familles de CBM ont une spécificité étroite vis-à-vis des ligands tels que la cellulose cristalline alors que d'autres familles ont la possibilité de se fixer à une large gamme de saccharides [134]. La résolution de la structure 3D de plusieurs familles de CBM a permis de

proposer une nouvelle classification en 7 superfamilles répertoriant les CBM en fonction de leurs repliements mais sans lien avec leurs fonctions [134]. L'analyse des informations structurales et fonctionnelles des CBM a permis de proposer une classification en trois groupes (tableau III).

Tableau III: Description des trois types fonctionnels de CBM (d'après Boraston *et al.*, (2004) [134]).

Type de CBM	Description	Ligands	Familles
Type A	CBM fixant la surface	Forme cristalline de cellulose et de chitine	1, 2a, 3, 5 et 10
Type B	CBM fixant les chaînes de glycanes	Forme amorphe de la cellulose, chaînes de β -xylanes	2b, 4, 6, 15, 17, 20, 22, 27, 28, 29, 34 et 36
Type C	CBM fixant de petits sucres	Mono, di, tri-saccharides	9,13, 14, 18 et 32

Les CBM sont reliés au domaine catalytique via un « linker » (séquence d'acides aminés riche en résidus Pro, Ser, Thr). Ce « linker » est protégé de la protéolyse par glycosylation. L'activité des glycosides hydrolases peut être influencée par la longueur de cette séquence qui peut en effet garder le domaine catalytique proche de la cible à hydrolyser. Un « linker » long permet aussi au CBM de fixer des zones peu accessibles et de rapprocher le domaine catalytique de la structure cible.

2.2.2 Les cellulases

2.2.2.1 Le CAZome de *Trichoderma reesei*

L'ensemble des enzymes cellulolytiques de *Trichoderma reesei* est présent dans la base de données CAZY (www.cazy.org). *Trichoderma reesei* produit trois catégories de cellulases, les endoglucanases (EG, 1,4- β -D-glucane glucanohydrolase; EC 3.2.1.4), les cellobiohydrolases, appelées aussi exoglucanase (CBH, 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) et les β -glucosidases (dites aussi cellobiase ou β -D-glucoside glucohydrolase, BGL; EC 3.2.1.21) [105]. La composition du système cellulolytique de *Trichoderma reesei* est résumée dans le tableau IV répertoriant l'ensemble des gènes avec leur ancienne et leur nouvelle désignation ainsi que leur répartition en famille de glycosides hydrolases.

Tableau IV: Liste des enzymes cellulolytiques de *Trichoderma reesei*.

Gènes	Protéines	Famille GH
<i>Cellobiohydrolases (EC 3.2.1.176)</i>		
<i>cbh1/cel7a</i>	CBH1/CEL7A	GH7
<i>cbh2/cel6b</i>	CBH2/CEL6B	GH6
<i>Endo-β-1,4-endoglucanases (EC 3.2.1.4)</i>		
<i>egl1/cel7b</i>	EG1/CEL7B	GH7
<i>egl2/cel5a</i>	EG2/CEL5A	GH5
<i>egl3/cel12a</i>	EG3/CEL12A	GH12
<i>egl4/cel61a</i>	EG4/CEL61A	GH61
<i>egl5/cel45a</i>	EG45/CEL45A	GH45
<i>cel74a</i>	CEL74A	GH74
<i>cel61b</i>	CEL61B	GH61
<i>cel5b</i>	CEL5B	GH5
<i>β-glucosidases caractérisées (EC 3.2.1.21)</i>		
<i>bgl1/cel3a</i>	BGL 1/CEL3A	GH3
<i>bgl2/cel1a</i>	BGL 2/CEL1A	GH1

2.2.2.2 Mode d'action des cellulases

Les enzymes cellulolytiques agissent de façon concertée sur les fibrilles de cellulose mais selon des modes très distincts et complémentaires (figure 14). Les endoglucanases fragmentent les chaînes situées à la surface des fibrilles où le degré de cristallinité est le plus réduit. Les deux types de cellobiohydrolases, CBH1 et CBH2, interviennent pour dégrader respectivement les extrémités réductrices et non réductrices des chaînes de cellulose disponibles, produisant ainsi du cellobiose. Le cellobiose est enfin converti en deux molécules de glucose grâce à l'action des β-glucosidases [135]. Une des particularités de ce système enzymatique est que ces trois familles de cellulases agissent en synergie. Une synergie dite « endo-exo », mise en évidence par Medve *et al.* (1998) [136], se produit par action des endoglucanases libérant de nouvelles portions de chaînes hydrolysables. Une synergie dite « exo-exo », démontrée pour la première fois par Kleman-Leyer *et al.* (1996) [137], s'établit

lorsque CBH1 ou CBH2, agissant respectivement aux extrémités réductrices et non réductrices des fibres, libèrent de nouvelles chaînes à hydrolyser [138, 139]. Une dernière synergie existe entre le système enzymatique endo/exo et les β -glucosidases, ces dernières convertissant le cellobiose qui est le principal inhibiteur des cellulases.

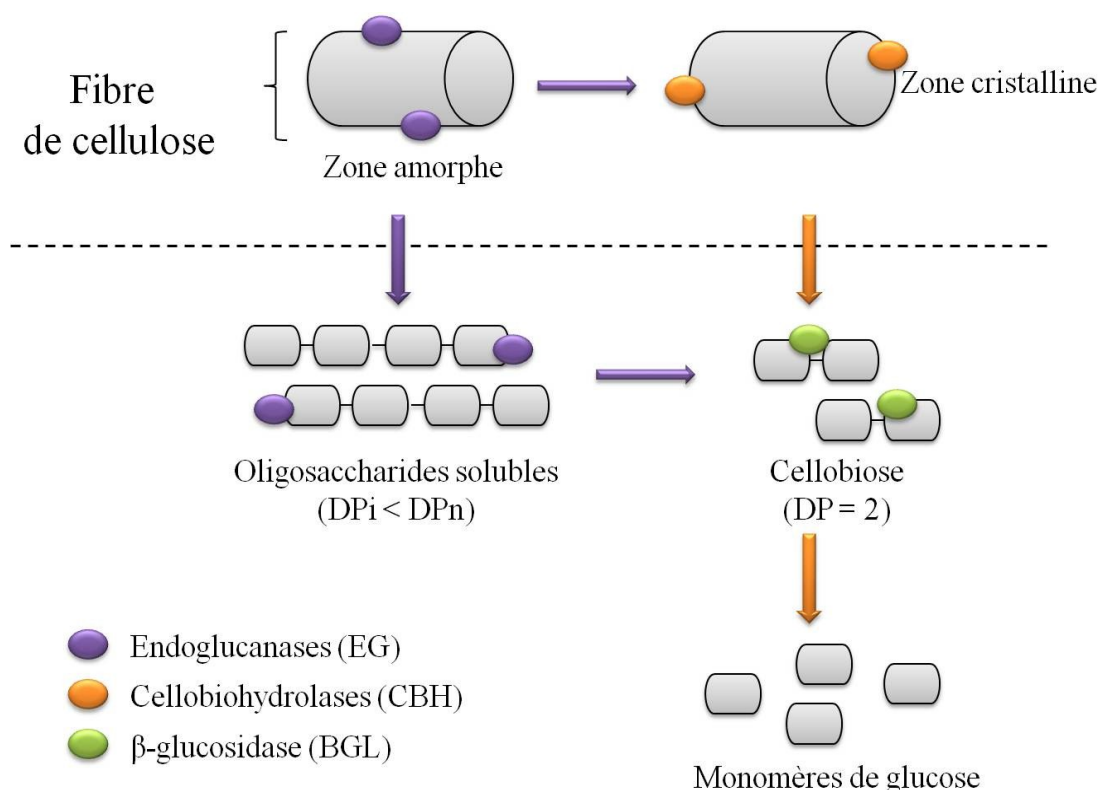


Figure 14: Mode d'action synergique des cellulases de *Trichoderma reesei* sur un substrat cellulosique.

2.2.2.3 Structure modulaire des cellulases

Les principales cellulases de *Trichoderma reesei* ne possèdent que des CBM de type 1 capables de se fixer à la cellulose. Le domaine catalytique et le CBM sont séparés par un « linker » fortement glycosylé (figure 15). Cette glycosylation résulte de modifications post-traductionnelles (maturation) ayant lieu avant la sécrétion des cellulases. Des études ont pu montrer que la production de cellulases par d'autres systèmes fongiques tels que *Aspergillus niger* n'est pas intéressante à cause du degré élevé de glycosylation des protéines excrétées, causant une forte baisse de l'activité cellulolytique [140].

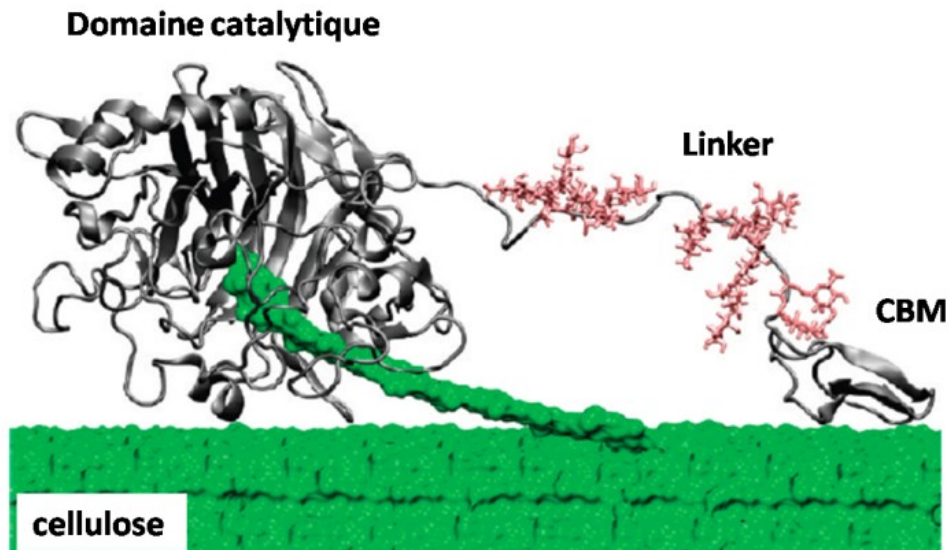


Figure 15: Représentation schématique de la structure modulaire de CBH I, et son mode d'action sur un substrat cellulosique. Les glycosylations sont montrées en rose sur le linker.
(D'après Beckham *et al.*, (2010) [141]).

L'élimination du CBM de type 1 des cellulases de *Trichoderma reesei* n'a pas d'incidence sur leur activité envers les substrats solubles alors que l'hydrolyse de la cellulose insoluble est fortement réduite [142]. Les CBM ont une taille très restreinte (33 à 40 résidus d'acides aminés) et comportent 4 à 6 cystéines qui leur permettent de créer 2 à 3 ponts disulfures. Le CBM permet ainsi aux cellulases d'agir sur la cellulose cristalline en déstabilisant ses liaisons hydrogène afin de rendre les chaînes polysaccharidiques plus accessibles au site actif. Chez *Trichoderma reesei*, toutes les enzymes cellulolytiques possèdent une structure CD-linker-CBM, à l'exception de l'endoglucanase EG3. L'importance industrielle que représentent les souches hyperproductrices de *Trichoderma reesei* a incité de nombreuses équipes de recherche à concentrer leurs efforts sur la caractérisation de leurs modes de fonctionnement. La structure tridimensionnelle du domaine catalytique de CBH1 [143], CBH2, EG1 [144] et EG3 ainsi que le domaine de liaison à la cellulose de CBH1 et EG1 ont en effet été résolus. Ces travaux ont permis de montrer que le site catalytique d'EG1 et EG3 est plus ouvert en comparaison de CBH1 et CBH2 (figure 16).

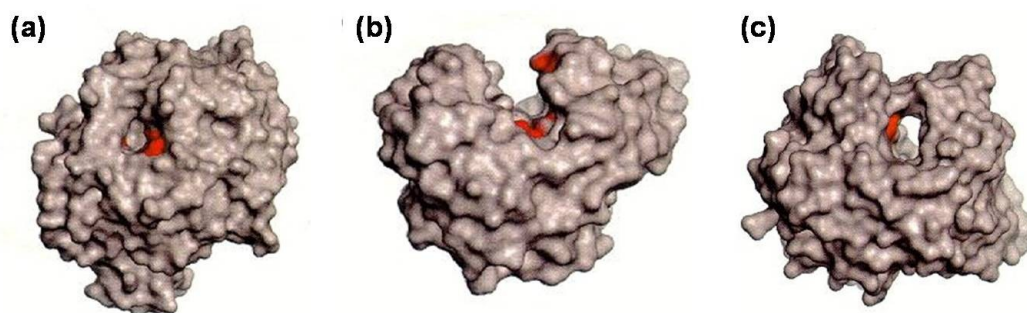


Figure 16: Les trois types de sites actifs principalement retrouvés chez les glycosides hydrolases. (a) La poche de la glucoamylase d'*Aspergillus awamori*. (b) La fente de l'endoglucanase EG2 de *Thermobifida fusca*. (c) Le tunnel de la cellobiohydrolase.

(D'après Davies et Henrissat 1995 [125])

2.2.3 Les hémicellulases

De nombreux microorganismes, dont *Trichoderma reesei*, produisent des enzymes extracellulaires capables de dégrader des polysaccharides non cellulotiques en monomères. Le génome de *Trichoderma reesei* renferme en effet au moins quatorze gènes d'hémicellulases, dont les xylanases XYN1 à XYN4 et dix autres gènes codant par exemple pour une β -xylosidase (BXL1), une mannanase (MAN1), une acétyl-xylane-estérase (AXE1) ou des arabinofuranosidases (ABF1-3) [99, 107] (Tableau V). Ces enzymes sont essentielles à la dégradation complète de la cellulose associée aux hémicelluloses. Ainsi, les hémicellulases participent grandement à la synergie enzymatique globale mise en place par les microorganismes pour dégrader les parois lignocellulosiques [98].

Tableau V: Liste des principales hémicellulases de *Trichoderma reesei*.

Enzymes	Liaison hydrolysée	EC number	Réf.
Endo-1,4- β -xylanase (XYN1, 2, 3 et 4)	β -(1,4) (xylane)	EC 3.2.1.8	[145]
β -D-xylosidase (BXL1)	β -(1,4) (xylobiose)	EC 3.2.1.37	[146]
Acétyl-xylane-estérase (AXE1)	liaison ester	EC 3.1.1.72	[147, 148]
Feruloyl-estérase (FAE)	liaison ester	EC 3.1.1.73	[149]
α -D-galactosidase (AGL1, 2 et 3)	α -(1,6)	EC.3.2.1.22	[150]
α -L-arabinofuranosidase (ABF1)	α -L-(1,2); α -L-(1,3) et α -L-(1,5)	EC 3.2.1.55	[151]
α -D-glucuronidase (GLR1)	α -(1,2)	EC 3.2.1.139	[152]

La dégradation des hémicelluloses nécessite l'action concertée de plusieurs enzymes présentant des spécificités différentes selon la composition et le type de liaisons hémicellulosiques. On se focalisera ici sur les événements impliqués lors de l'hydrolyse des hétéroxylanes, hémicelluloses majoritaires chez les graminées. L'hydrolyse de ces structures complexes nécessite l'action combinée des endoxylanases qui s'attaquent à la chaîne principale de xylane et d'autres enzymes accessoires, dites aussi débranchantes, qui ciblent les ramifications de cette chaîne. L'action des enzymes accessoires augmente l'accessibilité des endoxylanases aux chaînes de xylane (figure 17) [153].

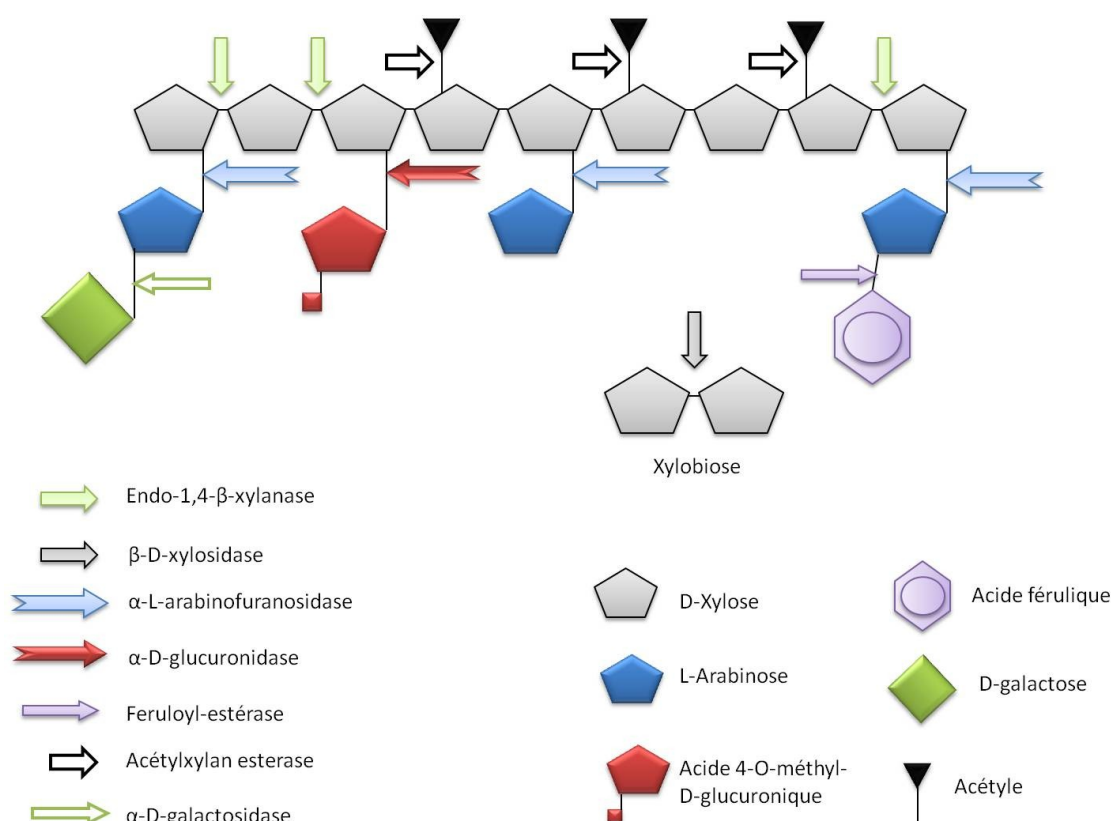


Figure 17: Représentation schématique des principaux sites d'hydrolyse enzymatique d'une chaîne d'arabinoxylane. D'après Aro *et al.*, 2005 [105].

2.2.3.1 Les endoxylanases

Les endo-1,4-β-xylanases, communément appelées endoxylanases ou xylanases, sont des O-glycosides hydrolases (EC 3.2.1.8) capables de rompre les liaisons β(1,4) entre deux résidus β-D-xylose de la chaîne principale des hétéroxylanes. Ces enzymes peuvent être d'origine bactérienne ou fongique [154, 155]. Plusieurs endoxylanases ont été identifiées dans le sécrétome de *Trichoderma reesei* (XYN1, XYN2, XYN3 et XYN4) [109, 156, 157]. Cette

multiplicité des endoxylanases serait probablement une stratégie mise en place par ce champignon filamenteux pour faire face à la grande hétérogénéité et la complexité structurale des hétéroxylanes. La variabilité structurale de ces enzymes a une incidence directe sur leurs propriétés biochimiques et catalytiques [146]. La transcription des gènes codant pour les endoxylanases est soumise à une régulation par les sources de carbone présentes dans le milieu de croissance [105]. La présence de cellulose, de xylane, de sophorose et de xylobiose induit la production des endoxylanases chez *Trichoderma reesei* [98]. À de faibles concentrations, le xylose est capable d'induire préférentiellement l'expression du gène *xynI* alors qu'à des concentrations plus élevées il réprime toute expression des xylanases [119, 158].

Les endoxylanases ont d'abord été classées en fonction de leurs poids moléculaires (PM) et leurs points isoélectriques (pI) [146] mais la découverte d'un grand nombre de xylanases a mis à mal cette classification qui ne prend pas en charge près du tiers de celles-ci. La classification CAZy permet aujourd'hui de classer les endoxylanases dans plusieurs familles de glycosides hydrolases. L'activité endo-1,4- β -xylanases a été retrouvée dans plusieurs familles : GH 5, 7, 8, 10, 11 et 43. Les principales endoxylanases se trouvent dans les familles GH 10 (Xyl-10) et GH 11 (Xyl-11) [159, 160].

2.2.3.1.1 Structure et fonctions des endoxylanases

Les endoxylanases présentent une structure tridimensionnelle contenant 13 feuillets β antiparallèles et une hélice α formant une crevasse où se situe le site actif. Deux résidus Glutamates sont impliqués dans la catalyse enzymatique. Certains résidus proches des glutamates du site catalytique contribuent à la thermostabilité et définissent le pH optimal des endoxylanases de *T. reesei*. Il a également été montré que le site catalytique des Xyl-10 est plus ouvert que celui des Xyl-11 lui conférant plus de souplesse et une meilleure affinité pour les petits fragments de xylooligosaccharides [161, 162]. Ces caractéristiques structurales confèrent des fonctions distinctes aux deux familles d'endoxylanases. Les enzymes de la famille GH10 (Xyl-10) sont capables de catalyser la rupture des liaisons glycosidiques jusqu'aux ramifications des arabinoses alors que celles de la famille 11 (Xyl-11), de par leur conformation, ne sont généralement capables d'agir que sur les résidus xyloses non substitués [162]. Néanmoins les enzymes de la famille 11 sont souvent plus efficaces sur les substrats complexes et insolubles.

3 Les structures pariétales récalcitrantes à l'hydrolyse enzymatique

Le développement du procédé de production de bioéthanol de deuxième génération par voie biologique en est au stade pilote aujourd'hui. Une des problématiques actuelles est de pouvoir franchir la barrière physique créée par les structures pariétales, ce qui nécessite des ajouts importants d'enzymes pour hydrolyser le substrat cellulosique. La présence de lignines et l'organisation structurale des parois lignocellulosiques joue en effet un rôle primordial dans la protection des sucres de la plante vivante contre les agressions physiques et microbiennes rendant ainsi difficile la transformation biologique des graminées à des fins énergétiques [163, 164].

3.1 Les limitations liées à l'accessibilité au substrat

Il existe plusieurs niveaux de résistance au sein de la biomasse lignocellulosique. La première limitation se situe au niveau tissulaire où l'architecture cellulaire des organes végétaux représente un frein à la pénétration des enzymes. Certains types cellulaires tels que l'épiderme, le sclérenchyme ou les faisceaux vasculaires, souvent très lignifiés, sont difficiles d'accès [165, 166]. Les enzymes doivent alors suivre les canaux naturels utilisés pour le transport de la sève ou dans les échanges intercellulaires au sein de la plante vivante [167]. La deuxième barrière à franchir pour les enzymes se trouve au niveau des parois cellulaires dont la porosité varie entre 5 et 25 nm [168-171] alors que la dimension d'une cellulase telle que CBH1 est de 5 nm X 5 nm X 12 nm [172, 173]. Ceci peut éventuellement limiter la pénétration et la progression des enzymes. Enfin, à l'échelle moléculaire, les glycoside hydrolases doivent se fixer spécifiquement sur une cellulose enrobée de la matrice hémicellulose-lignine [46]. Les lignines agissent à la fois comme une barrière physique limitant l'accès des enzymes mais peuvent également adsorber de manière irréversible certaines enzymes [174-176]. La substitution des hétéroxylanes par des acides féruliques et les liaisons interpolymères *via* les dimères d'acides féruliques représentent un frein à une hydrolyse enzymatique complète des polysaccharides pariétaux en réduisant l'accessibilité des enzymes fongiques [177, 178]. Les liaisons établies entre xylanes féruloylés et lignines limitent également la dégradabilité enzymatique des parois [179]. La présence de groupements acétyles sur les chaînes d'arabinoxylanes des graminées limite physiquement l'accès des endoxylanases à leur substrat [180]. L'élimination des acétates se traduit par une meilleure hydrolyse des xylanes facilitant ainsi l'accès des enzymes cellulolytiques aux glucanes [181].

L'impact des propriétés de la cellulose sur sa dégradabilité a fait l'objet de nombreuses recherches qui ont montré le rôle crucial de la structure cristalline en comparaison avec le degré de polymérisation [182-184]. La présence de fortes liaisons inter et intra chaînes au sein des feuillets de cellulose est un obstacle majeur à son hydrolyse enzymatique. En outre, la face hydrophobe des feuillets de cellulose est à l'origine de la mise en place d'une couche d'eau relativement dense empêchant l'accès aux enzymes [185, 186].

3.2 Inhibition au cours de l'hydrolyse enzymatique

Le ralentissement de l'hydrolyse enzymatique des parois lignocellulosiques avec l'avancement de la réaction ne peut être expliqué uniquement par l'épuisement du substrat hydrolysable [187, 188]. De nombreux travaux ont expliqué cette baisse d'efficacité par un effet inhibiteur des produits d'hydrolyse enzymatique, une diminution de la réactivité des substrats à cause de l'élimination des parties facilement hydrolysables et par la fixation non productive des cellulases aux lignines [189-191]. Le cellobiose et le glucose, générés en cours d'hydrolyse, ont été ainsi identifiés comme les principaux inhibiteurs de cellulases en se fixant à leur site actif [190, 192]. D'autres sucres, résultant de l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses, tels que le xylobiose et les xylooligosaccharides sont également inhibiteurs [193]. La présence de féruloyl-estérases (EC.3.1.1.73) dans le cocktail enzymatique sécrété par de nombreux champignon filamenteux permet de libérer des monomères et des dimères d'acides féruliques [194, 195] capables également d'inhiber l'hydrolyse enzymatique soit par fixation réversible aux cellulases, soit par adsorption à la cellulose.

4 Amélioration de l'hydrolyse enzymatique

Plusieurs voies sont explorées afin d'améliorer significativement les rendements de saccharification à partir de lignocelluloses. En particulier, une étape de prétraitement est nécessaire pour améliorer l'hydrolyse enzymatique. Elle a pour but de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes cellulolytiques qui sont capables de générer du glucose fermentescible en éthanol. Cette accessibilité du substrat est une étape clé dans le processus de saccharification [196, 197]. L'amélioration des prétraitements [198] et des performances des cellulases [199-201], le recyclage des cellulases [202], la réduction des coûts de production des enzymes [166] et la mise au point de plantes moins récalcitrantes [203] sont quelques unes des solutions étudiées.

4.1 Prétraitement de la biomasse

Les prétraitements permettent de rompre les liaisons covalentes formées au sein du complexe cellulose-hémicellulose-lignines, dégrader les hémicelluloses modifier et redistribuer les lignines et diminuer la cristallinité et le degré de polymérisation de la cellulose [9, 204, 205]. La figure 18 schématise l'impact des prétraitements sur les complexes lignocellulosiques.

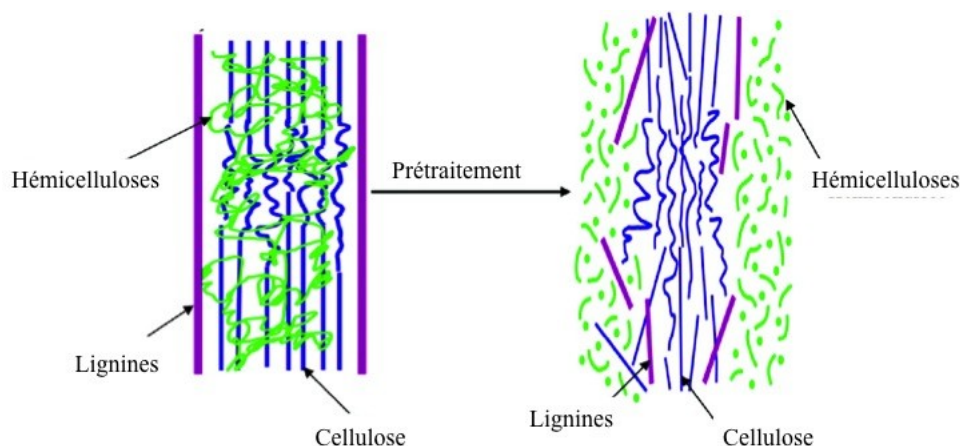


Figure 18: Représentation schématique de l'impact des prétraitements sur les complexes lignocellulosiques [205].

Le choix du prétraitement est étroitement lié à la structure du substrat lignocellulosique et à la nature des enzymes utilisées lors de la saccharification. Un prétraitement idéal doit : (1) améliorer la dégradabilité enzymatique des sucres, (2) éviter de dégrader la cellulose pariétale, (3) ne pas engendrer des sous-produits capables d'inhiber les cellulases ou les levures chargées de la fermentation, (4) être peu gourmand en énergie, (5) être efficace sur de la biomasse de taille moyenne (non-broyée) et (6) être rentable [204-206]. Les prétraitements peuvent être classés dans trois catégories : chimique, physique et biologique.

De nombreuses études ont montré que les prétraitements les plus efficaces font appel à des réactifs chimiques [204]. Bien qu'ils aient prouvé leur efficacité dans la délignification de la biomasse à destination énergétique, des produits chimiques tels que la soude et la potasse sont peu rentables en bioraffinerie en raison de leur coût élevé [206, 207]. Il en est de même pour des solvants organiques tels que l'éthanol et le méthanol [204, 208]. Les performances des prétraitements physiques ont également été étudiées. Le broyage, l'explosion à la vapeur et le traitement hydrothermal ont montré des efficacités insuffisantes au regard de leur coût de mise en œuvre [206, 209, 210]. Les prétraitements les plus étudiés et les plus prometteurs

seront exposés ci-après. Leurs principes d'action et leurs efficacités sur de nombreux substrats lignocellulosiques, dont les graminées, seront également abordés.

4.1.1 Prétraitement à l'acide dilué

Ce type de prétraitement a pour objectif de solubiliser les hémicelluloses et rendre la cellulose plus accessible aux enzymes cellulolytiques. Les acides dilués tels que l'acide sulfurique (H_2SO_4) et l'acide nitrique (HNO_3) à de faibles concentrations (moins de 4 %) dégradent préférentiellement les xylanes pariétaux en xylose sans dégrader la cellulose. La sévérité de ce procédé dépend de plusieurs facteurs tels que le temps de réaction, la température et la concentration de l'acide. Yang et Wayman (2004) [211] ont démontré que l'hydrolyse du xylane de la tige de maïs passait de 8 % à plus de 90 %, en augmentant la concentration de l'acide sulfurique et les temps de réaction. Ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence une corrélation entre l'élimination du xylane pariétal, qui représente plus d'un tiers de la matière sèche, et l'augmentation du rendement d'hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique [212].

L'impact de ce prétraitement a été largement exploré sur différents substrats lignocellulosiques. L'acide sulfurique dilué a ainsi été clairement montré responsable de l'augmentation du degré de cristallinité de la cellulose et de la réduction de la quantité de cellulose amorphe sous l'effet de températures élevées [213]. Des études de spectroscopie RMN ont également mis en évidence une augmentation du degré de condensation des lignines accompagnée d'une diminution des liaisons β -O-4 sous l'effet combiné de l'acide et de la température [213]. De récentes études microscopiques ont mis en évidence la présence de gouttelettes sphériques à la surface des parois cellulaires de tiges de maïs prétraitées à l'acide sulfurique dilué [214]. Des analyses spectroscopiques (FTIR et RMN) et immunocytochimiques (anticorps anti-lignines) démontrent la présence de lignines recondensées au sein de ces gouttelettes [215]. Les observations microscopiques suggèrent que ces lignines solubilisées migrent en dehors de parois cellulaires au cours du prétraitement avant de se redéposer aléatoirement à la surface des parois (figure 19). Ce phénomène augmenterait la porosité des parois lignocellulosiques et par conséquent améliorerait les rendements de saccharification. Les travaux menés par Ishizawa *et al.*, (2007) suggèrent que l'impact bénéfique de l'augmentation de la porosité sur la saccharification dépend de la qualité de la biomasse [170].

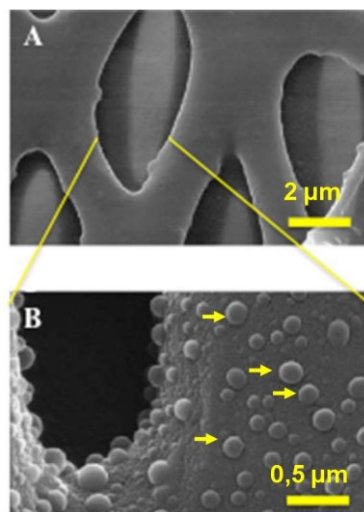


Figure 19: Formation de gouttelettes à la surface des parois du xylème de tiges de maïs avant (A) et après (B) prétraitement à l'acide dilué. Adaptée de Donohoe *et al.*, 2008 [215].

Une étude immunocytochimique a récemment mis en évidence une baisse du signal émis par les anticorps anti-xylane au centre des parois cellulaires des tiges de maïs prétraités avec 0,12M de H_2SO_4 à 140°C et 160°C. Ce même signal restait inchangé voire plus intense au niveau de la surface externe (cytoplasmique, proche lumen) des parois et au niveau de la lamelle moyenne [216]. Une éventuelle association des xylanes aux lignines solubilisées pourrait expliquer cette colocalisation.

Les prétraitements utilisant des acides dilués sont difficilement extrapolables au niveau industriel en raison de leurs coûts importants. Les températures élevées et la présence l'acide génèrent des composés furaniques tel que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural (HMF) à partir des pentoses et hexoses respectivement [217, 218]. Une petite partie des lignines est dégradée durant ce prétraitement libérant des composés aromatiques tels que les acides phénoliques connus pour leurs rôles inhibiteurs de la fermentation [219].

4.1.2 Prétraitement en milieux alcalins

Le principal objectif des prétraitements en milieux alcalins est de solubiliser la quasi-totalité des lignines. Des solutions alcalines, telle que la soude (NaOH), sont utilisées depuis longtemps dans l'industrie papetière pour les besoins de délignification et de blanchissement. Ces prétraitements représentent l'avantage de pouvoir se réaliser à température ambiante, évitant l'apparition de produits inhibiteurs, mais nécessitent une durée de traitement de quelques heures à quelques jours [205, 210].

Ce procédé a été largement étudié pour optimiser l'hydrolyse enzymatique des parois lignocellulosiques; plusieurs solutions alcalines ont été appliquées telles que la soude, l'hydroxyde de potassium (KOH), l'hydroxyde de calcium (Ca(OH)₂), l'ammoniac (NH₃) et l'urée (CO(NH₂)₂) [220, 221]. Ces solutions alcalines vont, en plus de l'élimination des lignines, éliminer les groupes acétates ou hydroxycinnamates substituant les hémicelluloses (essentiellement xylane), et rompre les liaisons esters au sein des parois. Cette hydrolyse libère ainsi les groupements acétyles, les acides féruliques et *p*-coumariques et les acides uroniques se traduisant par une diminution de l'encombrement stérique et une amélioration l'accessibilité de la cellulose [210, 222]. La cellulose est également rendue plus réactive en diminuant modérément sa cristallinité et son degré de polymérisation [205]. L'application de ce procédé à de nombreux substrats lignocellulosiques a montré une meilleure efficacité sur les graminées et les bois durs qui contiennent moins de 25 % de lignines [223]. La présence de nombreux groupements hydroxyles phénoliques sur les lignines des graminées explique l'efficacité de ce prétraitement [224].

Le coût élevé et la difficulté de recycler des solutions alcalines, telle que la soude, les rendent difficilement utilisables à l'échelle industrielle. L'ammoniac, de part sa volatilité, est plus facilement recyclée. Cette solution a été testée avec succès, à température ambiante ou modérée, sur plusieurs substrats tels que les tiges de maïs [225], la paille de blé [226, 227], le switchgrass [228] et le miscanthus [28].

4.1.3 Le prétraitement hydrothermique

Le prétraitement hydrothermique, également appelé thermolyse, est basé sur la cuisson à l'eau de la biomasse lignocellulosique à des températures de 180 à 230 °C durant environ 15 minutes [210]. Les études menées sur plusieurs substrats lignocellulosiques ont permis de montrer une solubilisation quasi-complète des hémicelluloses alors que 30 à 46 % des lignines sont éliminées en fonction des conditions opératoires [229]. La rupture des liaisons *O*-acétyle des hémicelluloses lors de ce prétraitement conduit à la libération d'acides organiques tels que l'acide acétique. Ces acides vont dégrader certains pentoses et hexoses monomériques pour former du furfural et de l'hydroxyméthylfurfural respectivement [210]. Ce phénomène ne concerne néanmoins que 3 % des hémicelluloses car ils sont majoritairement sous forme d'oligomères [230]. De nombreuses études ont été menées sur les mécanismes conduisant à une amélioration de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose via notamment l'impact de l'eau chaude sur les lignines. Les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) et en

microscopie à force atomique (AFM) ont relevé une relocalisation des lignines pariétales facilitant ainsi l'accès à la cellulose [231-233]. Ce prétraitement a également pour effet de réduire l'impact de la taille de la biomasse lignocellulosique avec apparition de micropores comme observé dans le cas du maïs [234].

4.1.4 Prétraitement par explosion à la vapeur

Ce prétraitement, qui peut être considéré comme une variante de la technique précédente, repose sur deux étapes. La première consiste en un vapocraquage de la biomasse lignocellulosique et à des températures allant de 160 à 260 °C (correspondant à des pressions de 10 à 50 bars). La vapeur diffuse à l'intérieur de la matrice pariétale et initierait une hydrolyse partielle des xylanes via l'acide acétique qui serait également susceptible de catalyser la rupture des liaisons éthers entre les xylanes et les lignines en clivant les liaisons éthers qui les reliaient aux lignines. La durée de cette étape varie de quelques secondes à quelques minutes. La deuxième étape consiste en une décompression explosive suite à une dépressurisation brutale, induisant un éclatement mécanique de la matrice pariétale. Les fortes températures appliquées sont à l'origine de la fusion des lignines, suivie de leur redistribution à la surface des fibres. Un lavage par un solvant organique comme l'éthanol permet de limiter d'éventuels effets inhibiteurs liés à la de cette re-déposition des lignines [235]. Ce remodelage de la matrice pariétale assure une meilleure accessibilité des enzymes à la cellulose qui est également affectée par ce prétraitement [205, 236].

La sévérité de ce prétraitement dépend fortement de la pression appliquée (donc de la température) et de la durée de l'exposition à la vapeur [236, 237]. Plus le temps de rétention est élevé, plus complète sera l'hydrolyse des hémicelluloses mais ceci s'accompagne d'un risque de formation de produits inhibiteurs de la fermentation tels que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural [238]. Ce paramètre doit donc être minimisé. La pression quant à elle joue directement sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose [239-241]. Une augmentation de la cristallinité de la cellulose lors de l'étape de vapocraquage due à la recristallisation des zones amorphes par réarrangement des chaînes de cellulose ralentit l'hydrolyse enzymatique [242]. Les modifications touchant les lignines consistent en une dépolymérisation/re-polymérisation suite à l'activation du carbone α sous l'effet des températures élevées [235, 243].

L'efficacité de ce prétraitement a été évaluée sur de nombreux matériaux lignocellulosiques. Les premiers essais ont été réalisés sur le peuplier dans les années 1980 où le prétraitement était capable d'augmenter les rendements l'hydrolyse enzymatique de 15 à 90 % en seulement 24 heures [244]. L'efficacité de ce procédé a également été prouvée sur de nombreux substrats tels que le peuplier, la tige de maïs, la canne à sucre, la paille de blé et le miscanthus [245-250]. Le pré-mouillage des substrats dans des solutions contenant de faibles quantités de solutions acides telles que le H_2SO_4 et le SO_2 (0,3-3 %) permet de réduire la température et la durée du prétraitement tout en maintenant des rendements d'hydrolyse enzymatique élevés en l'absence de produits inhibiteurs [251, 252]. De nombreuses études ont par ailleurs montré une efficacité réduite de ce prétraitement par explosion à la vapeur sur les bois de conifères [253-256].

4.1.5 Le prétraitement AFEX

Le procédé AFEX (Ammonia Fiber Explosion) consiste en l'exposition de la biomasse lignocellulosique à de l'ammoniaque liquide sous haute température (90 à 180°C) et sous pression (7 à 40 bar) pendant un certain temps avant de procéder à une brusque décompression qui va permettre d'évaporer l'ammoniac et d'exploser le substrat. Ce prétraitement provoque une faible réduction de la quantité de lignines, l'élimination d'une fraction des hémicelluloses et la décristallisation de la cellulose [210]. Contrairement au traitement acide, l'hydrolyse basique des hémicelluloses donne naissance à des sucres oligomériques désacétylés sans formation de produits inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique [257]. De récentes études microscopiques et spectroscopiques ont permis de mieux connaître les conséquences de l'action du prétraitement AFEX sur la structure des parois. Les auteurs ont mis évidence la présence de structures poreuses dont le diamètre varie entre 10 et 1000 nm, ce qui facilite l'accessibilités des enzymes au sein du complexe pariétal [258].

L'efficacité de ce prétraitement a été évaluée sur différents substrats lignocellulosiques tels que le maïs, le switchgrass et le miscanthus. Plusieurs paramètres expérimentaux ont été explorés au cours de ces études avant de définir les conditions optimales de prétraitement conduisant à la transformation enzymatique de la quasi-totalité de la cellulose pariétale (tableau VI). Des températures plus élevées s'avèrent nécessaires pour hydrolyser plus de 95 % de la cellulose pariétale chez le miscanthus et le peuplier. La durée du prétraitement est beaucoup plus élevée pour le peuplier en comparaison avec les autres substrats [259-262].

Tableau VI: Conditions de prétraitement AFEX optimales de plusieurs substrats lignocellulosiques.

Conditions expérimentales				
Substrat	Température	Ratio ammoniaque : matière sèche	Humidité	Temps de réaction
Maïs ^[259]	90 °C	1:1	69 %	5 min
Switchgrass ^[260]	100 °C	1:1	80 %	5 min
Miscanthus ^[261]	160 °C	2:1	233 %	5 min
Peuplier ^[262]	180 °C	2:1	233 %	30 min

L'impact de ces différents paramètres sur le coût du prétraitement a été exploré. Bals *et al.*, (2011) ont conclu que la quantité d'ammoniaque et le temps de réaction jouaient des rôles importants dans la réduction des coûts du procédé alors que l'humidité et la température de réaction n'avaient qu'un effet limité [263]. Ce type de prétraitement représente également l'avantage de ne pas nécessiter de lavage et de neutralisation du pH post-prétraitement car l'ammoniac utilisé s'évapore presque entièrement lors de l'explosion. L'ammoniac résiduel pourra servir de source d'azote aux microorganismes fermentaires [259].

4.1.6 Le prétraitement Organosolv

Le principe de ce procédé, issu de l'industrie papetière, est basé sur l'extraction des lignines et des hémicelluloses par utilisation de solvants organiques tels que le méthanol ou l'éthanol à des températures allant de 100 à 250°C [264]. Cette extraction peut être améliorée par ajout de catalyseurs acides de nature minérale (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄) ou organique (acide formique etc.) à des températures plus faibles [11].

Le prétraitement à l'éthanol est préféré au méthanol car il est moins toxique. Son utilisation dans l'industrie papetière remonte aux années 1940 [265]. Neilson *et al.*, (1983) furent les premiers à explorer l'impact de l'éthanol sur l'hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques [266]. Ce procédé a été par la suite appliqué à de nombreux substrats lignocellulosiques tels que le peuplier, la paille de blé et le miscanthus dans le but d'améliorer les rendements de saccharification [208, 267-269]. Des études spectroscopiques sur du miscanthus prétraité à l'éthanol (190°C, 60 minutes, 1,2 % de H₂SO₄, éthanol/H₂O = 0,65) ont mis en évidence un clivage des liaisons β -O-4 et des liaisons esters [270]. Ces résultats ont été récemment confirmés lors d'essais réalisés sur l'espèce *Pinus taeda* [271], confortant les

nombreux travaux réalisés sur les lignines isolées par ces traitements dans le domaine papetier. Le prétraitement de la paille de blé à l'éthanol a montré une nette augmentation du degré de condensation des lignines (proportion de liaisons condensées) [272]. Récemment, une étude a montré qu'une étape de pré-mouillage du miscanthus dans une solution faiblement acide (0,15M de H₂SO₄), avant de procéder au prétraitement à l'éthanol, permet de mieux séparer les constituants pariétaux et surtout de mieux hydrolyser la fraction cellulosique en atteignant des rendements supérieurs à 98 % [269]. L'impact de ce prétraitement sur l'anatomie tissulaire a été également exploré chez l'espèce *Buddleja davidii* où il a été montré une redistribution des lignines qui ont été éliminées au niveau des lamelles moyennes [273].

L'éthanol et le méthanol sont les solvants les plus utilisés dans ce procédé au regard de leur coût relativement abordable et leur aptitude à être facilement recyclables par évaporation. Ils nécessitent cependant des pressions plus élevées en raison de leur faible point de fusion. Les lignines solubilisées sont récupérées par une simple filtration.

4.1.7 Les prétraitements biologiques

Ce type de prétraitement reste peu étudié par rapport aux procédés physicochimiques mais la nécessité de proposer de solutions plus respectueuses de l'environnement a fait renaître un intérêt croissant pour la solution biologique dans le contexte de la saccharification de lignocelluloses à destination énergétique [274-277].

Les prétraitements biologiques utilisent des champignons filamenteux appartenant aux basidiomycètes tels que *Phanerochaete chrysosporium* et *Pleurotus ostreatus*. Ces microorganismes sont capables de produire des enzymes capables de dégrader les lignines telles que les peroxydases et les laccases en réponse à une carence en carbone et en azote. Toutefois, certaines espèces sont également capables de produire des cellulases [278]. Une modification du ratio S/G/H de la paille de blé a été mise en évidence sous l'action ligninolytique des peroxydases fongiques [279] ainsi qu'une diminution du degré de cristallinité de la cellulose après utilisation de la souche *Phanerochaete chrysosporium* [280]. Des observations au microscope électronique ont montré une augmentation de la porosité de la surface des substrats prétraités biologiquement [275, 281, 282]. L'efficacité de tels prétraitements est augmentée en combinant l'action enzymatique à celle de traitements

physicochimiques [283, 284]. L'application au niveau industriel de ce prétraitement reste néanmoins difficile à cause de sa lenteur et de la difficulté de le contrôler [11, 278].

Au vu des nombreuses recherches en la matière, il apparaît clairement que le prétraitement idéal n'existe pas et que la solution passe par l'adoption d'un système flexible où plusieurs prétraitements peuvent être éventuellement utilisés. Le tableau VII résume les actions des principaux prétraitements physicochimiques décrits ci-dessus.

Tableau VII: Liste des principaux prétraitements et leurs actions.

Prétraitement	Principales actions
Acide dilué	Hydrolyse partielle et solubilisation des hémicelluloses
Explosion à la vapeur	Redistribution des lignines à la surface des fibres
Hydrothermal	Elimination des hémicelluloses et de quelques lignines
AFEX	Clivage des lignines Dépolymérisation partielle des hémicelluloses et de la cellulose
Organosolv	Elimination des lignines et de quelques hémicelluloses

4.2 Amélioration du processus d'hydrolyse enzymatique

Les cellulases ayant réussi à pénétrer dans la matrice pariétale préalablement altérée par un prétraitement physicochimique, rencontrent d'autres difficultés comme l'inhibition par les produits générés au cours de ces prétraitements et l'accès au substrat cellulosique.

4.2.1 Elimination des produits inhibiteurs de cellulases

L'inhibition des cellulases par des sucres produits en cours de réaction (cellobiose et glucose) est un phénomène qui est aujourd'hui bien connu. L'hydrolyse enzymatique des substrats peu lignifiés est essentiellement inhibée par le cellobiose et le glucose alors que leur impact diminue significativement lorsque les parois lignocellulosiques sont riches en lignines où l'inhibition incombe essentiellement à l'adsorption non productive des cellulases. L'élimination de ces produits inhibiteurs se fait par l'utilisation de bioréacteurs à membrane en agitation, ne laissant passer que les sucres [285-288]. L'effet inhibiteur du glucose et du cellobiose est également éliminé en couplant la réaction d'hydrolyse enzymatique à la

réaction de fermentation du glucose. Il s'agit du procédé SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation).

En fonction du prétraitement appliqué à la biomasse lignocellulosique, divers composés phénoliques et dérivés furaniques sont possiblement libérés tels que les produits de dégradation des lignines, les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, les tannins, l'acide gallique le furfural et l'hydroxyméthylfurfural. De nombreuses études ont démontré l'effet inhibiteur de ces composés sur les cellulases et les β -glucosidases fongiques [289-291]. Une récente étude a mis en évidence la présence d'une forte interaction entre une endoxylanase GH11 de *Thermobacillus xylanaticus* et ces composés phénoliques induisant une inactivation de l'enzyme probablement par altération de la conformation active [292]. De plus des essais réalisés sur substrats synthétiques (cellulose Solka-Flok) ont montré que l'élimination des dérivés phénoliques pré-cités se traduit par une augmentation du rendement de saccharification enzymatique [293]. Une étape de lavage après chaque prétraitement est indispensable pour lever ces inhibitions et réduire la quantité d'enzymes cellulolytiques utilisées. Par ailleurs, l'ajout de polyéthylène glycol et de tannase pouvait aider à dégrader ces inhibiteurs [294]. Les prétraitements, notamment alcalins, agissent sur les hémicelluloses des parois et libèrent du xylobiose et des xylooligosaccharides qui sont de puissants inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique [295]. Un traitement enzymatique combinant endoxylanases et β -xylosidase pourrait permettre lever cette inhibition.

4.2.2 Amélioration des interactions enzymes/substrats

L'ajout de surfactants permet d'améliorer les rendements d'hydrolyse enzymatique en se fixant sur les sites hydrophobes de la cellulose réduisant ainsi l'adsorption non productive des cellulases sur leur substrat [296]. Ces surfactants sont particulièrement efficaces lorsque le milieu réactionnel contient de faibles quantités d'enzymes et que la cristallinité de la cellulose n'est pas trop élevée [297]. Les surfactants diminuent également les interactions non productives des enzymes avec les lignines [298]. La BSA (Bovin Serum Albumin) est une protéine qui est également capable de s'adsorber d'une manière irréversible sur les lignines évitant ainsi la fixation des cellulases et de la β -glucosidase sur ce polymère [299, 300]. Berlin *et al.*, (2005) ont mis en évidence la présence de sites d'affinité avec les lignines au niveau du domaine catalytique, en plus du CBM, des cellulases [301].

4.2.3 Optimisation des cellulases par génie génétique

Des outils génétiques tels que l'évolution dirigée et le génie génétique permettent d'optimiser l'action des cellulases en améliorant leur thermostabilité [302] et en augmentant l'affinité du CBM à son substrat [199]. L'amélioration de la glycosylation des cellulases est une voie qui a également été explorée pour régler les problèmes posés lors de la purification de cellulases exprimés dans des hôtes exogènes [140, 303].

4.2.4 Optimisation des cocktails enzymatiques

L'émergence d'un grand nombre de substrats, potentiellement utilisables en bioraffinerie pour la production de bioéthanol de deuxième génération, ainsi que la mise au point de différents prétraitements rend difficile l'utilisation d'un seul et unique cocktail enzymatique pour la saccharification des parois lignocellulosiques [304-306]. Les différences de composition en hémicelluloses et en lignines après chaque prétraitement rend nécessaire la mise en place de cocktails enzymatiques capables de s'affranchir des limitations liées à ces composés et leur produits de dégradation. Ces prétraitements peu sévères et peu gourmands en énergie engendrent des substrats prétraités riches en hémicelluloses nécessitant l'utilisation d'endoxylanases GH10 et GH11, mais également d'autres hémicellulases dites "débranchantes" (acétyl-xylan estérases, arabinofuranosidases etc.) [307]. De nombreuses études ont montré que ces systèmes enzymatiques permettent de réduire considérablement la quantité de cellulases utilisées lors de l'hydrolyse optimale du substrat prétraité. Ceci est expliqué par l'amélioration de l'accessibilité à la cellulose après élimination des hémicelluloses et lignines [308-310].

CHAPITRE II

Objectifs de la thèse et stratégie de
recherche

Objectifs de la thèse et stratégie de recherche

1 Objectifs scientifiques

Le principal objectif de cette thèse est d'explorer le potentiel de saccharification du miscanthus et de comprendre les mécanismes fondamentaux impliqués dans son hydrolyse enzymatique. Dans le cas du miscanthus, les rares études disponibles, au démarrage de ce programme de thèse, ont essentiellement porté sur les caractéristiques anatomiques et tissulaires en lien avec la résistance à la verse ou l'aptitude au compostage [311, 312]. Les données sur la composition chimique de cette espèce étaient généralement limitées à la teneur globale en lignine et en cellulose sans aborder la qualité de ces composantes ou les caractéristiques organisationnelles de ces structures [313]. Pour répondre à cet objectif, nous avons articulé notre étude autour de trois questions scientifiques :

1.1 Premier objectif

La première question concerne l'impact de l'hétérogénéité des parois en fonction des types cellulaires sur l'hydrolyse enzymatique, et plus particulièrement l'effet de prétraitements acides et alcalins sur la distribution des composés phénoliques au sein des parois de tiges de miscanthus.

La dégradation enzymatique des parois lignocellulosiques est réputée difficile en raison de la présence de lignines et d'hémicelluloses qui limitent l'accès de la cellulose aux cellulases [211]. Plusieurs études ont montré la nécessité de procéder à des prétraitements pour améliorer les rendements de saccharification de nombreuses ressources lignocellulosiques telles que la paille de blé, les tiges de maïs et le switchgrass [205, 314]. Les parois cellulaires des tiges de miscanthus, à l'instar des graminées, sont riches en acides phénoliques (FA et *p*CA) qui se répartissent différemment en fonction des types cellulaires et des organes [28, 315]. L'acide férulique (FA) est connu pour jouer un rôle primordial dans la réticulation des polymères pariétaux formant ainsi un réseau complexe et résistant aux agents de dégradation tels que les microorganismes et les enzymes cellulolytiques [56]. D'autres études ont également montré que les composés phénoliques pariétaux, notamment ceux libérés après prétraitement, peuvent inhiber les cellulases par fixation réversible ou par adsorption à la cellulose [291, 316]. Ces composés phénoliques sont connus depuis longtemps pour leur rôle inhibiteur de la biodégradation des fourrages par les microorganismes [317]. Une étude a montré récemment que l'élimination des phénols pariétaux par des traitements chimiques

sévères (délignification) améliorerait la dégradation enzymatique des parois de tige de canne à sucre [318]. L'impact de prétraitements chimiques potentiellement utilisables en bioraffinerie sur la distribution des composés phénoliques pariétaux n'a cependant pas été étudié chez les ressources lignocellulosiques à destination énergétique.

1.2 Deuxième objectif

La deuxième question scientifique porte sur l'accessibilité des enzymes à leur substrat et la progression des cellulases fongiques au sein des parois du miscanthus afin d'identifier d'éventuelles architectures barrières.

Il est aujourd'hui admis que l'accessibilité de la cellulose aux cellulases est l'une des principales limitations du processus de saccharification des parois lignocellulosiques sans connaître pour autant les éléments responsables de cette inhibition. Le prétraitement des parois peut éliminer la fraction hémicellulosique et déstructurer l'architecture pariétale facilitant ainsi l'entrée des enzymes [170, 319]. De récentes études réalisées sur des tiges de maïs prétraitées à l'acide ont abordé cette question par l'utilisation d'une cellobiohydrolase CBH1 couplée à un marqueur fluorescent ou en faisant appel à des anticorps monoclonaux spécifiques de CBH1 et EG1 [319, 320]. Il a alors été montré que la digestibilité des parois est augmentée à la fois par une amélioration de l'accessibilité et par une réduction de la cristallinité de la cellulose. Une telle démarche n'a cependant pas été réalisée sur un substrat hautement lignifié tel que le miscanthus.

1.3 Troisième objectif

Après avoir abordé la qualité de la biomasse lignocellulosique, le troisième volet de l'étude vise à identifier la composition de mélanges enzymatiques en les adaptant au substrat notamment après prétraitement.

De nombreuses études ont mis en évidence une efficacité variable des mélanges enzymatiques commerciaux sur plusieurs substrats prétraités [321]. La réduction du coût des cellulases passe également par l'optimisation des mélanges enzymatiques en réduisant les quantités de cellulases utilisées [302]. Le rôle inhibiteur des xylanes résiduels après prétraitement a été mis en évidence chez de nombreux substrats lignocellulosiques [322]. L'ajout d'enzymes accessoires telles que les xylanases, les arabinofuranosidases, les mannanases et les β -xylosidases a été proposé par de nombreuses équipes de recherche comme une solution permettant de mieux dégrader les hémicelluloses résiduelles après prétraitement [323-325]. Une telle démarche peut s'avérer coûteuse au vu de la difficulté de purifier des enzymes en

grandes quantités. Dans le cas du miscanthus une telle démarche pourrait permettre d'optimiser son hydrolyse enzymatique.

2 Hypothèses et approches expérimentales

Pour répondre aux questions scientifiques proposées, nous avons sélectionné la biomasse de *Miscanthus x giganteus*, récolté au stade de tardif où la partie aérienne est essentiellement représentée par les tiges. Nous avons appliqué des prétraitements physicochimiques très largement étudiés sur d'autres substrats lignocellulosiques et ayant montré leur efficacité dans l'augmentation des rendements de saccharification. L'hydrolyse enzymatique est réalisée par des cellulases produites par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*. Des cocktails enzymatiques améliorés produit à l'IFP Energies nouvelles ont été mis à disposition lors de l'étude de la saccharification des parois du miscanthus.

- 1) Nous avons choisi un entre-nœud basal (n°2) de la tige de miscanthus pour répondre à la première question de recherche. Un prétraitement à l'acide sulfurique dilué à 170°C [326, 327] a été appliqué dans un premier temps pour apprécier l'impact de l'acide sulfurique. Nous avons ensuite appliqué un prétraitement à l'ammoniaque à température ambiante [28]. Une analyse de la composition chimique (sucres, lignines et acides phénoliques) des parois de l'entre-nœud de miscanthus a été réalisée pour déterminer l'effet global de ces prétraitements. Les fragments d'entre-nœud ont par la suite subi une hydrolyse enzymatique avec un cocktail cellulolytique complet. L'ensemble des opérations (prétraitements et hydrolyse enzymatique) ont été appliquées sur des fragments de quelques millimètres afin de privilégier une intégrité tissulaire autorisant les études microscopiques et spectroscopiques. L'étude de la distribution des composés phénoliques au sein de parois de différents types cellulaires a été réalisée au moyen de la micro spectrophotométrie à transmission UV.
- 2) La progression des cellulases a également été étudiée par immunocytochimie sur des fragments de miscanthus prétraités à l'acide sulfurique dilué ou à l'ammoniaque ayant subi une hydrolyse enzymatique. Dans un premier temps, la démarche a consisté à appliquer un cocktail cellulolytique contenant les cellulases CBH1 et EG1 pour lesquelles des anticorps ont été préalablement produits par l'IFP Energies nouvelles. Cette étape visait à valider la méthodologie et évaluer le seuil de détection de ces

enzymes avant application de cellulases CBH1 et EG1 pures sur les fragments de miscanthus avant et après prétraitement. Parallèlement, l'utilisation de formes inactives de ces deux enzymes a été envisagée afin d'identifier la progression des enzymes dépourvues de propriétés catalytiques mais conservant leur conformation. L'inactivation de ces enzymes sera réalisée en modifiant le site actif par mutagenèse dirigée.

- 3) Nous avons enfin exploré la saccharification d'un miscanthus broyé et prétraité à l'acide sulfurique dilué à 150°C ou explosé à la vapeur, ce prétraitement étant décrit comme l'un des plus performants pour la saccharification biologique du miscanthus. Des cocktails enzymatiques complets de *Trichoderma reesei* de composition variée (activités cellulase, xylanase et β -glucosidase en proportions variables) ont été comparés pour identifier les cocktails conduisant à une conversion optimale de la cellulose. Des cocktails reconstitués à partir d'enzymes purifiées sont proposés et appliqués sur ces substrats afin de confirmer le rôle individuel de chaque type d'enzymes.

CHAPITRE III

Impact des prétraitements chimiques et de
l'hydrolyse enzymatique sur la distribution des
composés phénoliques des parois d'un entre-nœud
de tige de miscanthus

CHAPITRE III : Impact des prétraitements chimiques et de l'hydrolyse enzymatique sur la distribution des composés phénoliques des parois d'un entre-nœud de tige de miscanthus

Résumé étendu :

L'efficacité de la transformation enzymatique du miscanthus pour la production de bioethanol de deuxième génération est essentiellement limitée par la récalcitrance du complexe lignocellulosique pariétal. En plus de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines, les parois des graminées comme le miscanthus sont caractérisées par la présence d'acides hydroxycinnamiques qui jouent un rôle important dans l'établissement d'un réseau pariétal complexe. L'acide férulique (FA) est considéré comme le principal agent de réticulation capable d'établir des liaisons entre les sucres pariétaux et les lignines alors que l'acide *p*-coumarique (*p*CA) est principalement estérifié aux unités syringyles (S) des lignines. Les lignines pariétales agissent comme une barrière physique limitant l'accès des enzymes mais peuvent également adsorber de manière irréversible certaines enzymes. Une étape de prétraitement est requise pour rendre la cellulose plus accessible aux cellulases notamment par la rupture des liaisons covalentes formées entre hémicellulose-lignines, la dégradation des hémicelluloses, la modification et la redistribution des lignines. L'efficacité de ces prétraitements dépend de la morphologie des substrats lignocellulosiques et de leur composition chimique.

Le principal objectif de cette étude est d'explorer l'impact des prétraitements acide et alcalin sur la distribution des lignines et des acides hydroxycinnamiques au sein des différents types cellulaires des tiges de miscanthus et d'évaluer l'impact de cette hétérogénéité sur l'hydrolyse enzymatique.

Nous avons examiné dans un premier temps l'effet de l'acide sulfurique dilué à 170°C et de l'ammoniaque sur la composition chimique de fragments de tiges d'un miscanthus tardif. Ces deux prétraitements réduisent significativement la quantité d'acides hydroxycinnamiques alors que les lignines deviennent plus riches en liaisons condensées. La teneur en arabinoxylanes pariétaux est significativement réduite sous l'effet du prétraitement à l'acide sulfurique dilué passant de 29 à 8 % de matière sèche. Les essais d'hydrolyse enzymatique réalisés avec un cocktail cellulolytique complet de *Trichoderma reesei* montrent une nette

amélioration des taux de conversion de la cellulose en glucose, passant 2,2 % avant prétraitement à 20,45 % et 32,09 % après prétraitement alcalin et acide respectivement.

Nous avons ensuite exploré l'impact des prétraitements et de l'hydrolyse enzymatique sur le miscanthus au niveau tissulaire. Pour ce faire nous avons réalisé des observations microscopiques de coupes transversales d'un entre-nœud brut, prétraité à l'acide ou à l'ammoniaque. Les observations en microscopie optique ont révélé une architecture tissulaire caractéristique des graminées avec la présence d'une couche de cellules à parois épaisses, formant le sclérenchyme sub-épidermique en périphérie de l'entre-nœud. Les tissus conducteurs, entourés de cellules sclérenchymateuses, forment des faisceaux vasculaires répartis sur toute la surface de la tige. Entre ces faisceaux s'intercalent des cellules à parois plus fines formant le parenchyme. Le prétraitement acide ne semble pas affecter cette organisation tissulaire alors que l'ammoniaque induit un gonflement des parois du parenchyme et du sclérenchyme (vasculaire et épidermique). Nos observations indiquent également que l'hydrolyse enzymatique affecte différemment ces tissus. En effet, les cellules à parois épaisses (sclérenchyme) semblent être plus facilement dégradées par les cellulases fongiques, notamment après prétraitement à l'acide sulfurique dilué, alors que les tissus prétraités à l'ammoniaque semblent fragilisés au niveau de la lamelle moyenne qui apparaît déstructurée après action des cellulases.

Pour expliquer les différences de réactivité des parois du miscanthus aux prétraitements et aux cellulases, nous avons examiné la distribution des composés phénoliques (lignines et acides hydroxycinnamiques) au niveau cellulaire par micro spectrophotométrie UV. L'absorbance UV mesurée a confirmé la richesse des parois du miscanthus en lignines et en acides hydroxycinnamiques. Les prétraitements acide et alcalin agissent de la même manière sur cette absorbance qui diminue au niveau des parois secondaires du sclérenchyme et du parenchyme mais qui reste inchangée au niveau des coins de cellules et des vaisseaux expliquant leur récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique.

Les différences de dégradation observées dans les différents tissus du miscanthus, malgré l'altération des composés phénoliques suite aux prétraitements, suggèrent l'implication d'autres facteurs physicochimiques et structuraux dans l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique des parois cellulaires du miscanthus.

Title: Changes in phenolics distribution after chemical pretreatment and enzymatic conversion of *Miscanthus x giganteus* internode

Abstract

In addition to lignin, grass cell walls are characterized by the presence of hydroxycinnamic acids that play a significant role in cross-linking polymers into a cohesive network and pretreatments are required to overcome the recalcitrance of lignocelluloses prior to enzymatic bioconversion of polysaccharides. The effects of dilute acid and ammonium hydroxide pretreatments were studied on the chemical composition and enzymatic saccharification of miscanthus internodes fragments. The hydroxycinnamic acid content was reduced after both pretreatments while lignin got enriched in condensed linked structures. In addition, dilute acid pretreatment were effective in decreasing xylan content of miscanthus while ammonia treatment induced a marked swelling effect on the cell walls of parenchyma, vascular sclerenchyma and epidermal sclerenchyma. The phenol distribution at the cell level was estimated using UV transmission micro spectrophotometry. Internode cell walls displayed different UV spectra according to the cell type. However, the secondary cell walls had similar UV spectra after pretreatment, whereas spectra recorded at the cell corner region displayed variations according to cell type and pretreatment. Acid pretreatment was more efficient than ammonia to improve the conversion of polysaccharides by a *Trichoderma* cellulolytic cocktail. Although pretreatments achieved moderate saccharification yields, the secondary cell walls were altered at some pit regions of the vascular sclerenchyma whereas parenchyma appeared recalcitrant. Variations in the UV spectra of enzyme-digested cell walls suggest pretreatment-dependent heterogeneity of the phenolic distribution in the more recalcitrant cell walls.

Key words:

Lignin, hydroxycinnamic acids, saccharification, UV micro spectrophotometry

Accepté dans BioEnergy Research - DOI 10.1007/s12155-012-9275-2

Introduction

Increasing demands for energy, and the decline and instability of fossil resources have led to a search for alternative fuel sources with less environmental impact [38, 166, 328]. Lignocellulosic biomass, derived from agricultural and forestry by-products as well as dedicated lignocellulosic energy crops could provide a renewable source of sugars for conversion into bioethanol [12]. Perennial grasses have received increasing attention due to their availability and minor impact on food supply [329-331]. One such perennial species *Miscanthus x giganteus*, a C4 rhizomatous, herbaceous grass, has emerged as one of the most promising feedstock candidates for biofuel production and is of great interest in temperate regions due to its high biomass yield, low fertilization requirements and high cellulose content [19, 24]. Investigation of genetic and environmental effects on the cell wall composition of numerous miscanthus genotypes revealed considerable variation allowing potential breeding for high yielding varieties, adapted to their environment and easily established and harvested [27, 332].

The second generation bioethanol process are based on cellulose hydrolysis into fermentable glucose, using polysaccharide-active enzymes which are mainly produced by fungi such as *Trichoderma reesei* [333]. However, cellulose bioconversion to fermentable glucose may be hindered by many physicochemical, structural, and compositional features resulting from the crystallinity of cellulose and the complexity of the lignified plant cell walls. Cellulose fibrils are known to be sheathed and covered by phenolic and hemicellulose polymers [166]. Lignin is reported to be the main factor limiting cellulase action through nonproductive binding of enzymes to lignin [175, 211]. Furthermore, grass cell walls contain hydroxycinnamic acids that play a significant role in cross-linking the wall polymers into a cohesive network thereby restricting enzyme accessibility to cellulose [70, 80]. Notably, ferulic acid is reported to cross-link arabinoxylan and lignin whereas *p*-coumaric acid is mainly ester-linked to the γ -position of the phenylpropanoid side chains of the S units of grass lignins [56].

Due to the recalcitrance of this lignocellulosic network, physical and/or chemical pretreatments are required to render the cellulose more accessible to enzymes and thereby improve enzymatic saccharification yields [204, 236]. Numerous pretreatments aiming at overcoming the limitations of lignocelluloses to saccharification have been studied during the last decades [205, 210]. Dilute sulphuric acid (DA) pretreatment is one of the most important and has provided much information about the biochemical conversion of woody and

herbaceous materials such as wheat straw and corn stover [334, 335]. DA treatment results in hemicellulose removal, lignin disruption and decreases cellulose crystallinity. It has been successfully used with ethanol (organosolv) to increase cellulose conversion in miscanthus [269]. Pretreatment with alkali is also widely used due to its selective action on lignin, rather than on C6 and C5 sugars, and has been shown to efficiently remove lignin from grass species [336]. Notably, an ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatment or soaking in aqueous ammonia (SAA), recently applied to miscanthus, led to a significant improvement in saccharification yields [28, 261].

Pretreatment, together with the design and production of efficient cellulose cocktails, is still one of the most expensive steps in biofuel production and needs improvement to make the process economically competitive [204]. Pretreatment efficiency is related to the type of feedstock (specie, organs) and chemical composition. As indicated in the abundant literature on forage digestibility, crop behavior can be affected by the type and morphology of lignocellulose as well as the stage of development [337, 338]. Thus the significantly higher bioconversion recently demonstrated in miscanthus leaves, as compared to stems, could partially explain the variable bioconversion yields of above-ground biomass, depending on the period of crop harvesting [28].

The impact of pretreatments may also vary according to the type of tissue and corresponding cell walls. Thus, the lignin and hydroxycinnamic acids fraction may hinder enzymatic saccharification, in the different cell types constituting the plant biomass, to different extents as suggested previously [28, 317]. Various microscopic tools, such as immunocytochemistry and micro spectroscopy, can be used to visualize the heterogeneity of cell wall composition at the cell and tissue levels. For several decades, UV micro spectrophotometry has been applied to study forage cell walls [339] in relation to microbial degradation [317], after chemical pretreatment [340], and to monitor lignin distribution on modified wood cell walls [341]. Recently UV transmission micro spectrophotometry has been used to investigate the enzymatic hydrolysis of sugarcane [318].

The main objective of this study was to address the effects of cell wall heterogeneity on the impact of pretreatment and subsequent saccharification of late-harvested miscanthus. Lignin and hydroxycinnamic acids distribution was monitored at the cell level in untreated, acid and alkali treated miscanthus internodes which constitute most of biomass at crop maturity.

Polysaccharide conversion yields were determined using a *Trichoderma reesei* cellulolytic cocktail and digested internode tissues were further examined by means of microscopy.

Material and methods

1 Plant material

Basal internodes (internode 2) were isolated from the stover of miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) planted in April 2006 at INRA Estrées-Mons (France) and harvested in winter (February 2008, late harvest). The dry matter (DM) yield of the aerial biomass was approximately 15 t dry matter ha⁻¹ [26]. The internodes were cut into small fragments 2 x 3 x 3 mm in size and the rind was isolated from the pith with a razor blade.

2 Chemical pretreatments

2.1 Dilute acid pretreatment

Miscanthus internode fragments were treated with 8.5% sulphuric acid at a ratio of 1/10 (miscanthus/sulphuric acid ratio = 1 g 10 mL⁻¹) using mineralization bombs equipped with Teflon cups (Parr). The samples were kept at 170°C in an oil bath for 20 minutes. The fragments were then cooled and quickly filtered to remove any acid. The filtered acid-pretreated fragments were then washed with deionized water until the pH of the water was about 6.0. The fragments were then dried at 35°C for 12 hours and stored at room temperature for enzymatic hydrolysis, microscopic study and UV micro spectrophotometry, or were ball-milled for 3 minutes prior to chemical analysis.

2.2 Soaking in aqueous ammonia

Dry miscanthus fragments were treated in SVL tubes with 33% aqueous ammonia at a ratio of 1/6 (miscanthus/ammonia ratio = 1 g 6.6 mL⁻¹) for 5 days at room temperature in the dark [227]. The fragments were then recovered and washed until neutral pH, then dried at 35°C for 12 hours and used as described above. Both pretreatments were carried out in duplicates. Samples that did not undergo any type of chemical exposure are designated as untreated (UT).

3 Chemical analysis

3.1 Lignin

Lignin content was determined as acetyl bromide lignin using 10 mg of miscanthus suspended in HOAc (5 mL) containing 25% (v/v) acetyl bromide and 0.1 mL 70% perchloric acid in a sealed vessel which was shaken gently and incubated for 30 min at 70°C. After cooling, the reaction mixture was added to a mixture of 2N NaOH and HOAc. Absorbance of the solution was recorded at 280 nm. Lignin content was calculated using the extinction coefficient ($20.0 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) for graminaceous lignin [342].

The monomer composition of the labile ether lignin fraction was determined by thioacidolysis which specifically disrupts the non-condensed intermonomer linkages (alkyl-aryl ether). Thioacidolysis was performed on duplicates of each sample using 10 mg of miscanthus and ethanethiol/BF₃ etherate/dioxane reagent, as detailed previously by Lapierre *et al.* (1986) [343]. One mL of tetracosane (CAS 646-31-1) ($250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1} \text{ C}_{24}\text{H}_{50}$) was added as internal standard. After 4 hours, the mixture was extracted three times with dichloromethane (CH_2Cl_2) (3 x 25 mL). Guaiacyl (G) and syringyl (S) thioethylated monomers were determined as their trimethylsilyl derivatives, using a gas chromatograph equipped with a fused silica capillary DB1 column (30 m x 0.3 mm) (J&W Scientific[®]) and flame ionization detector. The temperature gradient was 160–280°C at 2°C min^{-1} [28].

3.2 Phenolic acid esters

Ester-linked phenolic acids were released from 20 mg miscanthus using 10 mL of 2M NaOH under constant stirring and nitrogen flow at 35°C. The resulting filtrate was acidified to pH 1 with 6M HCl, mixed with 1 mL of 3,4,5-trimethoxy-trans-cinnamic acid $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ as internal standard, prior to extraction of the phenolic acids with 25 mL of diethyl oxide (C_2H_5)₂O (three times). The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, evaporated under reduced pressure (700 mbar) at 45°C, then dissolved in 1 mL of methanol/water (1/1, v/v) and filtered (0.45 μm) prior to high pressure liquid chromatography on a Spherisorb S5-0DS2, RP18, 4.6 x 250 mm (WATERS[®]) column. Gradient elution was as previously described [344] using a combination of acetonitrile, methanol and 1% orthophosphoric acid in ultra-pure water. Ester-linked phenolic acids were quantified at 302 nm.

3.3 Carbohydrate

Carbohydrate analysis was carried out by high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) with 2-D-deoxyribose as internal standard. Duplicates of 8 mg of miscanthus were treated with sulphuric acid (12M H₂SO₄) for 2 h at 20°C and then diluted to 1M for 2 h at 100°C. All samples were filtered (polytetrafluoroethylene, PTFE, 0.45 µm) then injected onto a CarboPac PA-1 anion exchange column (4 x 250 mm, Dionex[®]) and detected by pulsed amperometry (PAD 2, Dionex[®]). Detector sensitivity was increased by post-column addition of 300 mM NaOH. Standard solutions of L-arabinose, D-galactose, D-glucose and D-xylose were used for the calibration [344].

4 Enzymatic hydrolysis

Small fragments of untreated, acid-pretreated and alkali-pretreated miscanthus were incubated overnight at 2% (w/v) in 10 mM sodium acetate buffer solution (pH 4.8) containing 0.02% of sodium azide under gentle stirring at 50°C. The cellulolytic cocktail used for the enzyme assays was produced by the industrial strain *Trichoderma reesei* CL847 [109, 345]. The resulting secretome contained high levels of cellulase (0.68 FPU (Filter Paper Unit) mg⁻¹ of protein) and β-glucosidase (12.5 pNPGU ([p-NitroPhenyl-beta-Glucoside](#) Unit) mg⁻¹ of protein) activity. The enzymatic reaction was carried out at 50°C after the addition of enzymes (138 FPU g⁻¹ of substrate) and 1 mL samples were taken after 5, 24 and 144 hours of reaction time. The enzymatic reaction was stopped by boiling (10 min, 100°C). After centrifugation (10,000 g; 10 min, 4°C), the soluble fractions containing the enzymatically-released products were subjected to acid hydrolysis prior to monosaccharide determination by HPAEC-PAD, as described above (see Carbohydrate analysis). Acid hydrolysis (1 h at 100°C) was carried out on 200 µL supernatant using 200 µL of 2M sulphuric acid. The acid samples were filtered (PTFE, 0.2 µm) and injected on a CarboPac PA-1 anion-exchange column (4 x 250 mm, Dionex[®]). The conversion yields were calculated on the basis of the amount of monosaccharides in the soluble fraction and corrected by integrating the sugars released in the enzyme and substrate controls. Finally, the lignocellulosic residues were collected after 144 h of reaction time and rinsed in deionized water prior to microscopic observation. Samples that were not treated with cellulases are hereafter designated controls.

5 Microscopic analysis

5.1 Sample preparation

Untreated, pretreated and enzyme-digested miscanthus fragments were fixed in a solution of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) containing 2% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde for 2 hours at room temperature. The samples were then rinsed in phosphate buffer and deionized water before being dehydrated for 20 minutes in each dilution (25%, 50%, 80%, and 95%) of an ethanol series then three times in 100% ethanol. The fragments were then gradually impregnated with epoxy resin using acetone solutions containing increasing concentrations (5%, 10%, and 20%) of Epon resin (Sigma Aldrich[®]) (at room temperature), then 40%, 80% and 100% (at 4°C). Final epon polymerization was obtained after 24 hours at 37°C and 48 hours at 60°C.

Semi-thin transverse sections (1 μm) of the resin-embedded specimen were obtained with a diamond knife (Diatome) and HM 360 (Microm, France) microtome.

5.2 Toluidine blue staining

Semi-thin transverse sections (1 μm) were stained with toluidine blue (1% w/v) for 5 min [344], mounted with Eukitt mounting medium (Electron Microscopy Sciences, USA) then examined with an Axioscop microscope (Zeiss Germany) equipped with an AxioCam MRc digital camera. Cell wall thickness was determined as average of 3 measurements on 5 cells of each cell type.

5.3 UV transmission micro spectrophotometry

Semi-thin transverse sections (1 μm) were transferred onto quartz slides then mounted with glycerin and covered with quartz coverslips. UV absorption spectra were recorded within the 260 to 400 nm range with 5 nm increments, on 1 μm (center of secondary cell walls, SW) or 0.5 μm spots (cell corner-middle lamella, CC; vessels, V). Measurements were carried out using a 5 nm monochromator and microscopic spectrophotometer (Carl Zeiss MPM 800) with x100 magnification [341]. Spectra were recorded for 10 cells of each cell type, and 4 areas per cell.

Results

1 Impact of sulphuric acid and ammonium hydroxide pretreatments on the chemical composition of miscanthus internodes

The inner tissues of basal internodes were removed from the outer tissues which accounted for 90 ± 9 % of the total dry matter in the case of internode 2 fragments (data not shown). We therefore focused on these outermost tissues and performed chemical pretreatments prior to saccharification. Chemical analysis revealed that carbohydrates were the main components of untreated miscanthus internodes. Cellulose was the main polymer, as shown by the presence of more than 44% glucose, followed by arabinoxylan that produced xylose and arabinose after acid hydrolysis (Table 1). Dilute acid pretreatment performed at 170°C on small fragments of miscanthus resulted in a 28% loss of dry matter whereas soaking in aqueous ammonia induced only a 10% loss of dry matter. DA treatment dramatically reduced the xylose content from 25% to 7% DM. Accordingly, the 20% increase in the proportion of lignin in DA treated samples of miscanthus suggested that this was mainly related to hemicellulose degradation and that little lignin would have been extracted. In agreement with the limited loss of dry matter, carbohydrate composition was not significantly modified by soaking in aqueous ammonia and lignin content was only very weakly reduced (Table 1).

The lignin composition was then analyzed by thioacidolysis which leads to selective disruption of the non-condensed bonds [343]. Both SAA and DA pretreated samples released smaller amounts of syringyl and guaiacyl monomers than the untreated samples. When expressed as a percentage of lignin, the total yields of syringyl and guaiacyl accounted for 23.9, 10.3 and 15.7% of the lignin polymer, in untreated, DA and SAA pretreated samples respectively. This result indicates that the residual lignins became enriched in condensed linked structure during each pretreatment.

The untreated internode samples contained approximately 2.0% ester-linked phenolic acids with 6 times more *p*-coumaric acid (PCA) than ferulic acid (FA). Our chromatography analysis reveals the presence of dimeric forms, mostly diferulic acids, in trace amounts (data not shown). Total ester-linked phenolic acids accounted for only 1.2% of the total dry matter after ammonium hydroxide pretreatment. Both PCA and FA were reduced by 34% and 60% respectively whereas only the FA contents were reduced by 32% after DA pretreatment.

Table 1: Effect of pretreatments on chemical composition of miscanthus internode fragments

	UT	DA	SAA
<u>Sugars (% of DM)</u>			
<i>Total sugars</i>	75.2 ± 4.2	64.4 ± 3.7	80.0 ± 7.6
Glucose	44.7 ± 2.6	55.0 ± 3.2	46.6 ± 4.4
Xylose	25.7 ± 1.4	7.3 ± 0.4	26.9 ± 2.5
Arabinose	3.6 ± 0.2	1.3 ± 0.0	5.3 ± 0.6
<u>Phenolics</u>			
<i>Acetyl bromide lignin (% of DM)</i>	28.1 ± 0.5	33.9 ± 1.7	26.4 ± 2.4
<i>Non condensed lignin units</i>			
<i>(μmol/g DM)</i>			
Guaiacyl	197.5 ± 5.4	99.2 ± 2.7	113.7 ± 4.5
Syringyl	138.4 ± 4.5	75.6 ± 0.6	94.5 ± 5.1
S/G	0.70 ± 0.04	0.76 ± 0.01	0.83 ± 0.01
<i>Ester-linked phenolic acids</i>			
<i>(% of DM)</i>			
pCoumaric acid	1.68 ± 0.05	1.67 ± 0.03	1.12 ± 0.02
Ferulic acid	0.28 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.11 ± 0.00

DM (dry matter), UT (untreated), DA (dilute acid pretreatment), SAA (soaking in aqueous ammonia pretreatment), ± standard deviation

2 Impact of acid and alkali pretreatments on saccharification yields and anatomy of miscanthus internode

Small fragments of miscanthus internode were subjected to enzymatic hydrolysis using a high cellulase concentration (138 FPU g⁻¹ of dry biomass). Enzymatic hydrolysis of untreated internode fragments resulted in extremely low conversion yields of cellulose and arabinoxylan (<3%) even after hydrolysis for 144 h (Fig. 1). The action of DA and SAA resulted in significant increases in cellulose and arabinoxylan conversion yields after 144 h of cellulase treatment. Cellulose conversion was more efficient after DA (32% conversion) than after SAA (20% conversion) pretreatments whereas the arabinoxylan conversion yields were similar (around 20%) after both pretreatments.

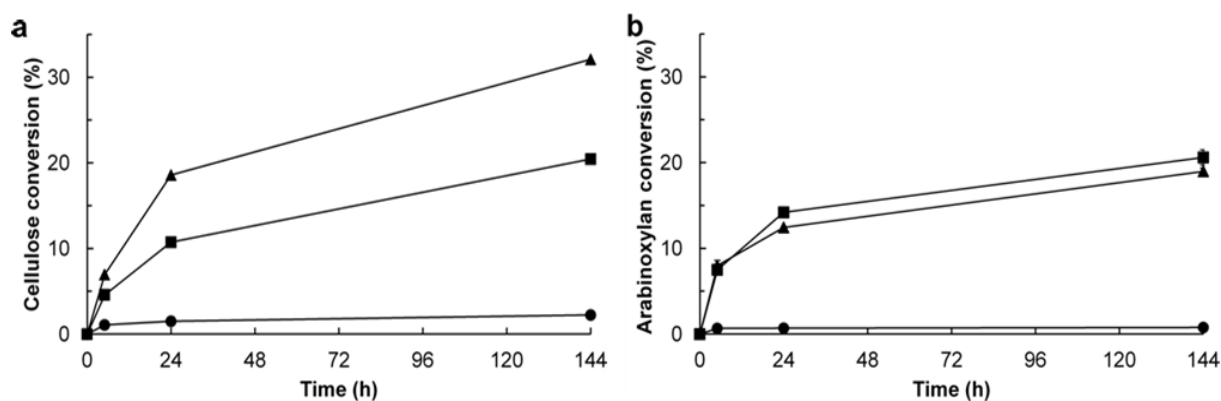


Fig. 1: Effect of acid and ammonia pretreatments on enzymatic conversion of cellulose (a) and arabinoxylan (b) from small fragments of miscanthus internode.

(□) DA, (△) SAA and (○) Untreated miscanthus; Error bars indicate standard deviation.

Histological observations of semi-thin transverse sections of miscanthus internode after toluidine blue staining revealed the distribution of vascular bundles throughout the section (Fig. 2). Microscopic observations revealed abundant thick-walled sclerenchyma fibers, forming a continuous cylinder known as the sub-epidermal sclerenchyma (ES) at the outermost region of the internode, and thick bundle sheaths (perivascular sclerenchyma, VS) encircling the vascular tissues. Thin-walled parenchyma cells (P) surrounded the xylem vessels and phloem.

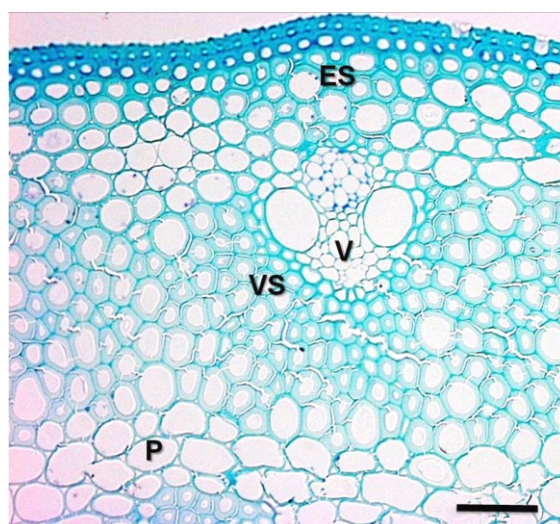


Fig. 2: Microscopic observation of toluidine blue stained transverse section of miscanthus internode. Sub-epidermal sclerenchyma (ES), perivascular sclerenchyma (VS) and parenchyma (P). Scale bar = 50 μ m.

After DA pretreatment, slight changes in the cell walls were observed in the sub-epidermal sclerenchyma, perivascular sclerenchyma and parenchyma stained with toluidine blue (Fig. 3 d-f) as compared to UT samples (Fig. 3 a-c). After SAA pretreatment, all cell walls were swollen and the parenchyma cell walls were also deformed (Fig. 3 g-i).

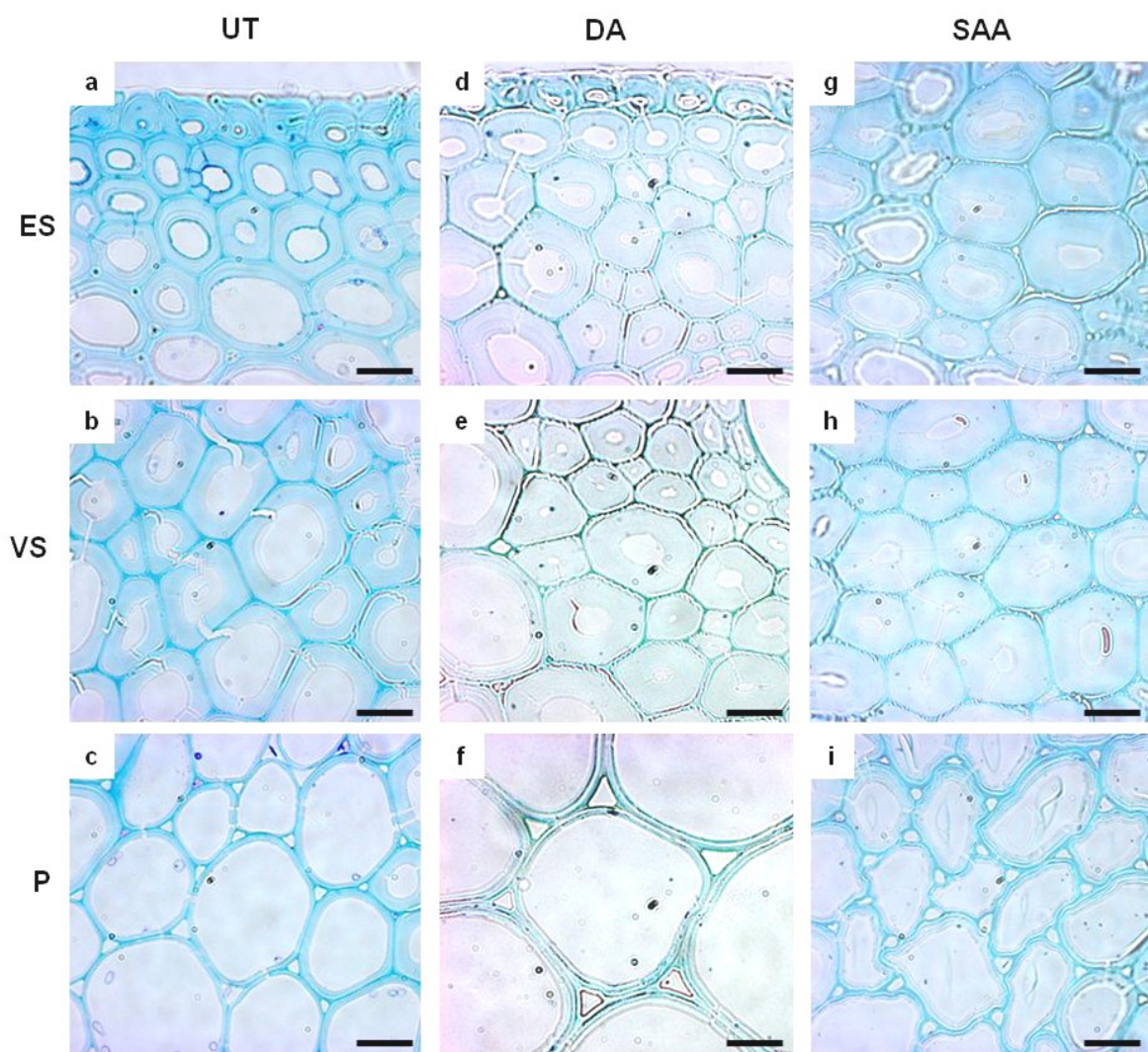


Fig. 3: Impact of chemical treatment on miscanthus internode cells. Toluidine blue staining of semi-thin sections of untreated (UT) (a,b,c), acid treated (DA) (d,e,f) and ammonia treated (SAA) (g,h,i) miscanthus.

Sub-epidermal sclerenchyma (ES) (a,d,g), perivascular sclerenchyma (VS) (b,e,h) and parenchyma (P) (c,f,i). Scale bar = 10 μ m.

Cell wall thickness measurements indicated a weaker swelling effect induced by DA as compared to SAA (Fig. 4). No histological change in the vessels was observed (data not shown).

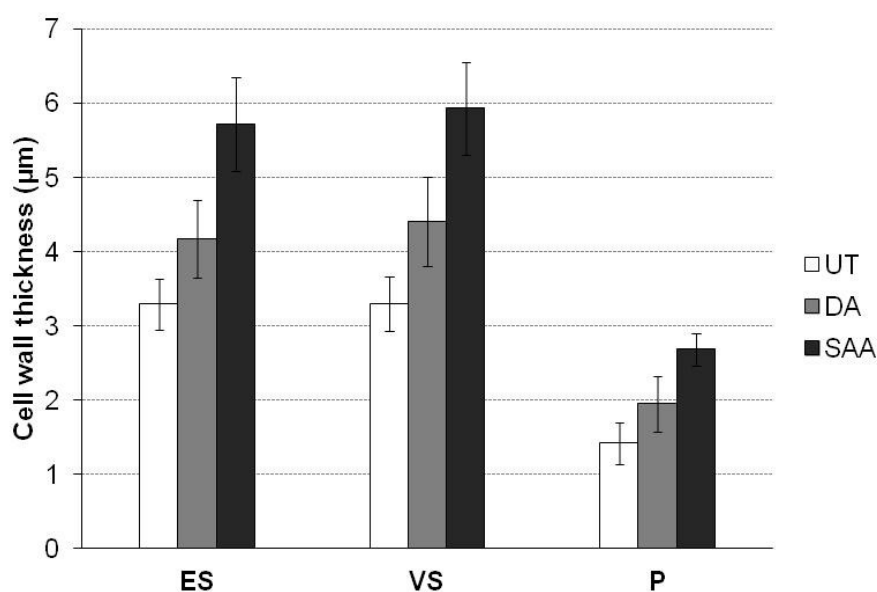


Fig. 4: Impact of acid (DA) and ammonia (SAA) pretreatments on the cell wall thickness of miscanthus internode.

Sub-epidermal sclerenchyma (ES), perivascular sclerenchyma (VS) and parenchyma (P).
Error bars indicate standard deviation.

After 144 h saccharification, observation of transverse sections indicated little changes in untreated internodes (Fig. 5 a-c). However, the shape of some pits appeared modified in the transverse section of DA treated samples after cellulase digestion. Some pits between ES and VS got larger at the lumen side (Fig. 5 d, e; black arrows) meanwhile edge of the cell walls appeared less sharp at the lumen side. Pit enlargements at the lumen side were also observed in ES, VS walls after enzyme digestion of the ammonia-treated samples (Fig. 5 g-h) albeit less marked than enzyme treated DA samples. In addition, the middle lamella was also altered (red arrows) in ES and VS (Fig. 5 g,h). Change in the vessels was not detected (data not shown). Deformation and swelling of the ammonia-pretreated parenchyma cell walls were still apparent after enzymatic hydrolysis (Fig. 5 i).

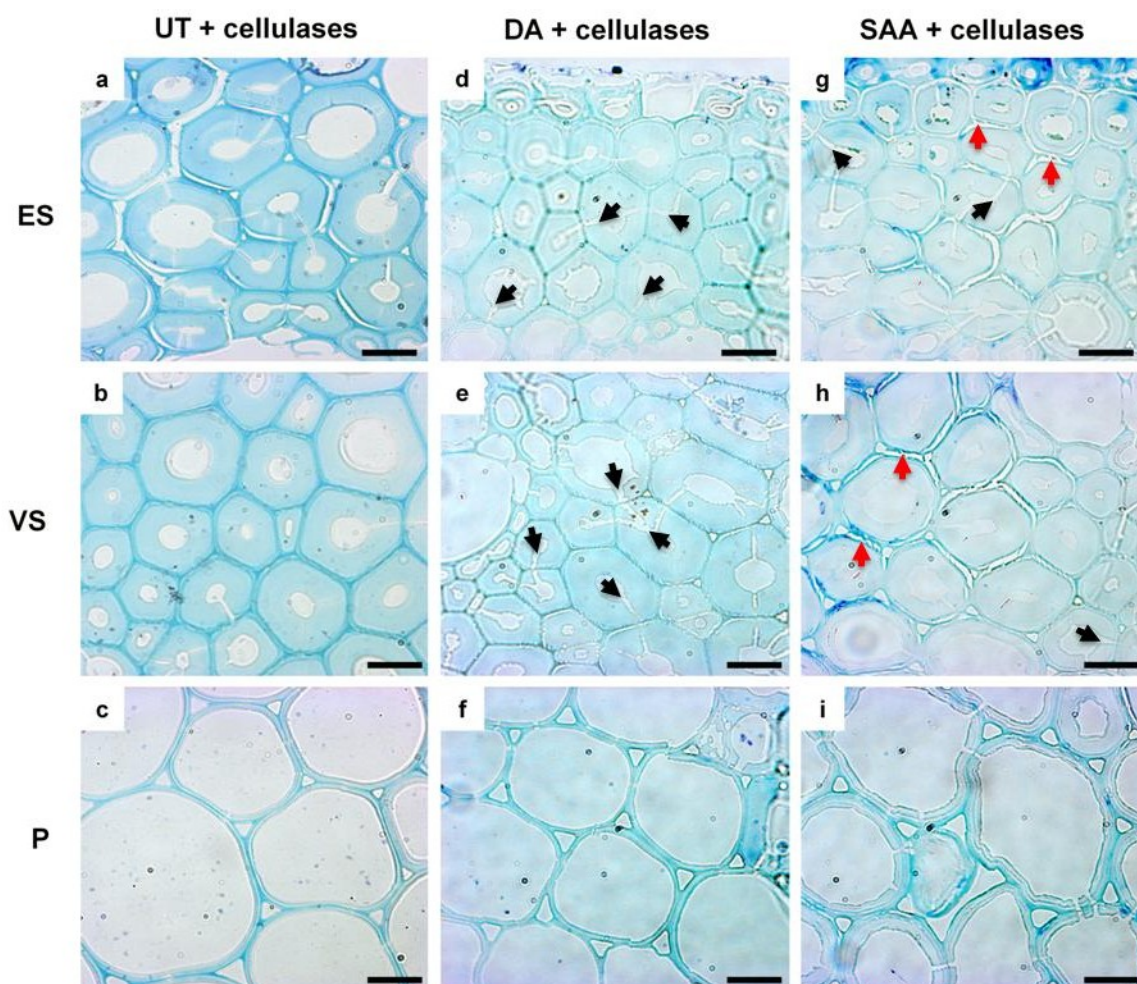


Fig. 5: Impact of cellulases on miscanthus internode cells. Toluidine blue staining of semi-thins sections of miscanthus cells after cellulases conversion of untreated (UT) (a,b,c), acid treated (DA) (d,e,f) and ammonia treated (SAA) (g,h,i).

Sub-epidermal sclerenchyma (ES) (a,d,g), perivascular sclerenchyma (VS) (b,e,h) and parenchyma (P) (c,f,i). Black arrows indicate pits enlargement close to the lumen; red arrows indicate middle lamellae alteration. Scale bar = 10 μ m.

3 Cellular UV micro spectrometry analysis

3.1 Lignin and hydroxycinnamic acids distribution in cell types of miscanthus internodes

The impact of pretreatments on the phenolic components of miscanthus internode cell walls was characterized in situ by UV transmission micro spectrophotometry. Absorption spectra were recorded in SW and CC of the three cell types, i.e., sub-epidermal sclerenchyma,

perivascular sclerenchyma and parenchyma. The thin cell walls of the vessels were analyzed using the 0.5 μm diameter spot and could include secondary and primary walls.

All cell walls showed a UV absorbance peak around 280 nm due to the conjugated groups in the aromatic structure of the S and G units of lignin [346]. The spectra also showed a shoulder with λ_{max} at 310-320 nm corresponding to p-coumaric and ferulic acids (Fig. 6). Secondary cell walls in untreated miscanthus showed distinct spectra with absorbance peaks at 280 nm, 285 nm and 290 nm in ES, VS and parenchyma, respectively (Fig. 6 a). The parenchyma and VS spectra showed additional absorption peak at 310-320 nm whereas absorbance in ES was lower in this region than at 280 nm (Fig. 6 a). UV absorbance at cell corner-middle lamella was much higher compared to secondary walls of corresponding cells. Spectra showed a λ_{max} at 285 nm and a shoulder near 290 nm with maximum absorption at 310 nm (Fig. 6 b). The vessel cell walls, which included both secondary and primary walls, showed the same spectral pattern as the VS and parenchyma secondary cell walls (Fig. 6 b).

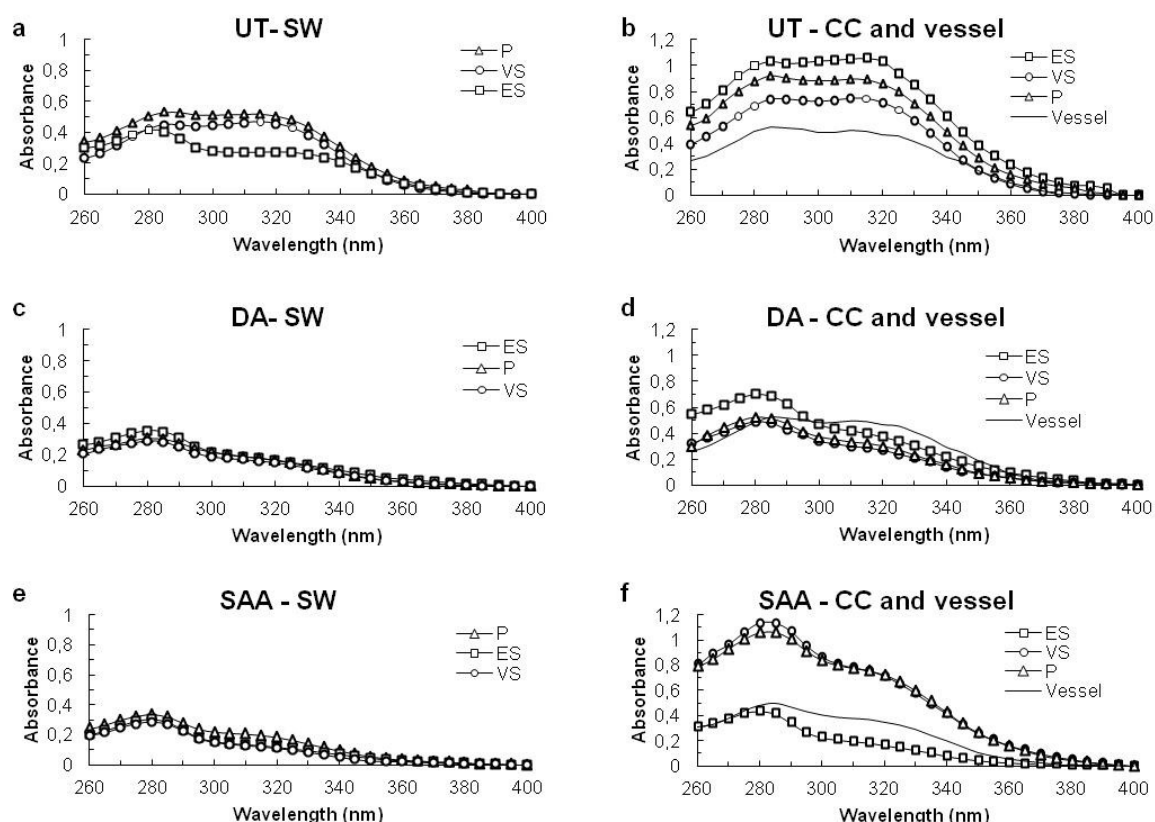


Fig. 6: UV absorbance spectra of miscanthus secondary cell wall (SW) (a,c,e), cell corner-middle lamellae (CC) and vessels (V) (b,d,f) of untreated (UT) (a,b), acid treated (DA) (c,d) and ammonia treated (SAA) (e,f) miscanthus internode.

Sub-epidermal sclerenchyma (ES), perivascular sclerenchyma (VS), parenchyma (P).

3.2 Impact of pretreatments on lignin and hydroxycinnamic acids distribution

Similar UV spectra were recorded for the SW of all tissues after DA and SAA pretreatments. Irrespective of cell type, and in contrast to the untreated sample, the spectra showed a decrease in absorbance near 310 nm and a shift of λ max from 285-290 nm towards 280 nm (Fig. 6 c, e). Pretreatment had a more variable impact on the cell corner-middle lamella. Absorbance at both 280 and 310 nm was highly reduced after DA (Fig. 6 d), whereas after SAA, cell corner absorbance at 280 nm was reduced only in ES and not in VS or parenchyma. However, absorbance at 310 nm was reduced after SAA in all CC (Fig. 6 f). In contrast, the absorption spectra for vessels were almost unchanged after the pretreatments with a slight reduction in absorbance at 310 nm after SAA (Fig. 6 b, d, f).

The impact of pretreatment on the distribution of phenols according to cell type was determined by comparing absorbance at λ max in the 280-290 nm regions and the absorbance ratio at the main peaks (A315/A280) (Fig. 7). Whatever the cell type, absorbance in the region close to 280 nm was reduced by SAA and DA in the secondary walls. Notably absorbance at 280 nm decreased by approximately 30% in VS and by 40% in secondary wall parenchyma, after both pretreatments (Fig. 7 a). In contrast, in comparison to the untreated specimen, the CC of ammonia-treated samples showed higher absorbance at 280 nm for VS and P whereas the CC of acid treated specimens gave lower values (Fig. 7 b). Vessel cell walls showed no significant changes in absorbance (Fig. 7 c). Lower (A315/A280) ratios were obtained after chemical treatments, irrespective of the cell type (ES, VS, P or V) and cell wall region (Fig. 7 d-f).

3.3 Impact of enzymatic hydrolysis on lignin and hydroxycinnamic acids UV absorption

After enzymatic hydrolysis, UV spectra were recorded on SW regions that maintained their apparent integrity, as observed by light microscopy and compared to control samples. The UV absorption spectra of ES and of the parenchyma cell walls of untreated miscanthus were almost unchanged in contrast to VS that showed a slight reduction in absorbance close to 310 nm (Fig. 8 a-c). Secondary walls of acid-treated samples showed increased UV absorption 260-350 nm (Fig. 8 d-f) after enzymatic hydrolysis. Different patterns were observed after saccharification of ammonia-treated miscanthus. The spectrum of secondary wall ES remained unchanged (Fig. 8 g), whereas the absorbance of VS was higher at 310 nm (Fig. 8 h)

and the overall absorbance was increased for the parenchyma cell walls (Fig. 8 i). The A315/A280 ratio of SW increased after enzymatic saccharification of treated samples as compared to untreated samples; the largest increase was shown for parenchyma and vascular sclerenchyma of DA and SAA pretreated samples, respectively (supplementary data 1). The UV spectra of the cell corner-middle lamella were also affected by enzymatic hydrolysis (supplementary data 2). Enzyme digested UT samples showed weak variation as compared to initial samples (Fig. 6 b). Acid-treated samples showed a marked increase in UV absorbance whereas the absorbance of both VS and parenchyma was markedly decreased in ammonia-treated miscanthus after saccharification (supplementary data 2; Fig. 6 d,f).

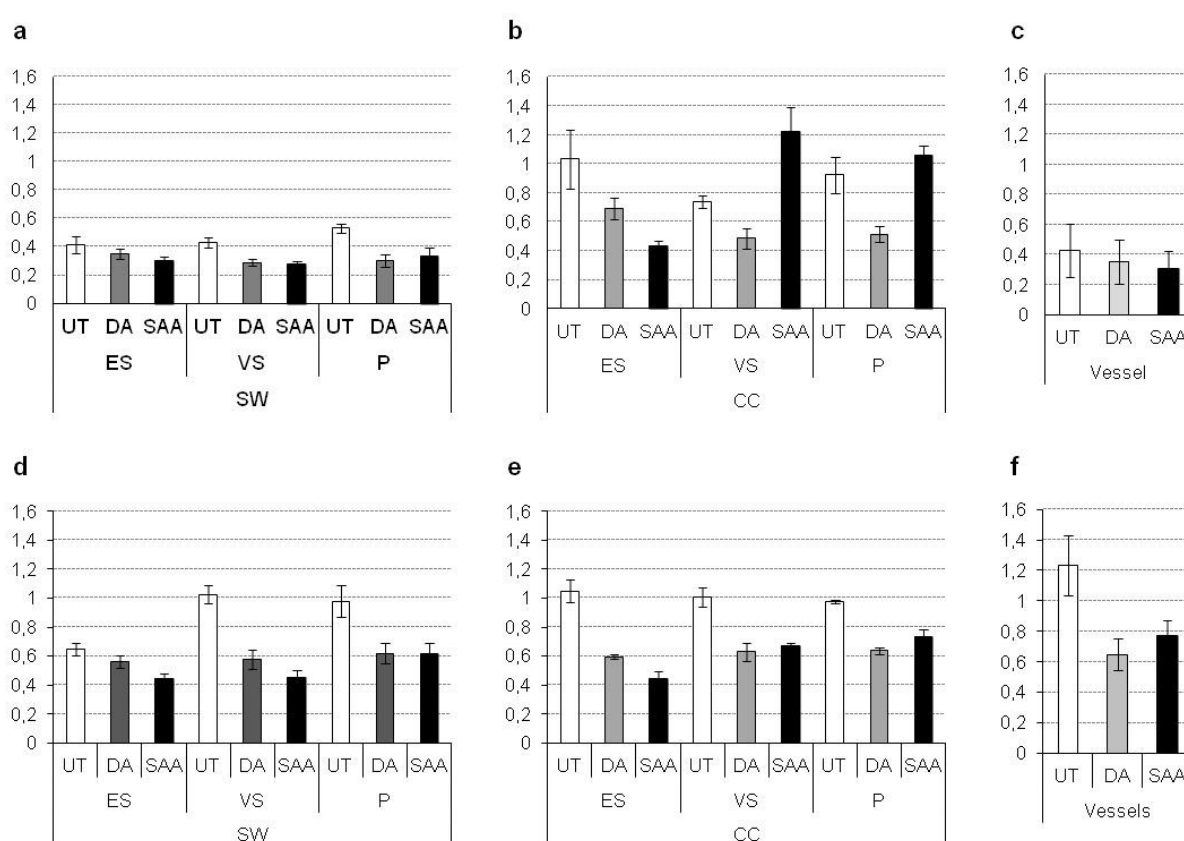


Fig. 7: Impact of chemical pretreatments on absorbance at 280 nm (a,b,c) and A315/A280 absorbance ratio (d,e,f) of miscanthus secondary cell wall (SW) (a,d), cell corner-middle lamellae (CC) (b,e) and vessels (V) (c,f). Error bars indicate standard deviation.

Untreated (UT), acid treated (DA), ammonia treated (SAA) internodes

Sub-epidermal sclerenchyma (ES), perivascular sclerenchyma (VS), parenchyma (P)

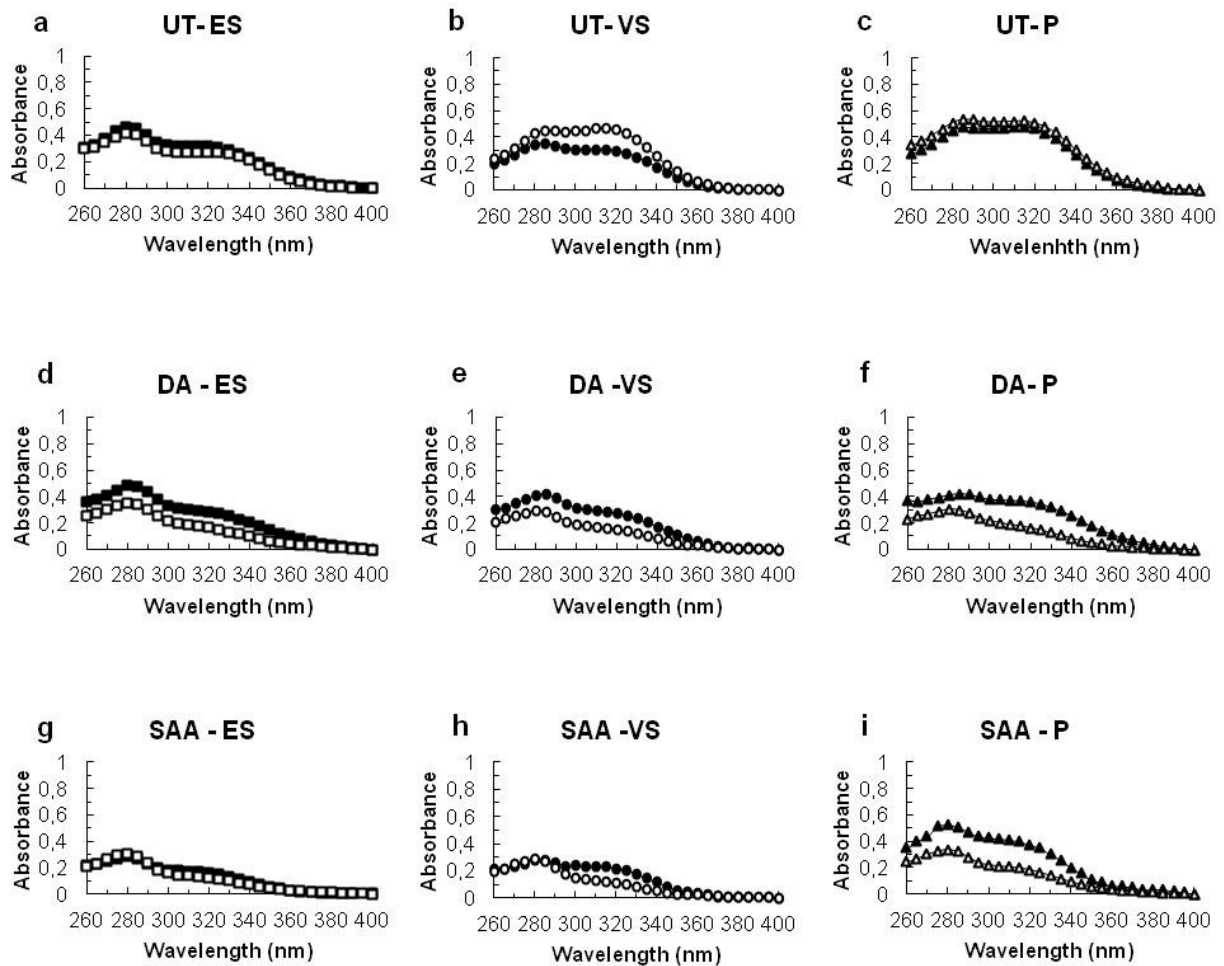


Fig. 8: UV absorbance spectra of miscanthus secondary cell walls after cellulases conversion of untreated (UT) (a,b,c), acid treated (DA) (d,e,f) and ammonia treated (SAA) (g,h,i) miscanthus internode. Open symbols: control samples; bold symbol: cellulases treated samples.

Sub-epidermal sclerenchyma (ES) (a,d,g), perivascular sclerenchyma (VS) (b,e,h) and parenchyma (P) (c,f,i).

Discussion

1 Pretreatments have a distinctive effect on the chemical components and saccharification ability of miscanthus internodes

We investigated the impact of combined pretreatment and enzymatic saccharification of miscanthus cell walls by focusing on the rind tissues of the basal internodes of winter-harvested miscanthus as these tissues account for most of the internode dry matter. The

proximal composition of these selected tissues was in close agreement with previous data reported for miscanthus internodes harvested at a similar stage of maturity [28]. After pretreatments, the conversion yields were moderate; this can be linked to the pretreatment severity but also the use of hand-cut miscanthus small fragments rather than milled sample. Indeed, the feedstock particle size and the grinding process can influence lignocellulose bioconversion [347]. The dilute acid pretreatment at high temperature modified the chemical composition of internodes more efficiently than soaking in aqueous ammonia, and therefore improved cellulose conversion to a greater extent. This improvement is mainly due to a primary effect of DA on hemicellulose dissolution and lignin redistribution [348]. However, lignin could accumulate depending on the severity of the pretreatment, which may explain lower conversion yields of DA treated miscanthus internodes as compared to organosolv pretreatment [25]. Lower conversion yields were also obtained after SAA treatment in this study, as compared to previously reported data for aerial biomass of miscanthus, switchgrass and corn stover [28, 227, 228, 349]. Indeed although SAA has been reported to result in significant lignin extraction from grass tissues [28, 227, 349], the lignin reduction obtained for the outer tissue of miscanthus internode was relatively low, and consistent with the very slight loss of dry matter. Internode rind displays higher resistance to bioconversion than leaves or internodes pith [28, 350]. Furthermore, the enzymatic cocktail that we used was not improved with regard to xylanase activity which may decrease cellulase inhibition by xylan-derived oligosaccharides [322].

Little is known about the impact of changes in lignin structure and the amounts of hydroxycinnamic acids in miscanthus occurring after chemical pretreatments. The proportion of p-coumaric acid in miscanthus internodes is almost seven-fold higher than that of ferulic acid, as reported earlier [28]. In comparison to DA, the removal of large amounts of ester-linked PCA and FA from miscanthus internode by SAA was insufficient to overcome cell wall recalcitrance to enzymatic saccharification. Ammonia acts by cleaving the ester linkages between FA and the arabinose moiety of the xylan chain and also efficiently disrupts the coumaric acid ester [63]. In addition to extracting hemicelluloses, acid pretreatment may cleave some of the ether linkages between FA and lignin, thereby increasing the exposure of cellulose to cellulase. Although the lignin content did not decrease, the chemical pretreatments altered lignin structure so that the residual lignin was more condensed (i.e. contained a higher proportion of condensed linkages). These results can be related to preferential extraction of the ether-linked lignin fraction by ammonia, as previously shown

[28], but also to the enhanced formation of side reaction products during DA under severe conditions [351].

2 Distinct cell wall reactivity to pretreatments and enzymatic saccharification

Our study mainly aimed at investigating cell wall phenolic distribution in the different lignocellulosic cells of miscanthus internode, therefore observations were focused on transverse sections of internode fragments. In general, the histological integrity of the internode tissue cells was maintained following mild pretreatments. Thus, after dilute acid pretreatment, the middle lamella was preserved whereas Hallac et al. (2010) had observed that the middle lamella showed some alteration after ethanol organosolv pretreatment of *B. davidii* [273]. This observation suggests DA performed without organic solvent was less effective on the highly lignified middle lamella. Soaking in aqueous ammonia had less effect on internode composition but induced a general swelling of the cell walls. This trend could be related to the weaker crystallinity of cellulose brought about by the disruption of hydrogen bonding and/or softening of the hemicelluloses/lignin matrix as recently observed in AFEX treated maize cell walls [258].

Our microscopic observations revealed that DA and SAA pretreatments had different effects on the three cell types (ES, VS and P) during enzyme degradation. These different digestive effects of the cellulolytic cocktail on DA and SAA pretreated tissues may result from variations in chemical and/or structural alterations [337, 338]. The thick-walled cells of pretreated miscanthus ES and VS seem to be more readily digested by cellulases than the parenchyma, thus confirming previously reported observations of lower recalcitrance of sclerenchyma to biological conversion than the parenchyma and vessels [31, 352]. On the whole, the cell wall morphology displayed few changes such as pit enlargements at the lumen side after enzyme treatment which is consistent with the relatively moderate extent of internode degradation by the *Trichoderma reesei* cellulolytic cocktail (33% and 20% cellulose conversion after DA and SAA respectively). Although cell pits are not abundant in sclerenchyma fibers, they may provide weaker points through which the enzyme can gradually degrade the cell wall regions [353]. However, there was little modification in the parenchyma pits in both the acid- and enzyme-treated samples, which may be explained by the different compositional features, especially phenols distribution as compared with ES and VS [76]. Hence the vessels, which have numerous pits, were highly recalcitrant likely due to their high lignin concentration and particular lignin composition [317]. Both DA and SAA

were performed in the absence of a polar solvent which might have prevented any redeposition of lignin. Nevertheless, the middle lamella was much weaker after SAA than after DA. This observation is consistent with recent studies on ammonia-based pretreatments indicating preferential penetration through middle lamellae and outer cell wall layer [258].

3 Pattern of phenols distribution during pretreatment and saccharification

The removal or possible enrichment in cell wall phenolics which might limit cellulase progression and efficiency were investigated by examining changes in the cell wall distribution of phenolic components after pretreatment and enzymatic conversion. The UV absorption spectra of the cell walls were typical of grass cell walls, exhibiting two main absorption maxima in the 280-290 nm and 310-325 nm regions, corresponding to lignin and phenolic acids [318]. Recently, UV absorbance on sugar cane secondary cell walls was recorded in relation to delignification and enzymatic hydrolysis [318]. A general decrease in absorbance over the UV range was reported after delignification. In our study, we observed that chemical pretreatment similarly altered the UV spectra of the cell walls. Except for the vessels, the secondary cell walls and cell corner-middle lamella of most of the rind cells (ES, VS and P) exhibited lower UV absorbance after chemical treatments. The decrease could mainly be attributed to phenolic acids contents as indicated in the chemical data for the DA and SAA samples.

Since both lignin and phenolic acids contribute to UV absorbance, the impact of the pretreatment at the cell level could be estimated by comparing changes in the ratio of absorbance around 280 to 315 nm. For ES, VS and P, this ratio decreased with both ammonia and acid pretreatments, thereby indicating the preferential removal of phenolic acids and their contribution to the lower absorbance at 280 nm. The effect was not dependent on the cell wall layer as both secondary walls and cell corners underwent similar changes after DA. However, the VS and P cell corners in the ammonia-treated samples exhibited the same absorbance at 280 nm as those in the untreated samples, suggesting that ammonia removed phenolic acids more effectively than lignin in these regions. This might explain the relative recalcitrance of CC middle lamellae to enzymatic degradation as compared to the middle lamellae/primary walls which were partially degraded. However, no UV spectra could be obtained on the middle lamellae/primary walls because of the thinness of this layer.

Although the phenolic components were altered by pretreatments, variations in degradability, as highlighted by our microscopic study, indicated that other physicochemical and structural features components are involved in the cell wall recalcitrance. Change in the lignin structure after miscanthus pretreatments, i.e. more condensed lignin, and in the interaction between phenolic components and polysaccharides or within the recalcitrant lignin structure cannot be distinguished by UV micro spectrophotometry. Studies on the distribution of specific domains using antibodies raised against lignin substructure or phenolic acid could provide further understanding at ultrastructural levels [258].

Conclusion

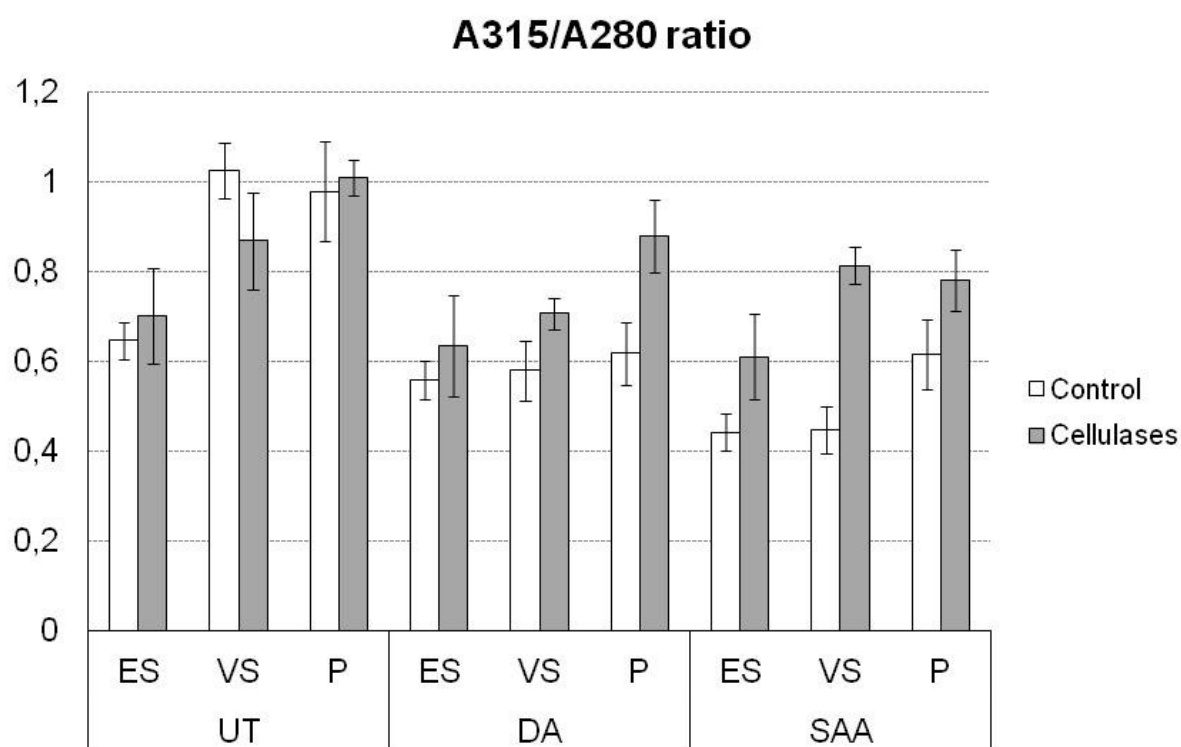
Our study clearly showed that the chemical composition and the enzymatic saccharification of miscanthus internodes were differently impacted by acid and ammonia pretreatments. Microscopic observations have shown a general swelling effect of ammonia on the cell walls. Lignin and phenolics distribution in secondary cell walls of parenchyma and sclerenchyma appeared more homogeneous after pretreatments as shown by UV transmission microspectrophotometry while cell corner displayed distinct spectral properties according to cell type and pretreatment. Although enzymatic saccharification yielded moderate conversions yields, the thick-walled sclerenchyma cells seem more degraded as compared to parenchyma, with pits domains being preferential cell wall targets of cellulolytic enzymes. The phenolic distribution in the secondary cell walls varied between parenchyma and sclerenchyma after enzyme conversion of SAA and DA pretreated internodes. In addition UV absorption of cell corners increased in cellulase-DA pretreated cells in contrast to cellulase–SAA samples. This result suggests a heterogeneous distribution of phenolic domains in the recalcitrant cell walls according to the pretreatment.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge TUCK foundation (ENERBIO funds) for the financial support of the PhD position of Belmokhtar Nassim. We are also grateful to Crônier D. and Mison T. for technical assistance.

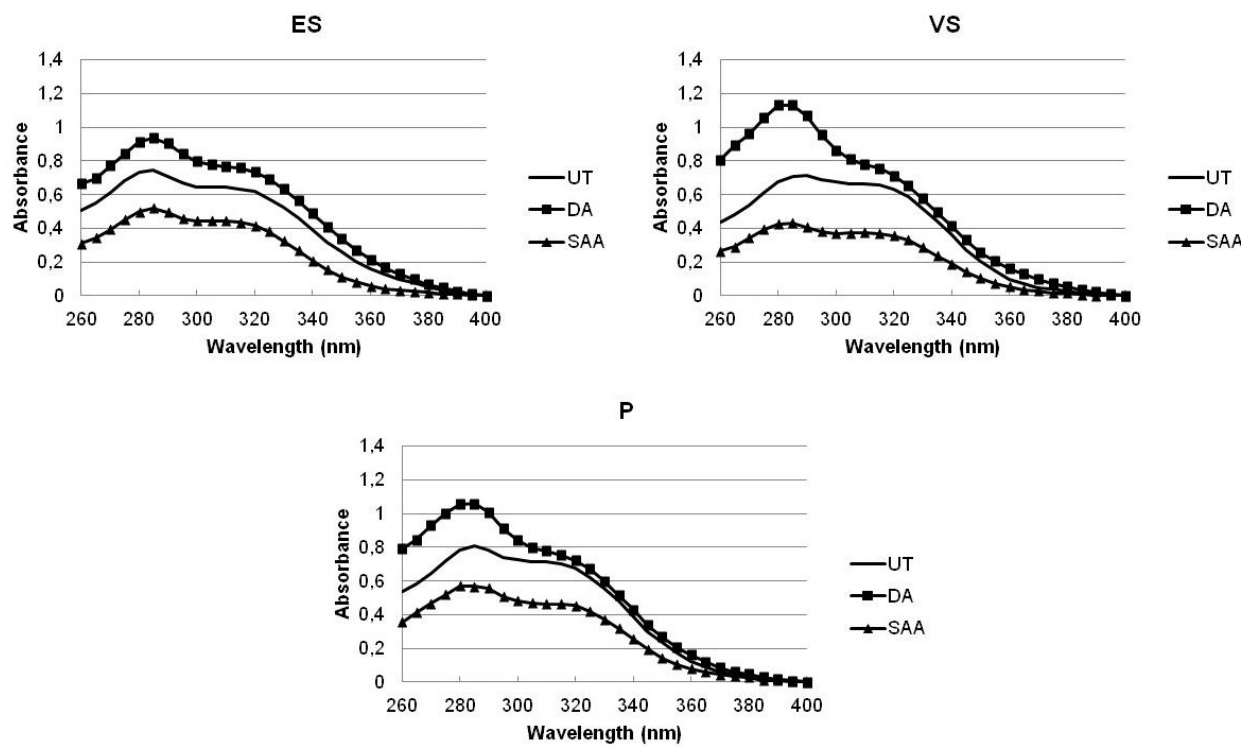
Supplementary data 1

A315/A280 absorbance ratio of secondary cell walls after cellulases conversion of untreated (UT), acid treated (DA) and ammonia treated (SAA) miscanthus internode. White bars = control samples, without enzymes, grey bars = cellulases treated samples. Error bars indicate standard deviation.



Supplementary data 2

UV spectra recorded on cell corner-middle lamella between sub-epidermal sclerenchyma (ES), perivascular sclerenchyma (VS) and parenchyma (P) from cellulases-digested internodes of untreated (UT), acid-treated (DA) and ammonia-treated (SAA) miscanthus.



CHAPITRE IV

Etude de la progression des cellulases CBH1 et
EG1 au sein des parois du miscanthus

Chapitre IV : Etude de la progression des cellulases CBH1 et EG1 au sein des parois du miscanthus

Objectifs de l'étude

La progression des enzymes cellulolytiques au sein des parois et l'accès à la cellulose sont essentiellement limitées par la structure et la porosité des complexes pariétaux. L'étude de la diffusion des enzymes peut fournir de précieuses informations sur l'impact des prétraitements et les éléments freinant l'hydrolyse enzymatique.

Parmi les différentes techniques d'étude de la diffusion des enzymes au sein de la biomasse lignocellulosique, la détection par immunolocalisation ou par détection d'un marqueur fluorescent couplé à la protéine permettrait d'identifier les structures impliquées dans le blocage des cellulases et d'apprécier l'impact des prétraitements sur l'accessibilité à la cellulose. Cette approche avait déjà été appliquée à l'UMR FARE sur des co-produits de blé, afin d'appréhender les cibles cellulaires et pariétales d'une endoxylanase de la famille GH11 de *Thermobacillus xylanolyticus*. Dans ce cas, la progression de formes actives et inactives ont été comparées pour étudier la dégradation des xylanes de son de blé [354].

Dans notre cas, l'objectif était d'utiliser des cellulases pures (CBH1 et EG1) et leurs anticorps spécifiques α -Cbh1 et α -Eg1 disponibles dans le département de biotechnologie d'IFPEN. En plus de l'utilisation de ces cellulases sous leur forme active, nous avons produit des cellulases CBH1 et EG1 inactives afin de les utiliser comme sondes pour apprécier d'éventuelles contraintes liées à l'encombrement stérique des enzymes et l'affinité des cellulases pour leur substrat ou leur adsorption non spécifique sur les structures de lignines environnantes (adsorption passive). L'application de cette démarche dans notre étude sur les cellulases de *Trichoderma reesei* s'est toutefois heurtée à plusieurs difficultés dont les principales sont résumées dans ce chapitre.

1 Matériels et méthodes

1.1 Croissance de la souche *Trichoderma reesei*

La souche de champignon *Trichoderma reesei* CL847 TR 3002 a été retenue au cours de cette étude et produite sur le milieu TR [15 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 g/L de calcium et 0,6 g/L de magnésium et quelques oligo-éléments (tableau VIII)].

L'ensemble des cultures sont incubées pendant 7 jours à 30°C (incubateur Infors, agitation 100 rpm). Le pH des surnageants de cultures a été vérifié quotidiennement avec un indicateur de pH (papier). L'acidité pouvant apparaître en cours de croissance est neutralisée par ajout de quelques gouttes de KOH 1M.

Tableau VIII: Oligo-éléments du milieu TR.

Eléments traces	1000X	1X
FeSO ₄ , 7H ₂ O	5 g/L	0,005 g/L
CoCl ₂	3,7 g/L	0,0037 g/L
MnSO ₄ , H ₂ O	1,6 g/L	0,0016 g/L
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1,4 g/L	0,0014 g/L

1.2 Analyse des surnageants de cultures

1.2.1 Dosage des protéines

Les concentrations en protéines des surnageants de culture de *T. reesei* sont dosées selon les méthodes classiques, décrites par Bradford (1976) [355] et Lowry (1951) [356].

1.2.2 Analyse par électrophorèse

Les profils protéiques correspondant aux surnageants sont analysés en conditions dénaturantes à l'aide de gels de polyacrylamide et en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Des gels contenant 12% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5:1) sont ainsi réalisés selon le protocole de Laemmli (1970) [357]. Après décongélation, les échantillons sont maintenus sur glace et additionnés d'un volume de tampon de charge SDS 2x (Sample buffer 2x; Bio-rad). Ces échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour obtenir une dénaturation optimale puis stockés sur glace. La séparation des différents polypeptides est effectuée à ampérage constant ($A = 33 \text{ mA}$) jusqu'à migration complète du marqueur de poids moléculaire. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie à l'aide du kit "Biosafe Coomassie Blue" de Bio-Rad.

1.2.3 Dot-blot

Cette méthode permet de détecter la présence de protéines même en petites quantités en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement son antigène.

Une goutte (1 à 2 μ L) du surnageant de culture est déposée sur une membrane de nitrocellulose Hybond-ECL (RPN 2020D, GE Healthcare/Amersham). Après séchage de la goutte, la membrane est transférée dans une boîte contenant un tampon de blocage [TBS-T, Tris Buffred Saline, Tris base) lait 5%] pendant 60 minutes afin d'empêcher toute fixation aspécifique par l'anticorps primaire. La membrane est ensuite incubée pendant au moins 60 minutes dans le tampon T-BST lait 5% contenant l'anticorps primaire de lapin dilué (anti-CBH1 : 1/10000 ; anti-EG1 : 1/5000). Trois lavages successifs par du T-BST lait 1% permet d'éliminer toute trace d'anticorps primaire fixé de manière aspécifique. L'anticorps secondaire de chèvre (anti-lapin couplé à la HRP, Biorad 1721019) dilué (1/3000) dans une solution de T-BST lait 1% est ensuite appliqué durant 60 minutes. Après plusieurs lavages dans le tampon T-BST 1%, nous avons procédé à la révélation de l'anticorps secondaire à l'obscurité en utilisant un kit ECL Plus Western Blotting (RPN 2132, GE Healthcare/Amersham) un développeur et un fixateur (Kodak).

1.3 Matériel utilisé pour l'ensemble des constructions génétiques

Enzymes de restriction : *HindIII*, *NheI*, *NdeI*, *SpeI* et *StuI* de New England Biolabs. Les digestions ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur.

Amplification PCR : DNA Polymerase pfx kit (Invitrogen)

Desphosphorylation permettant la non-recircularisation du plasmide vide : Alkaline phosphatase Antarctic kit (NEB)

Extraction de gel: Low melting point agar (Nusieve[®] GTG[®] agarose)

Ligation: T4 DNA ligase (New England Biolab)

L'ensemble des plasmides intermédiaires ont été extraits par le kit " Plasmid extraction mini ou midi prep" de Qiagen.

Les PCR sont réalisées dans un thermocycler Bio-Rad "i-cycler"

1.4 Méthodes de transformation de la souche *Trichoderma reesei* CL847

1.4.1 Obtention des protoplastes (adaptée de Berges, 1991 [358])

Cinq fioles de Roux, contenant chacune 200 mL de milieu FRIES (5 g/L de glucose, 5 g/L d'extrait de malt, 2,5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de bactopectone, 5 mg/mL biotine, 50 mg/L ampicilline) sont ensemencées avec des spores fraîches de *Trichoderma reesei* CL 847 et incubées 3 jours à 30°C. Le mycélium est ensuite filtré à travers 3 à 4 épaisseurs de gaze stérile puis lavé dans 200 mL de milieu KPAm (25 mM de KH_2PO_4 , 0,6 M de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, pH 5,8) pendant 30 minutes à 37°C. Le mycélium est à nouveau filtré à travers 3 à 4 épaisseurs de gaze stérile. Les parois du mycelium sont digérées après une incubation de 2,5 heures à 37°C dans 100 mL de milieu KPAm additionné de 30 mg/mL de Glucanex (Novozymes). Le milieu de digestion est ensuite filtré à travers 3 à 4 épaisseurs de gaze stérile, puis filtré à travers un verre fritté porosité n°1. Le dernier filtrat est ensuite recueilli dans 4 tubes Corex puis centrifugé pendant 5 min à 4000g. Les culots sont lavés 2 fois par 20 puis 10 mL de CTS10 (0,4 M saccharose, 0,1 M Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7,5). Les cellules sont ensuite lavées par 4 x 5 mL de CTS 50 (0,4 M saccharose, 0,1 M Tris-HCl, 50 mM CaCl_2 , pH 7,5). Après une dernière centrifugation, les culots sont repris dans du CTS 50 pour obtenir une concentration de 2×10^8 Cellules/mL après comptage en cellule de Malassez.

1.4.2 Transformation

Pour chaque transformation, à 50 μL de cellules compétentes sont ajoutés 5 μg d'ADN, le tout est incubé 10 minutes à température ambiante. Après ajout de 500 μL de PEG 60% (60% PEG 4000, 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), on incube 20 minutes à température ambiante puis on ajoute 450 μL de CTS50. Après addition de 20 mL de solution de saccharose à 1,6 M préalablement chauffée (légèrement 45°C maximum) puis l'agent de sélection et 20 mL de milieu PDA (Potato Dextrose Agar) en surfusion (55°C) les cellules sont déposées en surcouche (8 mL/boîte) sur milieu PDA, 0,2M de saccharose et un agent de sélection (antibiotique).

1.4.3 Procédé de criblage

Une série de criblages (figure 20) est réalisée afin de sélectionner les meilleurs clones. Nous avons ainsi réalisé trois repiquages successifs sur un milieu sélectif (résistance à des antibiotiques) solide à partir de la génération R0 pour obtenir des spores donnant naissance à la génération R1. Ces spores sont ensuite isolées en appliquant une nouvelle pression de

sélection. Les mycéliums (R2) qui se développent sont stables et contiennent une population homogène au niveau génétique. Une nouvelle étape de repiquage est réalisée sur milieu sélectif pour produire des spores stables (R3). Une dernière étape de repiquage permet de produire une grande quantité de spores à conserver pour nos travaux ultérieurs.

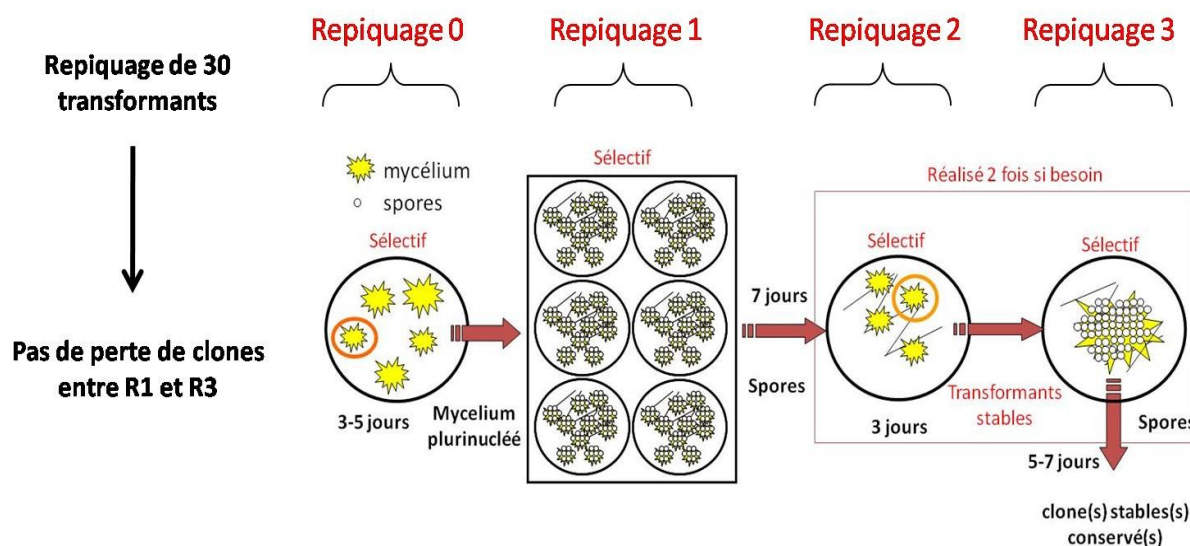


Figure 20: Méthode de criblage des transformants de *Trichoderma reesei*.

1.5 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique de la souche *Trichoderma reesei* CL847 a été extrait à partir du matériel produit pendant 10 jours en culture de 50 mL. Le mycélium de culture est récupéré après centrifugation à 8000 rpm durant 15 minutes à 4°C puis congelé à l'azote liquide et broyé dans un mortier en porcelaine. Environ 2,5 g de mycélium broyé sont mis en suspension dans 12,5 mL de tampon d'extraction (200 mM Tris/HCl pH = 8,5 + 250 mM NaCl + 25 mM EDTA dans 0,5% SDS). Un volume de 8,75 mL de phénol est ensuite ajouté dans le même tube avant de procéder à un mélange doux par inversion. Un volume de 3,75 mL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) est enfin ajouté avant de centrifuger le mélange pendant 60 minutes à 11000 rpm à 4°C. La fraction aqueuse est récupérée puis additionnée d'isopropanol et centrifugé afin de récupérer un culot contenant l'ADN. Après lavage à l'éthanol, l'ADN est séché puis remis en suspension dans une solution d'eau ultra-pure. Toute présence d'ARN est évitée par incubation de l'ADN en présence de RNAase A pendant 10 minutes à 37°C.

1.6 Préparation des échantillons de miscanthus

La partie centrale des entre-nœuds n°2 (basal) des tiges de Miscanthus (récolte tardive), a été isolée et découpée en petits fragments triangulaires de 2 à 3 mm d'épaisseur (figure 21).

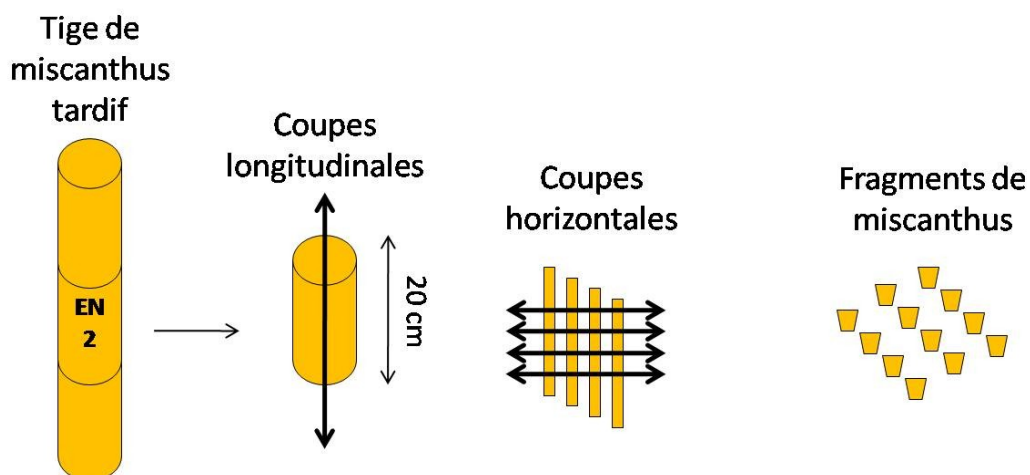


Figure 21: Obtention de fragments à partir d'entre-nœud n°2 d'une tige de miscanthus.

1.7 Prétraitement alcalin

Les fragments sont placés dans une solution d'ammoniaque 33% avec un ratio massique miscanthus/ammoniaque de 1/6 pendant 5 jours à température ambiante à obscurité [227]. Les fragments de miscanthus sont ensuite lavés à l'eau jusqu'à obtention d'une valeur de pH neutre, et séchés à 35°C pendant 12h.

1.8 Hydrolyse enzymatique

Les fragments de miscanthus issus de l'entre-nœud n°2 natifs ou prétraités sont pré-mouillés dans un tampon acétate (10 mM, pH 4,8) contenant 0,02% d'azide de sodium pour empêcher toute prolifération de microorganismes à 50°C. La réaction d'hydrolyse enzymatique est lancée par ajout du cocktail cellulolytique de *Trichoderma reesei* CL847 TR 3002 (70 FPU/g de substrat) et se poursuit à 50°C durant 144h.

1.9 Observations microscopiques

Les fragments natifs et prétraités à l'ammoniaque sont préparés pour les observations microscopiques en suivant la méthode décrite dans le chapitre III. Les blocs d'Epon contenant les fragments de miscanthus sont utilisés pour préparer des coupes semi-fines (0,5 µm

d'épaisseur) en utilisant un couteau de diamant (Diatome) monté sur un microtome de HM360 (Microm, France). Les coupes sont ensuite déposées sur des lames silanisées chargées positivement.

1.10 Immunolocalisation de cellulases

Nous avons utilisé les coupes semi-fines de miscanthus natif ou prétraité pour localiser les cellulases CBH1 et EG1. Les coupes ont été isolées sur la lame silanisée individuellement en utilisant un stylo histologique. Le tampon TBS-T utilisé tout au long de l'étude a été préparé de la façon suivante :

- Préparation Tris 0,2M : dissolution de 4,844g dans 200 mL H₂O milliQ (Fluka, 93352)
- Préparation HCl 0,1M : 1,65mL HCl pur + H₂O milliQ qsp 200 mL (SDS, 1010515)
- Solution tampon TBS-T: 85mL H₂O milliQ
65mL HCl 0.1M
50mL Tris 0.2M
0,2mL tween20 (Sigma, P5927)
0,2g NaN₃ (Sigma, S2002)
1,8g NaCl (Sigma, 9625)
Le pH a été vérifié et ajusté à 8,2

Nous avons procédé dans un premier temps au blocage des sites aspécifiques en déposant une goutte de 45 à 50 µL de tampon TBS-T lait 1% et de sérum de chèvre à 1% (Sigma, G9023). Les anticorps primaires de lapin (anti-CBH1 et anti-EG1, Eurogentec) dilués dans un tampon TBS-T lait 1% et sérum de chèvre 1% ont été appliqués sur les coupes de miscanthus pendant 4 heures et 30 minutes à température ambiante. Une étape de lavage a été ensuite réalisée pour éliminer toute trace d'anticorps primaire n'ayant pas fixé spécifiquement son antigène. Un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (GAR : Gaot anti-Rabit) couplé une particule d'or d'un diamètre de 5 nm et dilué au 1/40^{ème} dans un tampon TBS-T Lait 1% a été appliqué aux coupes de miscanthus (40 µL/coupe) pendant 1 heure. Toutes ces étapes se déroulent dans un milieu humide afin d'éviter toute modification des dilutions par évaporation. Les coupes sont enfin lavées intensément dans un tampon TBS-T Lait 1% (6 x 5 min) puis dans de l'eau déionisée (6 x 5 min).

La présence des billes d'or est révélée après intensification à l'argent (Silver enhancement kit Intense M, Amersham, RPN 491). Les lames ont été par la suite montées en utilisant l'Eukit (Euromedex, 15320). Le signal est alors immédiatement observable au microscope à épifluorescence.

2 Résultats et discussion

2.1 Production des cellulases CBH1 et EG1

Des cocktails enzymatiques riches en cellulases ont été produits en fermenteur (IFP Energies nouvelles). Ces cocktails sont utilisés soit pour réaliser des hydrolyses enzymatiques du substrat miscanthus, soit pour obtenir des quantités suffisantes d'enzymes pures et actives pour les stratégies d'immunocytolocalisation.

Une méthode de fractionnement des principales cellulases de *T. reesei* par chromatographie échangeuse d'ions FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), précédemment élaborée au sein du département biotechnologie de l'IFP Energie nouvelles, a été utilisée pour produire deux lots d'enzymes pures CBH1 et EG1. Dans le cas des enzymes inactives, nous avons ainsi choisi d'inactiver le résidu nucléophile localisé au sein de la triade catalytique de chacune de ces enzymes [144, 359].

2.2 Production de cellulases recombinantes

2.2.1 Les vecteurs d'expression

La production de cellulases recombinantes nécessite la mise au point de vecteurs plasmidiques portant les gènes de cellulases inactivées et des promoteurs rendant possible leur expression chez *T. reesei* CL847. Ces plasmides d'expression ont été produits par transformation dans une souche *E. coli* commerciale (TOP 10 - Invitrogen). Après avoir vérifié la bonne insertion des gènes d'intérêt, nous avons utilisé les plasmides pBLC0170 et pBLC0370, contenant respectivement les gènes *cbh1* et *egl* sous contrôle du promoteur de la glycéraldehyde phosphate deshydrogénase (*gpd*) d'*Aspergillus niger*, comme support pour modifier les gènes.

Ces modifications ont été obtenues en utilisant une technique de mutagenèse dirigée (kit QuickChange® II Site Directed Mutagenesis ; Stratagene). En se basant sur les données de la littérature, nous avons muté le Glutamate 212 du domaine catalytique de CBH1 (plasmide

pBLC0170 E212Q) ainsi que le glutamate 196 du domaine catalytique d'EG1 (plasmide pBLC0370 E196Q). Nous avons également inséré et muté ces gènes dans les plasmides possédant le promoteur et terminateur fongique de *cbh1*, permettant une induction en présence de différentes sources de carbone telle que le lactose, le cellobiose ou la cellulose. Nous avons ainsi obtenu les plasmides pBLC0120 E212Q pour l'expression de l'enzyme CBH1 inactive (CBH1i) et pBLC0320 E196Q pour produire EG1 sous forme inactive (EG1i). L'ensemble des constructions est résumé dans le tableau IX.

Tableau IX: Plasmides réalisés pour l'expression de cellulases inactives.

Vecteur plasmidique	Gène	Promoteur
<i>Expression du gène dans un milieu inducteur de cellulases</i>		
pBLC0120	<i>cbh1</i>	<i>cbh1 (T. reesei)</i>
pBLC0320	<i>egl</i>	<i>cbh1 (T. reesei)</i>
pBLC0120 E212Q	<i>cbh1</i> inactivé	<i>cbh1 (T. reesei)</i>
pBLC0320 E212Q	<i>egl</i> inactivé	<i>cbh1 (T. reesei)</i>
<i>Expression constitutive du gène</i>		
pBLC0170	<i>cbh1</i>	<i>gpd (A. niger)</i>
pBLC0370	<i>egl</i>	<i>gpd (A. niger)</i>
pBLC0170 E212Q	<i>cbh1</i> inactivé	<i>gpd (A. niger)</i>
pBLC0370 E212Q	<i>egl</i> inactivé	<i>gpd (A. niger)</i>

2.2.2 Construction de délétants *Trichoderma reesei* CL847

Parallèlement à la construction des vecteurs d'expression, nous avons construit des souches du champignon filamentueux *T. reesei* délétées des gènes *cbh1* et *egl* natifs. Il est en effet difficile, voir impossible dans le cas de CBH1, d'exprimer de manière hétérologue les principales cellulases de *Trichoderma*. Cette stratégie d'expression homologue a donc été envisagée dans un premier temps.

La construction des délétants CL847 se fait au moyen d'une cassette contenant le gène *hph*, conférant la résistance à l'hygromycine. Elle est entourée d'au moins 1000 nucléotides des

régions 5' et 3' du gène cible. Ce sont ces dernières régions qui permettent la recombinaison génique entre régions homologues (dit par « crossing-over ») (figure 22).

Nous avons construit ces cassettes par la technique de fusion PCR décrite par Yu et *al.*, (2004) [360]. La souche *Trichoderma reesei* CL847 a été transformée avec cette cassette ; seuls les clones stables et résistants à l'hygromycine sont retenus. La vérification, sur l'ADNg des clones sélectionnés, de l'absence de gène *cbh1* (figure 23-A) ou *eg1* (figure 23-B) a été réalisée par analyse PCR.

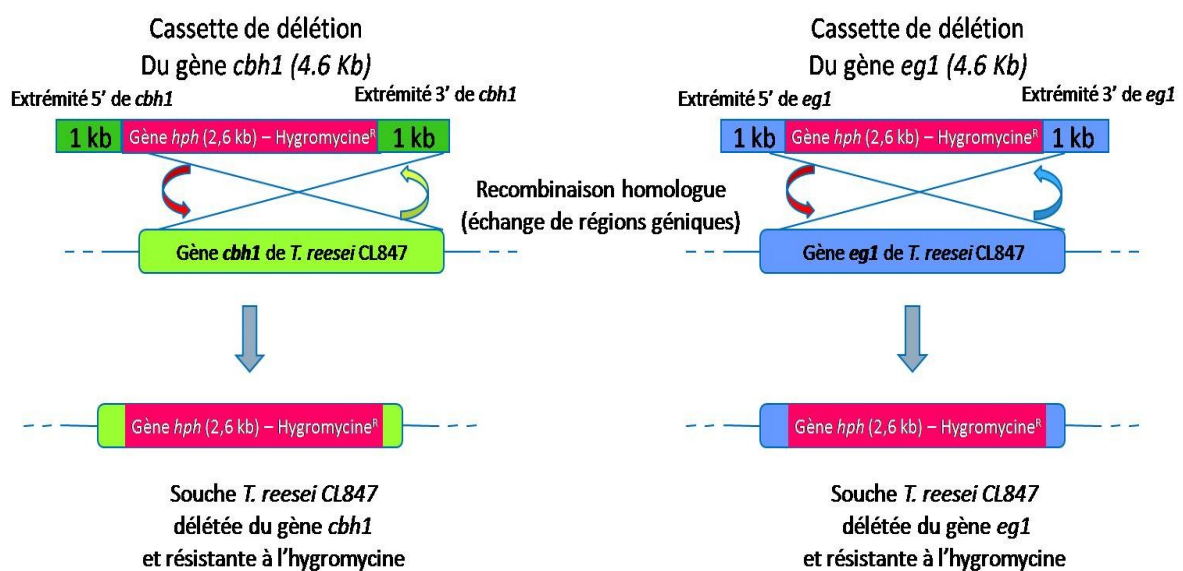


Figure 22: Principe de délétion de gènes par recombinaison homologue (crossing-over).

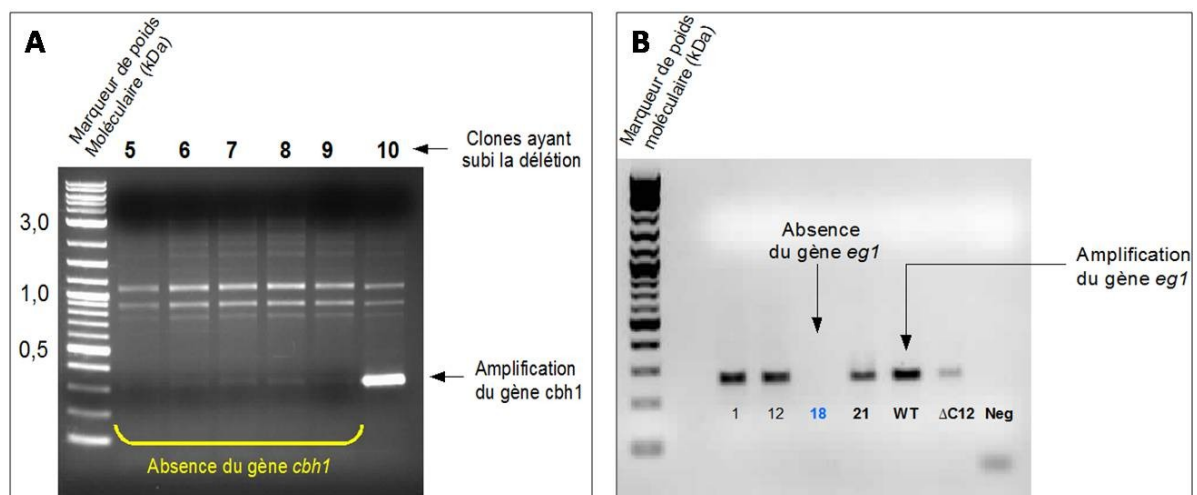


Figure 23: Criblage des candidats délétants *cbh1*(A) et *eg1* (B) par PCR sur ADN génomique. (WT : Wild Type, souche sauvage, Neg : Contrôle négatif).

Nous avons ensuite vérifié l'absence de production des deux cellulases dans le sécrétome des souches *T. reesei* CL847 $\Delta cbh1$ et $\Delta eg1$. Après détermination des teneurs en protéines, l'analyse des surnageants de culture par "Dot-blot" à l'aide des anticorps spécifique anti-*cbh1* et anti-*eg1* a confirmé l'absence de CBH1 et EG1 dans les souches délétées (figure 24).

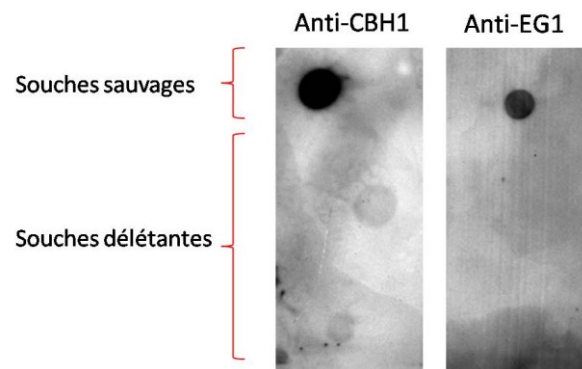


Figure 24: Vérification de l'absence de cellulases CBH1 et EG1 dans les souches délétantes.

2.2.3 Surexpression de cellulases inactives

Les souches *T. reesei* CL847 $\Delta cbh1$ et $\Delta eg1$ ont été transformées avec les plasmides d'expression portant les gènes codant CBH1i et EG1i, sous contrôle d'un promoteur *pcbhl* (expression en milieu lactose) ou un promoteur *pgpd* (expression en milieu Glycérol). Une très faible efficacité de transformation de ces souches a été observée par rapport aux souches sauvages. Une dizaine de transformants seulement sont obtenus par boîte de culture et ne sont pas tous viables après criblage. Quelques dizaines de clones stables ont été cultivés dans un milieu riche supplémenté en lactose ou en glycérol. Après 7 jours, l'analyse des surnageants de ces cultures par séparation des protéines sur gel SDS-PAGE et par immuno-détection Dot-blot montre que ces souches ne surexpriment pas les cellulases inactives. Nous avons cependant pu isoler un clone exprimant CBH1 sous sa forme native (contrôle de transformation) alors que le nombre de transformants obtenus était aussi faible que dans le cas des plasmides exprimant l'enzyme inactive.

L'absence d'expression de cellulases recombinantes inactives pourrait être due à plusieurs facteurs et leur résolution nécessiterait beaucoup de temps :

- Non sécrétion des enzymes : blocage sur la paroi fongique

- Mauvaise intégration ectopique des plasmides d'expression
- Déstabilisation des souches délétantes après une nouvelle transformation

Par la suite, nous avons opté pour une production de ces cellulases CBH1 et EG1 sous leur forme inactive via d'autres voies.

Obtention de CBH1 inactive : Nous avons inactivé CBH1 par des complexes métalliques de palladium $(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_6$. Selon Lassig *et al* (1995) le palladium se fixe aux résidus cystéines du site actif pour une inactivation irréversible de l'enzyme. Le CBD restant intact, l'enzyme garde sa capacité d'adsorption au substrat cellulosique et est toujours reconnaissable par son anticorps spécifique [361, 362].

Obtention d'EG1 inactive : Nous avons opté pour l'expression de cette enzyme dans un autre système d'expression. La levure *Yarrowia lipolytica*, connue pour sa capacité à produire des métabolites et sécréter des protéines hétérologues faiblement glycosylées, a donc été retenue pour réaliser cette expression. Cette production a été assurée par la société Protéus et a permis d'obtenir un lot d'enzymes EG1 inactive et reconnu par Western blot en utilisant l'anticorps anti-EG1.

3 Tentative d'immunolocalisation des cellulases

Une tentative de localisation des cellulases CBH1 et EG1 présentes dans les cocktails utilisés pour l'hydrolyse enzymatique des fragments de miscanthus (natif ou prétraité à l'ammoniaque) a été effectuée à l'UMR FARE. Différentes dilutions d'anticorps anti-CBH1 et anti-EG1 ont été utilisées afin de déterminer le seuil de détection des deux cellulases et de suivre leur diffusion après différents temps d'hydrolyse.

Les observations microscopiques n'ont pas permis de localiser spécifiquement les cellulases CBH1 et EG1 après révélation par l'anticorps secondaire couplé à une bille d'or de 5 nm. En effet l'observation de coupes de miscanthus n'ayant pas subi d'hydrolyse enzymatique révèle un signal après application de l'anticorps primaire de lapin anti-CBH1 puis de l'anticorps secondaire anti-lapin (figure 25-A). Le même signal a été observé après 144h d'hydrolyse enzymatique (figure 25-B). Les différents contrôles réalisés en présence de l'anticorps secondaire seul n'ont révélé aucune fixation aspécifique. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de la tentative de localisation d'EG1.

Le problème provient vraisemblablement des anticorps primaires. En effet, ces anticorps, produits chez le lapin, sont polyclonaux et peuvent non seulement reconnaître des épitopes présents à la surface des cellulases CBH1 et EG1 mais aussi probablement d'autres structures lignocellulosiques retrouvés dans l'alimentation des lapins.

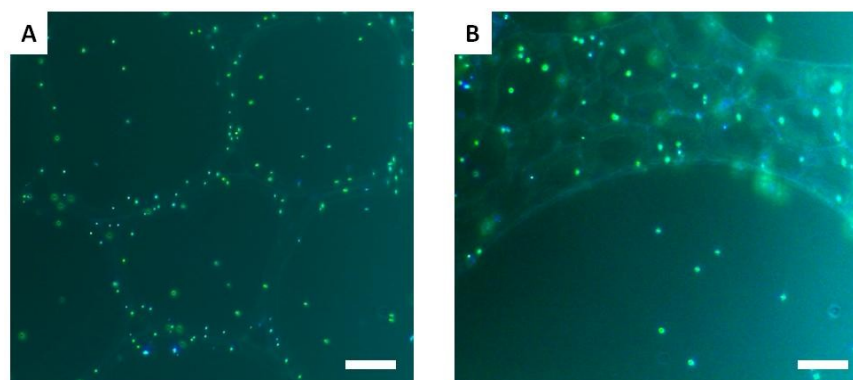


Figure 25: Essais d'immunolocalisation de CBH1 par un anticorps anti-CBH1 sur des parois de miscanthus. (A : sans enzymes, B : 144h d'hydrolyse enzymatique).

Nous avons ensuite tenté de réduire, voire éliminer, les anticorps aspécifiques par épuisement du sérum après incubation avec une poudre de miscanthus. Cette approche a été testée dans un premier temps sur des sérums préimmuns du même lapin ayant servi à la production des anticorps primaires anti-cellulases. Une série de deux épuisements successifs n'a pas permis d'éliminer le signal aspécifique. Les observations microscopiques révèlent toujours la présence d'un marquage lumineux aspécifique au niveau des parois natives du miscanthus non traitées par les cellulases (figure 26).

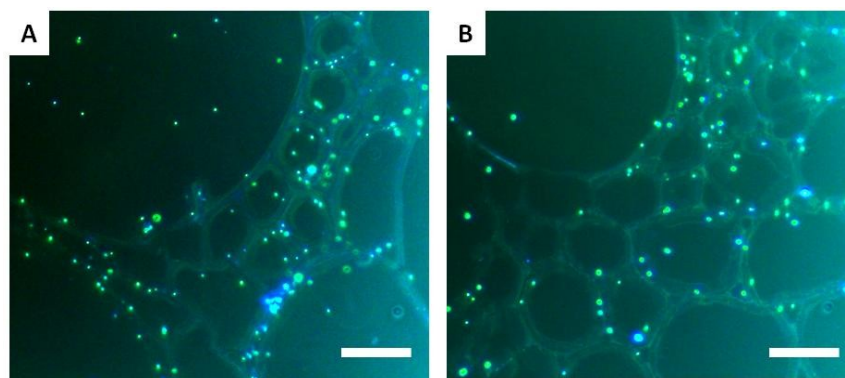


Figure 26: Essais d'immunolocalisation de CBH1 par un sérum anti-CBH1 sur des parois de miscanthus. (A : sans enzymes, B : 144h d'hydrolyse enzymatique).

4 Conclusions et perspectives

La stratégie de construction des différents outils prévue dans le programme de la thèse a permis de construire des différentes souches de *Trichoderma reesei* CL847 nécessaires à la surexpression d'enzymes inactives et de préparer les plasmides d'expression pour CBH1i et EG1i. Les essais de surexpression des deux cellulases inactives par les souches *T. reesei* CL847 $\Delta cbh1$ et $\Delta eg1$ transformées ont été confrontés à des problèmes d'expression des enzymes d'intérêt. Des hypothèses ont été proposées pour expliquer ce problème mais restent encore à valider. Il faut souligner que les souches *T. reesei* CL847 $\Delta cbh1$ et $\Delta eg1$ sont maintenant utilisées dans d'autres projets du département de Biotechnologie de l'IFP Energies nouvelles pour exprimer des enzymes recombinantes. Plusieurs voies d'amélioration peuvent être envisagées pour la production des enzymes inactives. La plus simple consisterait à mettre ces gènes sous des promoteurs permettant une induction non cellulolytique, pour disposer de souches plus stables que les souches délétées. Par manque de temps, il ne nous a pas été possible d'engager cette voie mais les plasmides construits au cours de cette thèse ont notamment permis de surexprimer EG1i dans *Yarrowia Lipolytica*.

Les essais d'immunolocalisation des cellulases dans les parois de l'entre-nœud n°2 de miscanthus préalablement traité par un cocktail enzymatique produit par *Trichoderma reesei* CL847 TR3002, ont révélé une reconnaissance aspécifique des anticorps polyclonaux dirigés contre CBH1 et EG1, et ce même après appauvrissement du sérum par incubation avec la poudre de miscanthus natif. L'utilisation d'anticorps monoclonaux plus spécifiques aux cellulases pourrait permettre de résoudre ce problème de reconnaissance aspécifique. Néanmoins le fait de ne pas observer d'amélioration après appauvrissement du sérum contenant des anticorps polyclonaux pourrait également signifier que le problème ne vient pas uniquement de la qualité des anticorps mais également de la méthodologie elle-même lorsqu'on l'applique à des complexes pariétaux hautement lignifiés. La production d'anticorps primaires plus spécifiques nécessitant une période relativement longue (> 6 mois), cette étude n'a pu être poursuivie dans le cadre de la thèse.

CHAPITRE V

Impact de prétraitements acides sur l'hydrolyse
enzymatique du miscanthus par des cocktails
enzymatiques complets ou reconstitués

CHAPITRE V : Impact de prétraitements acides sur l'hydrolyse enzymatique du miscanthus par des cocktails enzymatiques complets ou reconstitués

Résumé étendu :

L'hydrolyse enzymatique des organes aériens de *Miscanthus x giganteus* est réputée difficile en raison de l'organisation structurale de ses parois cellulaires qui limite l'accessibilité de la cellulose aux cellulases. Nous avons pu voir, dans le chapitre III que le prétraitement du miscanthus à l'acide sulfurique dilué permettait une amélioration, bien que modérée, des rendements de conversion enzymatique des fragments de miscanthus. Dans ce chapitre, nous avons appliqué deux prétraitements acides à la biomasse aérienne broyée du miscanthus afin d'en apprécier l'impact sur la conversion de la cellulose par des cocktails enzymatiques complets de *Trichoderma reesei* produits sous induction lactose (CL847 L), lactose-xylose (CL847 L/X) ou exprimant une forte activité β -glucosidase (TR3002 L).

Les parois du miscanthus sont riches en cellulose qui représente près de 47 % de matière sèche. Les hémicelluloses (environ 25 % de la matière sèche) sont essentiellement constitués par des arabinoxylyanes. Les lignines quant à elles représentent plus de 23 % du poids total. L'agencement de ces trois polymères au sein du réseau pariétal représente la principale limitation à la transformation complète de la cellulose en glucose fermentescible en éthanol. L'acide sulfurique dilué et l'explosion à la vapeur affectent essentiellement les arabinoxylyanes dont le taux est significativement réduit, passant de 25 % à moins de 3 % de la matière sèche.

Dans une première approche, nous avons évalué le potentiel du cocktail enzymatique CL847 L pour l'hydrolyse du miscanthus prétraité à l'acide sulfurique dilué ou explosé à la vapeur. Les modifications de composition chimique engendrées par ces deux prétraitements permettent d'atteindre un taux de conversion de 70 % après 144 d'hydrolyse enzymatique. Nous avons cependant constaté que ce taux est plus rapidement atteint (24 h) lors du l'hydrolyse du miscanthus explosé à la vapeur. Il semblerait donc que ce prétraitement est plus adapté au miscanthus. Son efficacité peut s'expliquer par l'effet de l'acide sulfurique sur les arabinoxylyanes pariétaux mais aussi par l'effet destructif de l'explosion à la vapeur sur les fibres de celluloses qui deviennent alors plus facilement dégradables par les cellulases fongiques.

Dans une deuxième approche, nous avons cherché à évaluer l'impact des activités hémicellulases et β -glucosidase sur l'hydrolyse enzymatique du miscanthus explosé à la vapeur tout en réduisant la quantité d'enzymes utilisées à 10 mg/g de substrat. Pour ce faire, nous avons fait appel au cocktail CL847 L/X exprimant trois fois plus d'hémicellulases que le mélange CL847 L. Nous avons également utilisé le cocktail TR3002 L qui exprime une activité β -glucosidase neuf fois supérieure à celle du cocktail CL847 L. Ces essais ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de la β -glucosidase sur les étapes initiales d'hydrolyse enzymatique permettant d'atteindre de meilleurs rendements en comparaison avec ceux obtenu lors de l'utilisation de CL847 L et CL847 L/X. Cette efficacité est expliquée par la bonne synergie entre cellulases et β -glucosidase qui permet d'éliminer plus efficacement le cellobiose généré en cours d'hydrolyse et d'optimiser la conversion de la cellulose en glucose.

Pour apprécier l'impact des hémicellulases sur la saccharification du miscanthus explosé à la vapeur, nous avons réalisé des essais d'hydrolyse enzymatique en présence d'un excès de β -glucosidase permettant de s'affranchir des limitations liées au cellobiose. Nous avons fait appel au cocktail CL847 L/X qui s'est montré plus efficace que le cocktail CL847 L grâce à son activité xylanase trois fois supérieure permettant d'atteindre un rendement de 70 % grâce une bonne synergie β -glucosidase-cellulase-xylanase.

Nous nous sommes enfin intéressés à la réduction du coût du procédé en diminuant la quantité d'enzymes utilisées lors des essais de saccharification du miscanthus prétraité par explosion à la vapeur. Pour ce faire, nous avons évalué l'efficacité de plusieurs mélanges reconstitués de cellulases purifiées en présence d'une activité β -glucosidase suffisante. Un mélange constitué de CBH1 et CBH2 permet de convertir de plus de 50 % de la cellulose pariétale témoignant du rôle primordial que jouent les exoglucanases. La supplémentation de ce mélange de base en endoglucanases EG1 et EG2 permet d'améliorer les rendements de saccharification pour atteindre un taux de 63 % après 144 h d'hydrolyse. En outre, notre étude a mis en évidence un rôle plus décisif d'EG1. L'ajout de la xylanase XYN1 au mélange CBH1, CBH2, EG1 et EG2 permet d'augmenter légèrement le rendement d'hydrolyse de la cellulose (65 %). L'ajout d'autres enzymes accessoires telles que les hémicellulases débranchantes (acétyl-xylane-estérase, feruloyle-estérase, arabinofuranosidase...) pourrait être envisagé pour améliorer ce taux de conversion.

Title: Impact of acid pretreatments and cellulolytic cocktails of *Trichoderma reesei* on the hydrolysis of miscanthus

Abstract

Producing second-generation bioethanol from the *Miscanthus x giganteus* is mainly hampered by chemical composition and structure of lignocellulosique cell walls. Dilute sulfuric acid and acidic steam explosion were successfully applied on miscanthus aerial biomass in order to overcome these limitations and reach almost 70% of glucan conversion. Enzymatic hydrolysis of this substrate, carried out using whole cellulolytic cocktails of *Trichoderma reesei*, revealed more efficient hydrolysis of steam exploded miscanthus even at low enzyme loading. Using optimized *Trichoderma reesei* cocktails revealed also critical role of β -glucosidase on early stages of enzymatic hydrolysis due to efficient removal of cellobiose. Improvement effect of xylanase has also been highlighted on conversion ability either at initial and final steps of hydrolysis by minimizing xylan inhibition effect.

Reducing enzyme loading during miscanthus saccharification is required to enhance the commercial viability of this process. We have thus examined the potential of minimal mixtures of purified enzymes on steam exploded miscanthus conversion in presence of sufficient amounts of β -glucosidase. The presence of only CBH1, CBH2, EG1, EG2 and XYN1 at 10 mg per gram of miscanthus was sufficient to achieve more than 68% glucan conversion after 144 h. This strategy can be improved by supplementing enzyme mixtures with accessory enzymes.

Introduction

Alternative energy sources such as biofuels, are gaining interest because of increasing demands for energy, and rarefaction or ecological impact of fossil fuels production [9]. The so-called first-generation biofuels are currently being marketed and derived from conventional agricultural resources (sugar beet, cereals and sugarcane for ethanol; rape, sunflower, soya and palm for biodiesel) [3]. New possibilities are being developed in order to meet the growing need for fossil fuel substitutes, these include the second-generation biofuels derived from lignocellulosic biomass such as wood, straw, farming and forestry waste or dedicated lignocellulosic crops [328]. The grass *Miscanthus x giganteus* have received great interest in Europe and in the U.S. due to its great biomass yields and low fertilization requirements even in temperate regions [20, 24]. The “conventional” process for producing bioethanol from these lignocellulosic biomass includes four main steps [10]: the pretreatment step improves the cellulose accessibility for the fungal glycosyl hydrolases used in the hydrolysis step [205]. Industrial strain of baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used to ferment the released sugars into ethanol separated and purified by a final distillation step. However, the large-scale, industrial feasibility of these second-generation biofuels production at competitive cost may be demonstrated in the short-term. Several bottlenecks are still present such as costs of pretreatment and enzyme loading [314].

Chemical and physical pretreatments, which are needed to overcome lignocellulosic recalcitrance to enzymatic hydrolysis, act mainly by unsheathing cellulose fibrils rendering them more accessible to hydrolytic enzymes [205]. Amongst pretreatments aiming at improving lignocelluloses bioconversions, dilute sulfuric acid pretreatment has been widely studied on a large panel of biomass such as reed canarygrass, switchgrass, wheat straw and corn stover. This pretreatment has been shown to result in lignin disruption, hemicelluloses removal and increase in cellulose crystallinity [334, 335, 348, 363]. A recent study has shown the same effect on organosolv pretreated miscanthus [364]. H_2SO_4 catalyzed steam pretreatment has also been widely used on grass biomass and was reported to cause lignin solubilization and redistribution in addition to hemicelluloses removal [205]. Efficiency of this pretreatment has been proved on lignocellulosic materials such as soft wood, wheat straw, bermudagrass and corn stover [248, 251, 253, 272, 365]. It has also been applied on miscanthus for bioethanol production and other applications [250]. Acid pretreatments are performed in mild severity conditions to avoid release of fermentation inhibitory products

such furfural and hydroxymethylfurfural. Under these conditions, residual hemicellulases, mainly arabinoxylans in miscanthus cell walls [28], remains associated to insoluble cellulose fraction [366] limiting its efficient hydrolysis by sheathing cellulose.

Among the microorganisms that can produce cellulolytic enzymes, *Trichoderma reesei* is one the most effective for producing sufficient industrial level of proteins for the hydrolysis step [97-99]. The potentiality of *T. reesei* has been widely studied [107], a complete set of cellulase (from CAZy family GH5, 6 7, 12, 61, 45; [367]) and hemicellulases genes (from family GH10, 11 and 74) are present in its genome. Efficient hypercellulolytic strains such as *T. reesei* CL847 has been obtained through classical mutagenesis [111, 115]. The cellulolytic set of *T. reesei* CL847 includes three families of GH working in synergy: Endoglucanases (EG; EC 3.2.1.4) randomly cleave cellulosic networks whereas cellobiohydrolases CBH1 and 2 (CBH; EC 3.2.1.91) attack cellulose chain ends to produce cellobiose that can be converted by the β -glucosidase (EC 3.2.1.21). The strain also secretes a complete set of hemicellulases including mainly endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8). Industrial cellulases production needs several inducing carbon sources: lactose is generally used for cellulases expression but xylose can be added to improve the hemicellulases content of the secretomes [98, 99, 109, 368]. These accessory enzymes cooperate synergistically with cellulases to enhance enzymatic digestibility of cellulose fraction [307, 325, 369].

Optimal enzyme mixtures vary depending on pretreatment applied to grass substrate. The chemical composition and the multi-scale structure of cell walls require specific enzymes to improve cellulose conversion. Remaining xylan even in low quantities can prevent enzymatic digestibility of cellulose [248] and recent work has also demonstrated the capacity of isolated xylans to reduce the cellulose hydrolysis yields [370]. Inhibition can then occur either at the substrate (residual xylan on cellulosic matrix) or the enzyme level (inhibited binding of xylans to active sites of cellulases). Supplementation of cellulolytic cocktails with xylanases and other hemicellulases has been showed to improve residual xylan removal thus enhancing cellulose accessibility to cellulases while reducing total enzyme loading [310, 371, 372]. Other studies revealed that the type of interaction between xylanases and cellulases depend on total enzyme loading [371, 373, 374]. Recent work has also highlighted the positive action of a new class of enzyme, employing oxidative chemistry to break glycosidic bonds and currently termed GH61 or "cellulase-enhancing factors", which greatly increases the performance of *T. reesei* secretome during lignocellulose hydrolysis [371, 375-377]. It is

well-establish that the high cost of processing is the main limiting factor of an industrial development of the second generation bioethanol and improvements in converting biomass to sugars offer much larger cost savings in comparison to improvements in converting sugars to fuels [163]. Process optimization requires the decrease of the total protein required for an efficient saccharification step. This can be done by limiting the cellobiose and the xylan inhibition and by identifying the minimal set of enzymes having the best activity on a pretreated substrate.

The main objective of this work was to evaluate the performance of classical enzymatic cocktails of *T. reesei* for the saccharification of acid pretreated miscanthus. This work aims to understand the impact of protein loading, β -glucosidase and xylanase activities on cellulose conversion kinetics while focusing on *T. reesei* secretomes. Whole aerial biomass of miscanthus was subjected to dilute sulfuric acid or steam explosion in acidic conditions in order to evaluate cellulolytic cocktails of *T. reesei* displaying variable β -glucosidase and xylanase activities. The crucial role of high level of β -glucosidase and the need of hemicellulolytic activities have been reported for an efficient saccharification of pretreated wheat straw or corn stover [378, 379]. Finally, enzyme mixtures of CBH1, CBH2, EG1, EG2 and XYN1 purified from *T. reesei* were designed in order to evaluate the potential of minimal cocktails.

Results and discussion

1 Impact of dilute sulfuric acid and steam explosion pretreatments on the chemical composition of miscanthus

Chemical analysis of the aerial biomass of late harvested miscanthus revealed that sugars account for more than 70% of the total dry matter (table I). The most abundant polymer was cellulose with approximately 47% of the dry matter followed by xylose, arabinose and galactose indicating that miscanthus hemicelluloses are essentially composed of arabinoxylans like the other grass cell walls. Lignin accounts for approximately 23%. These results are in good agreement with previously reported data for similar miscanthus substrates [28]. Xylose and arabinose contents were dramatically reduced after both pretreatments. However, dilute sulfuric acid pretreatment resulted in more effective removal of xylose and

arabinose which account for only 1.5% and 0.1% respectively (table I). Our results are in agreement with previously published data concerning miscanthus and other acid-pretreated grasses [249, 250]. The residual hemicelluloses even in low quantities (less than 3% of DM) have been reported to be involved in preventing cellulose hydrolysis [248].

Table I: Impact of mild acid pretreatments on chemical composition.

	Untreated miscanthus	Pretreated miscanthus	
		DAP150	SE
Total sugars (% of DM)	71.40	61.70	61.04
Glucose	46.90	58.90	57.80
Xylose	21.40	1.50	2.50
Arabinose	1.90	0.10	0.40
Galactose	1.20	0.10	0.34
Lignin (% of DM)	23.60	29.70	33.80

DAP150: Dilute Acid Pretreatment at 150°C; DM: Dry Matter; SE: Steam explosion

2 Analysis of *Trichoderma reesei* secretomes

Two different enzymatic cocktails from *T. reesei* CL847 were used in order to investigate the cellulose accessibility of the miscanthus samples. Analysis of the secretomes produced on lactose (CL847 L) or lactose/xylose (CL847 L/X) was performed by two-dimensional (2D) gel electrophoresis (figure 1). As confirmed by the measurement of the xylanase specific activity (table II) and previous work [109], the presence of xylose during the production of cellulases by *T. reesei* improves hemicellulases secretion (9.4% of the total protein for CL847 L/X instead of 2.9% for CL847 L). Furthermore, quantitative analysis of 2D electrophoretic gel has revealed an overexpression of the endoxylanase XYN1, the presence of hemicellulases XYN2, XYN4 and the overexpression of the β -xylosidase BXL1. Interestingly, the endoglucanase EG7, belonging to the currently investigated GH61 family, was also overexpressed under L/X inducing conditions (Figure 1).

Specific activity determination has revealed a significantly lower xylanase activity in the CL847 L secretome by comparison (12.3 IU.mg⁻¹) with the CL847 L/X (142.1 IU.mg⁻¹) one (table II). Interestingly, the presence of xylose in the inducing medium is related to lower $\square$ -

glucosidase activity as indicated by the specific activity measurements and the 2D gel electrophoresis analysis where α -glucosidase represent only 0.6% of the total protein in CL847 L/X instead of 1.7% for CL847 L. These findings are in accordance with a recent study (Jourdier et al; in prep). In order to evaluate the impact of a high level of β -glucosidase activity on miscanthus saccharification, an enzymatic cocktail produced by *T. reesei* TR3002 and overexpressing an evolved β -glucosidase [380], were also used. This secretome was produced under lactose induction and exhibited the highest FP (0.68 IU.mg⁻¹) and β -glucosidase (12.5 IU.mg⁻¹) activities (table II).

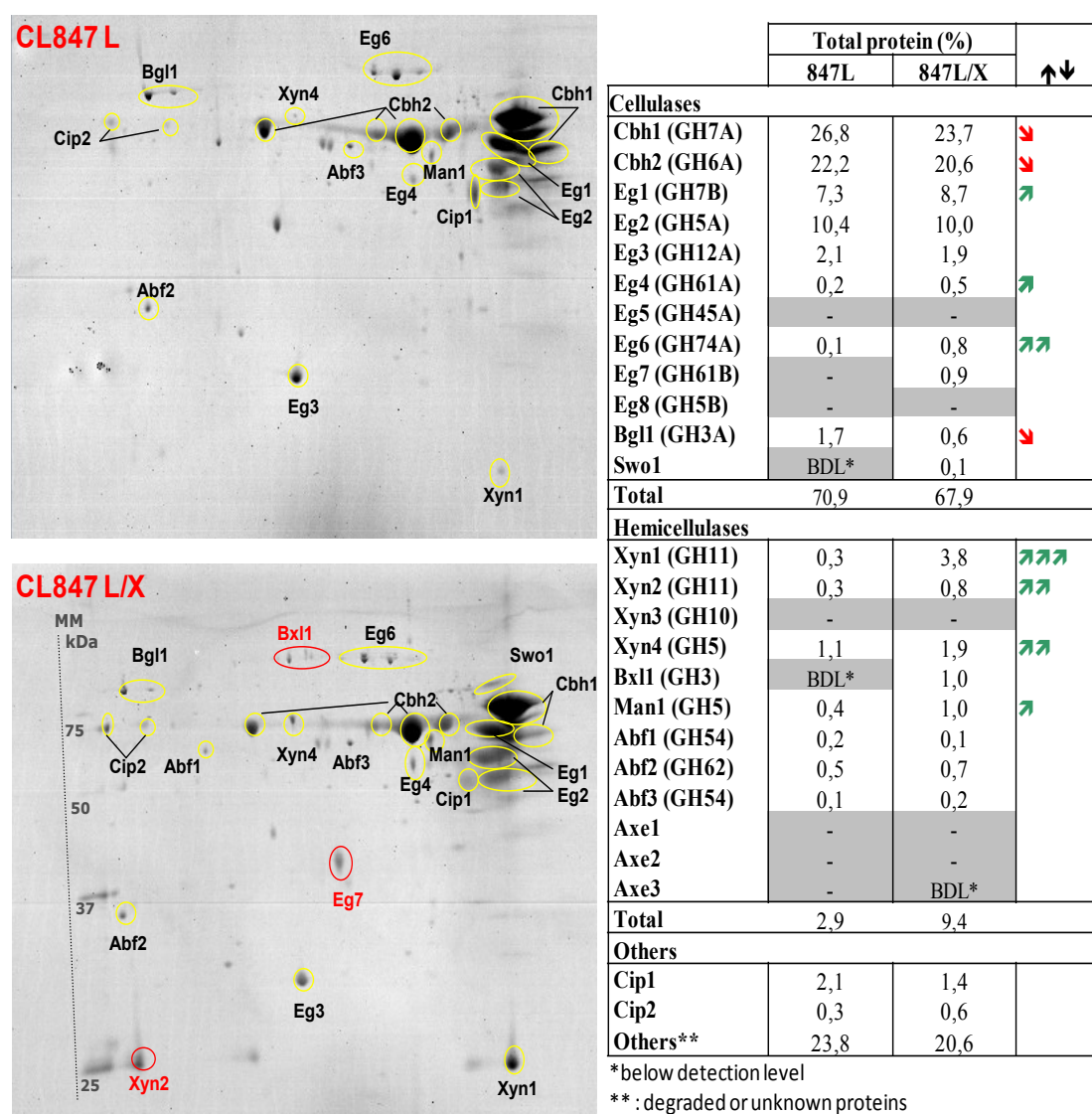


Figure 1: 2D gel electrophoresis analysis of *T. reesei* secretomes.

Red rings: enzymes present only in CL848 L/X secretome; Yellow rings: enzymes present in both secretomes.

Table II: Description of enzymatic cocktails of *Trichoderma reesei*.

<i>T. reesei</i> Strain	Inducing conditions	Proteins (g L ⁻¹)	Specific activities (IU/mg)		
			FP	β-glucosidase	Xylanase
CL847 L	Lactose	43.1	0.56	1.35	12.30
CL847 L/X	Lactose (60%) - Xylose (40%)	45.1	0.32	0.28	142.10
TR3002 L	Lactose	33.8	0.68	12.5	15,0

FP: Filter Paper; IU: International Unit

3 Impact of mild acid pretreatments on glucan conversion

Impact of DA150 and SE pretreatments on miscanthus saccharification was evaluated using the lactose-induced secretome of *T. reesei* CL847 L, supplemented by saturating amounts of an industrial preparation of β-glucosidase (Novozyme SP188; 200 CBU g⁻¹ of DM). As expected, enzymatic hydrolysis of the untreated miscanthus resulted in a very low glucan conversion yield (10%) despite using of very high concentrations of cellulases (75 mg of protein g⁻¹ of DM). At similar enzyme loading, DA150 pretreatment resulted in a clearly improved glucan conversion, as almost 70% of cellulose was hydrolyzed after 144 h. However, this maximal glucan conversion was more rapidly reached (68% after 24 h) during enzymatic hydrolysis of steam exploded miscanthus (figure 2). In both cases, complete conversion of cellulose was not achieved probably due to the presence of residual xylenes and decrease in cellulases activity caused by irreversible adsorption on celluloses and lignin (refs). Using three times lower enzyme loading (25 mg of protein g⁻¹ of DM) resulted in significantly reduced glucan conversion yields by approximately 20% after 24 h of hydrolysis for both pretreated samples while almost the same glucan conversion yield was obtained when hydrolyzing SE pretreated sample even if a longer time is needed (144 h). Our results have demonstrated that, at low protein loading, steam explosion seems more efficient than DA150 pretreatment making it more appropriate for the pretreatment of miscanthus. This result confirms the potential of steam explosion for the pretreatment of herbaceous biomass for industrial purposes [321].

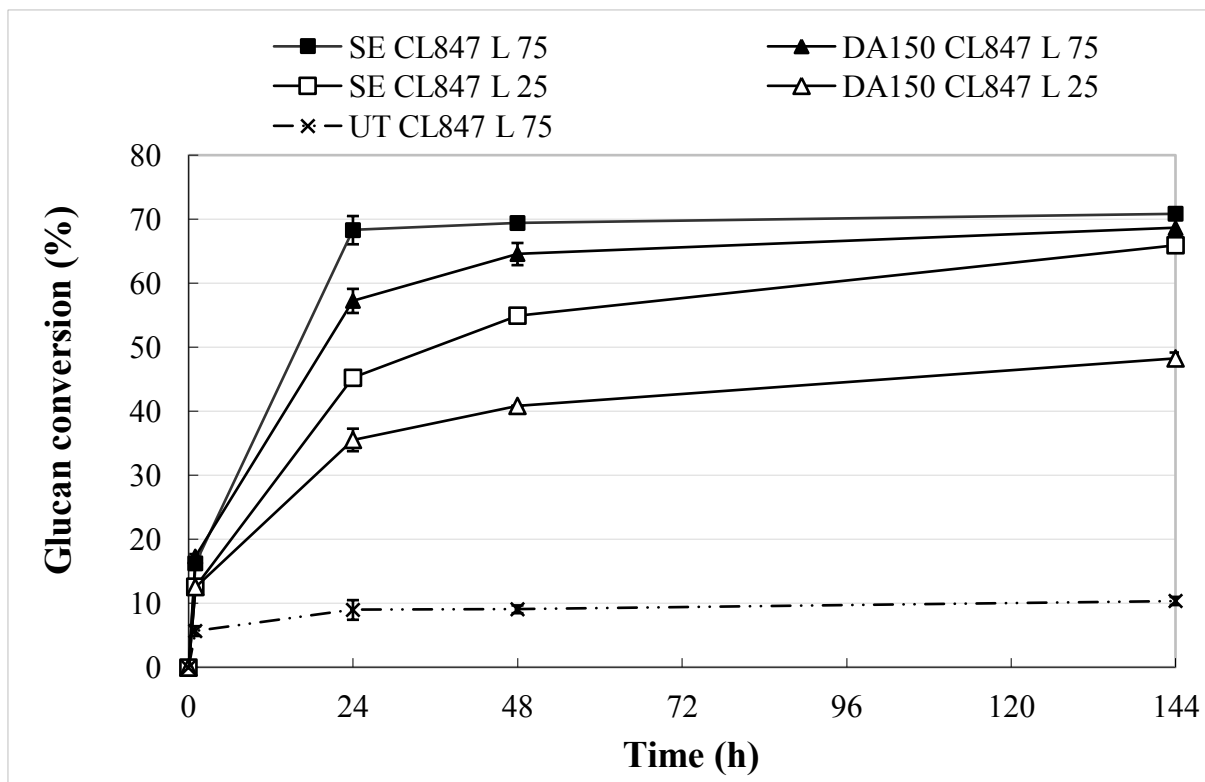


Figure 2: Glucan conversion of pretreated miscanthus samples using *T. reesei* CL847 L secretome.

Enzyme loadings were 25 and 75 g⁻¹ dry matter of SE (steam exploded) and DA150 (diluted acid pretreated) and UT (1 mm untreated) miscanthus in CL847 L 25 and CL847 L 75 assays respectively.

4 Saccharification improvement: critical role of β -glucosidase

The evaluation of the impact of variable β -glucosidase levels in *T. reesei* secretomes was performed using the steam exploded (SE) miscanthus substrate which appears to be more degradable than DA150 one as indicated by our study (figure 2). As described earlier, *T. reesei* cellulolytic cocktails CL847 L, CL847 L/X and TR3002 L displayed strongly different β -glucosidase activities due to the inducing conditions (Lactose or Lactose/Xylose). Saccharification assays were performed with 10 mg of proteins per gram of miscanthus which corresponds to a cellulase loading of 5.6 (CL847 L), 3.2 (CL847 L/X) and 6.8 (TR3002 L) FPU g⁻¹ of DM. These cellulase dosages are close to those usually used in laboratory studies allowing to obtain hydrolysis profile with high levels of glucose in reasonable times (less than 144 h) [11].

Our results show a high accumulation of cellobiose from the beginning of the enzymatic hydrolysis to reach a maximum at 24 h when using CL847 L and CL847 L/X cellulolytic cocktails. The highest amounts of cellobiose are generated after 24 h of hydrolysis with CL847 L/X cellulases (5.53 g of cellobiose L⁻¹) due to its weaker β -glucosidase activity in comparison with CL847 L cocktail (2.62 g of cellobiose L⁻¹) as indicated in table II. These amounts are much lower when using TR3002 L cocktail reaching a maximum of 0.49 g of cellobiose L⁻¹ at 5 h of hydrolysis (Figure 3). TR3003 L cellulolytic cocktail seems to be the more efficient in cellobiose conversion due to its very high β -glucosidase activity (12.5 IU mg⁻¹).

When using the CL847 L secretome, cellulose conversion yield reached 26.8% (8.85 g of glucose L⁻¹) after 24 h of hydrolysis but increased rapidly to 54.3% after 144 h. The use of the cellulolytic cocktail CL847 L/X at the same concentration displayed the same kinetic (figure 3) but resulted in a lower cellulose conversion yields (16.5% after 24 h then 44.7% after 144 h) (table III). Higher efficiency of CL847 L enzymatic cocktails may be explained by β -glucosidase/cellulase activities ratio (2.41) in comparison with CL847 L/X one (0.87). These results suggest that β -glucosidase activity is more critical than xylanase one. Indeed, high xylanase activity of CL847 L/X enzymatic cocktail did not allow optimal conversion yields (table III).

Enzymatic hydrolysis of this substrate using the cellulolytic cocktail TR3002 L at 10 mg of protein/g of DM resulted in high conversion yields of cellulose by reaching rapidly 43% (14.4 g of glucose L⁻¹) after only 24 h of hydrolysis and 57% at the end of reaction (144 h) due to complete hydrolysis of cellobiose due to high β -glucosidase/FP specific activity ratio (18.46). This finding highlights the importance of a synergistic action of cellulases and β -glucosidase during miscanthus hydrolysis. As detailed in table III, the enzymatic cocktails need to contain a good β -glucosidase/FP specific activity ratio in order to maximize the glucose conversion of SE pretreated miscanthus. We were also able to demonstrate that the removal of cellobiose may play a critical role during early stages of enzymatic hydrolysis of miscanthus, as supplementation of *T. cocktail* CL847 L by industrial preparation of β -glucosidase and using TR3002 L cocktail resulted in a maximum glucan conversion only after 24 h of hydrolysis.

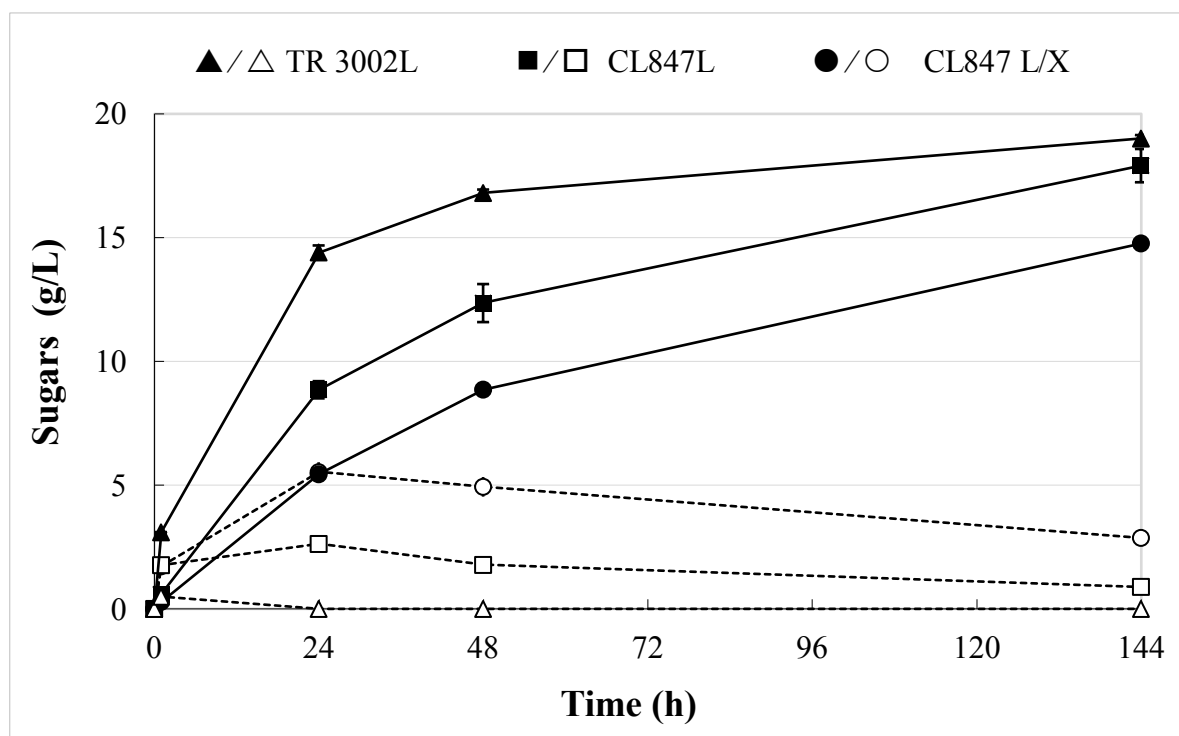


Figure 3: Level of cellobiose (dashed lines) and glucose (continuous lines) produced during hydrolysis of steam exploded miscanthus.

Enzymatic cocktails CL847 L, CL847 L/X and TR3002 L were used at 10 mg of proteins / g of DM.

Table III: Impact of β -glucosidase/FP ratio on cellulose conversion

	β -glucosidase/FP	Cellulose conversion (%)		
		24h	48h	144h
TR3002 L	18.46	43.6 $\pm$ 0.1	50.9 $\pm$ 1.0	57.6 $\pm$ 0.5
CL847 L	2.41	26.8 $\pm$ 1.3	37.4 $\pm$ 1.5	54.3 $\pm$ 3.4
CL847 L/X	0.88	16.5 $\pm$ 1.1	26.9 $\pm$ 1.9	44.7 $\pm$ 1.9

5 Impact of hemicellulases improved secretomes

In order to assess the influence of xylanases overexpression in cellulolytic cocktails of *T. reesei* on enzymatic conversion of steam exploded miscanthus, the hydrolysis experiments were carried out by using classical enzyme mixture CL847 L and xylanases enriched cocktail CL847 L/X (at 10 mg of protein/g of DM) with and without β -glucosidase supplementation (SP 188, 200 CBU/g of DM).

Given the importance of β -glucosidase activity on glucan conversion at initial stages, saturating amounts of SP188 β -glucosidase were added to avoid cellobiose accumulation. CL847 L/X and CL847 L hydrolysis rates were therefore increased by approximately 35% and 18% respectively after 24 h of hydrolysis. Overall increase in cellulose hydrolysis at the end of reaction was about 25% when using enriched xylanases enzymes mixture to reach almost 70% glucan conversion. These finding suggest more efficient synergism between cellulases and β -glucosidase in presence of xylanases and other accessory enzymes confirming a recent study on steam exploded maize [325].

These observations suggest restricted access of enzymes to the cellulosic matrix probably due to the presence of residual xylan chains, even in small quantities,[49, 381]. Several studies reported a strong relationship between the presence of a xylanases, disrupting xylan linkages to glucan, and improvement of cellulose hydrolysis [193], but other accessory enzymes present in this cocktail, such as β -xylosidase (BXL1) and endoglucanase EG7 belonging to GH61 family, may also play a role in increasing hydrolysis rates. Fungal-derived, copper-dependent polysaccharide monooxygenases (PMOs), formerly known as GH61 proteins, have recently been shown to catalyze the O(2)-dependent oxidative cleavage of recalcitrant polysaccharides. GH61 action renders the substrate far more prone to attack by endoglucanases and cellobiohydrolases and thus provides a major breakthrough in enzymatic biomass conversion [375, 382].

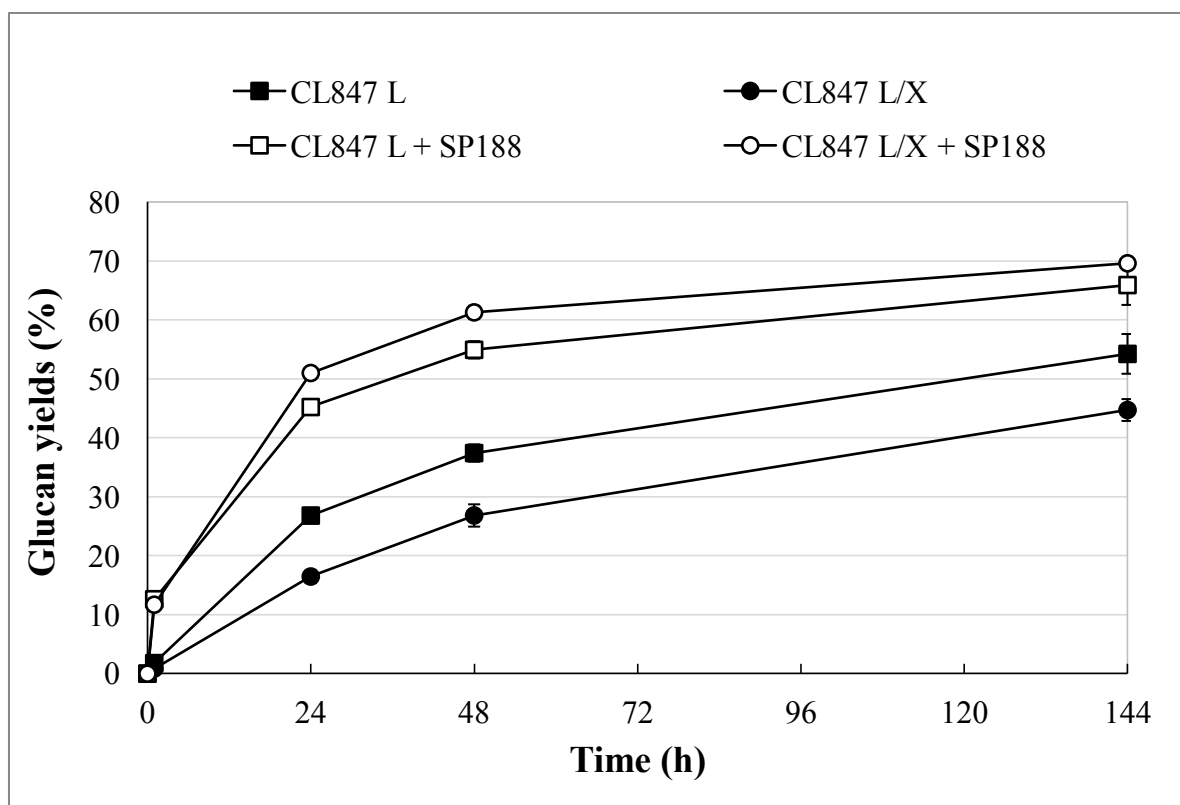


Figure 4: Differential effect of β -glucosidase and xylanases on glucan conversion of steam exploded miscanthus by cellulolytic cocktail (10 mg of enzymes/g of DM).

6 Miscanthus hydrolysis with minimal enzyme mixtures

In order to better understand the specific roles of cellulolytic enzymes of *T. reesei* in saccharification of the steam exploded miscanthus, we have performed saccharification assays using different reconstituted cellulase mixtures containing the four major cellulases (CBH1, CBH2, EG1, EG2) and the endoxylanase XYN1 which were purified from *Trichoderma reesei* enzyme cocktail and described earlier [272, 324]. The relative proportions of these mixtures are in accordance with previously described enzymatic cocktails of *Trichoderma reesei* (figure 1). Cellobiohydrolases CBH1 and CBH2 accounted for more than 50% of total protein content in enzymatic cocktail of *Trichoderma reesei*. Interestingly, xylose addition to *Trichoderma* culture media ended in an increase of the hemicellulases levels, almost 10% instead of 3% in the case of a lactose induction, but CBH1/CBH2 and also CBHs/EGs ratios are almost still constant. Industrial preparation of β -glucosidase SP188 (200 CBU/g of DM) was added in these assays to prevent any product inhibition from cellobiose. All

saccharification assays were performed with a maximum of 10 mg of proteins per gram of steam exploded miscanthus.

Our data revealed that the synergistic action of CBH1 and CBH2, in the presence of a high level of β -glucosidase activity, was sufficient to achieve approximately 52% of glucan conversion yield (figure 5). Addition of endoglucanases EG1 and EG2 improved significantly the saccharification rates. EG1 had a greater impact by reaching 63.3% of conversion while EG2 addition resulted in 56.1% of cellulose hydrolysis (figure 5). As described previously [324], EG1 had a weak activity on xylan and a higher specific activity on Avicel than EG2. The CBH1, CBH2, EG1, EG2 mixture would be optimal for enzymatic conversion of steam exploded miscanthus substrate (65.6% glucan conversion) in agreement with previously reported data on the development of efficient minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on barley straw [383]. Supplementation of this mixture with *Trichoderma reesei* xylanase XYN1 affected the early stage of hydrolysis as the residual xylan conversion was performed until 24 h of hydrolysis [384]. By comparison with the cellulolytic mixture, saccharification yield with the addition of XYN1 was increased by 6.5% after 24 h of hydrolysis and leveled off thereafter to progressively reach 68.3% at the end of reaction. Both XYN1 and EG1 prevented substantial inhibition of cellulases by residual xylan and xylo-oligomers. Our results confirm that xylanase supplementation to cellulases mixture is important to remove residual xylan and xylo-oligomers [307, 323, 378], which is in accordance with our previous results demonstrating the necessity of a sufficient level of XYN1 to maximize the glucan conversion of steam exploded wheat straw [324].

In light of these results, it appears that an optimal enzyme mixture does not necessarily contain all enzymes of *Trichoderma reesei* secretome but only those having maximal effect on cellulose conversion. The optimal enzyme mixture for efficient degradation of steam pretreated miscanthus is composed of CBH1, CBH2, EG1, EG2, XYN1 and SP188 β -glucosidase. This rational utilization of enzymes may substantially reduce the process cost.

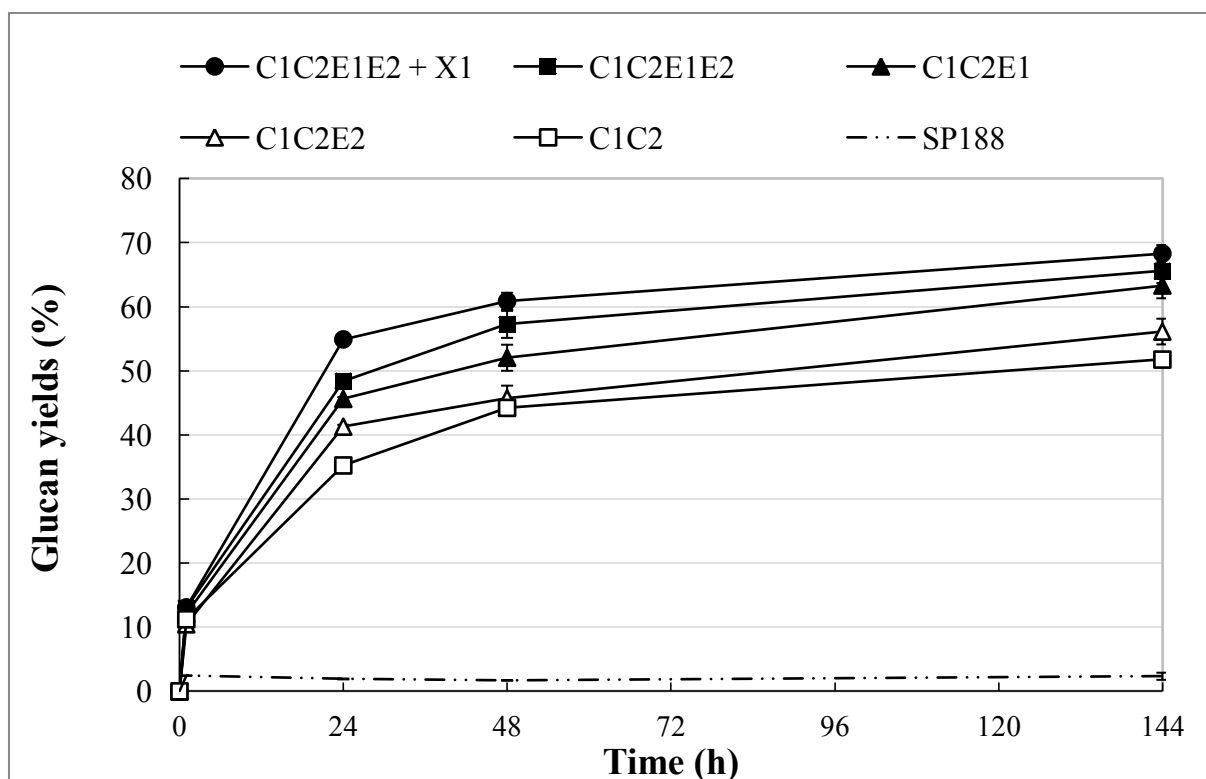


Figure 5: Enzymatic saccharification of steam exploded miscanthus by reconstituted enzyme mixture.

(C1: CBH1; C2: CBH2; E1: EG1; E2: EG2; X1: XYN1; SP188: β -glucosidase).

Conclusions

We have in this study evaluated the impact of dilute acid pretreatment and acid steam explosion on improving enzymatic hydrolysis of miscanthus with *T. reesei* cellulolytic cocktails for bioethanol production. Our results have revealed that these two pretreatments were able to increase significantly saccharification yields probably by enhancing cellulose accessibility after efficient elimination of arabinoxylans. Comparing two different cellulases concentrations highlighted the potential of acid steam explosion in reducing protein loading in comparison with the dilute acid pretreatment. Furthermore, the investigation of the impact of cellulolytic and hemicellulolytic activities in our enzymatic cocktails have clearly showed a critical role of a sufficient β -glucosidase on initial steps of cellulose hydrolysis. As described earlier for other gramineous biomass, a high level of β -glucosidase is needed in order to limit cellobiose inhibitory effect. Then, when the cellobiose limitation is minimized, saccharification rate may still be improved by an optimization of FP/xylanase ratio in the *T.*

reesei secretome. This was confirmed using reconstituted cocktails in which xylanase addition to a minimal cellulolytic cocktail was able to slightly improve either initial kinetic or final glucan yield.

We have also showed that using minimal a cellulase mixture composed of CBH1, CBH2, EG1, EG2 and XYN1 was able to convert almost 70% of the total cellulose of steam exploded miscanthus. Optimization of this conversion yield can achieved by supplementing cellulolytic cocktails or reconstituted mixtures with other accessory enzymes such as hemicellulolytic debranching enzymes (mannanases, acetyl-xylan-esterase, feruloyl-esterase or arabinofuranosidases).

Material and methods

1 Enzymatic production

Cellulolytic cocktails were obtained from the *Trichoderma reesei* strains CL847 [345]. Enzymatic productions were performed in 2.5 L working volume fermenters using two steps: i) growth on lactose, ii) fed-batch on lactose (L/L) or xylose (L/X) as unique carbon source as previously described [109]. We have finally removed mycelia from culture media par centrifugation at 20,000 g. Enzymes were then collected and used for β -glucosidase and cellulase purification.

Commercial β -glucosidase preparation SP188 (Novozymes) used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Glucose was obtained from Prolabo. All buffer components and salts used were reagent grade and obtained from Sigma Aldrich or GE Healthcare (GE Healthcare, Saclay, France) for enzyme purification part.

2 Enzymes purification

AKTA FPLC system from GE Healthcare was used for the following purification experiments.

SP188 commercial preparation was desalted for the biochemical characterization of the β -glucosidase, in order to remove the ingredients present in the industrial formulation. For this purification step, a Hi-trap desalting column (GE healthcare) previously equilibrated with 25 mM Imidazole pH 5 was used. CBH1, CBH2, EG1, EG2 and Xylanase1 were purified from

the culture filtrate using a two steps fast protein liquid chromatography (FPLC) method. The protocol used is based on Markov et al [385] with the following modifications: for the preliminary purification, the samples were salted out using an hi-trap desalting column (Biorad, Marnes-la-coquette, France) equilibrated with 25mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5. Chromatofocusing was performed on an AKTA[®] (GE Healthcare) on a Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare) equilibrated with the initial buffer. Proteins bound (20 mg) under the initial conditions were eluted by a pH gradient (from 7.4 to 3.9) using PB74 Polybuffer (GE Healthcare) at a constant flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Qualitative analysis of the samples was performed using 1D gel electrophoresis according to Laemmli [386] and protein concentration was measured according to Lowry method [356] using BSA as protein standard. Highly pure fractions of CBHs and EGs were also analyzed by 2D gel electrophoresis as described by Herpoël-Gimbert *et al.* [109].

3 Enzymatic activities

3.1 Cellulase activity Assay

The standard filter paper activity assays was performed according to Ghose et al, (1987) [387] whereas the β -glucosidase activity was determined by measuring the amount of glucose and *p*-nitrophenol released respectively from cellobiose and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) as substrates. Native substrate assays (duplicate) consisted of incubating the substrate at concentrations from 0.5 to 16.4 mM in 50 mM citrate buffer, pH 4.8 and enzyme solution (in a range from 2.5 to 10 mg L⁻¹) at 50°C with a time interval of 5 min and a total period of 20 min. The final volume of the assays was 100 μ L and they were carried out in 1.5 mL Eppendorf tubes. The reaction was stopped by heating at 95°C for 5min and cooled at 4°C. pNPG triplicate assays were done using the same protocol as above but using a substrate range from 0.15 to 5 mM and enzyme concentration from 1.25 to 5 mg L⁻¹. Reactions were prepared in 96 wells PCR plate and incubations were performed in a PCR i-cycler (Bio-Rad). Enzymatic activity was stopped by adding 100 μ L of a 2% Na₂CO₃ solution.

3.2 Xylanase activity

Xylanase activity was determined by monitoring the release of reducing sugars using the colorimetric method Kidby and Davidson (1973) [388]. The substrates used were either birchwood xylan for xylanolytic activity assays or medium viscosity carboxymethyl cellulose (CMC) for cellulolytic activity assays (Sigma-Aldrich). Each substrate was used at a

concentration of 5 mg mL⁻¹ in 50 mM sodium acetate, pH 5.8. Measurements were performed by incubating the substrate with xylanase for 10 min at 60°C in a final volume of 1 ml. At 2 min intervals, 150 µL was removed and mixed with 1.5 mL of Kidby solution (1% Na₂CO₃ and 0.03% potassium hexacyanoferrate [III]). Coloration was developed by heating it in a water bath (100°C) for 10 min, and spectral absorbance was measured at 420 nm. The amount of released sugar was determined using a xylose calibration curve (0–400 µg mL⁻¹). Activity was expressed in terms of international units (IU), which are defined as the quantity of enzyme needed to release 1 µmol of equivalent xylose per minute. Kinetic parameters were derived from triplicate datasets obtained using a range of different substrate concentrations (0.5–10 g L⁻¹). Experiments were performed over a suitable time period that ensured that less than 10% of substrate was consumed. To minimize experimental variability, several precautions were taken. In addition to performing regular control assays using wild-type enzyme, the same batch of birchwood xylan was used for all experiments and rate measurements for all enzyme variants were carried out using an identical procedure with generally five data points being collected at identical time intervals. Datasets were analyzed using the Enzyme Kinetics.

4 Analytical methods

4.1 Carbohydrate analysis

Glucose concentration was determined using HPLC system (ISC300; Dionex) equipped with an amperometric detector. Data acquisition from the detector and determination of retention times and peak areas were performed using Chromeleon software (Dionex). A CarboPac PA1 column (250 mm * 4 mm I.D.) with polystyrene-divinylbenzenepellicular resin (particle size 10 µm) and 2000 psi pressure limit was used. Purified water (18 MΩ) obtained with a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q Plus water purification system was used to prepare all solutions. Eluent 1 was 200 mM NaOH (Fischer scientific) and eluent 2 was water (flow-rate: 1.0 mL min⁻¹). The detector operated in the amperometric mode using a gold working electrode and an Ag/AgCl pH-reference electrode. Glucose, xylose and cellobiose solutions at 10mg.L⁻¹ were used as external standard.

p-Nitrophenol was quantified by spectrophotometry at 405 nm using Multiskan Ascent scanner using 96 wells plates. A range of *p*-nitrophenol solution from 0 to 0.3 mM was used for calibration.

4.2 Lignin

Before lignin analyses, all ground samples were subjected to an exhaustive solvent extraction in a Soxhlet apparatus by toluene/EtOH (1:1, v:v), EtOH and then H₂O and then dried at 40 °C to get the corresponding extractive-free dried samples. The extractive content was measured as the weight loss following this extraction step. The lignin content was determined on the extractive-free samples using the standard Klason method [389].

5 Plant material

Miscanthus stems were isolated from the stover of miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) planted in April 2006 at INRA Estrées-Mons (France) and harvested in winter (late harvest). The whole aerial biomass was milled (1 mm, Barbender) and used hereafter as a control sample.

6 Pretreatments

6.1 Dilute sulfuric acid at 150°C

Miscanthus was treated with 10% sulfuric acid at a ratio of (Miscanthus/sulfuric acid ratio =10 g g⁻¹). The samples were kept at 150°C for 40 minutes. The acid-pretreated fragments were filtered then washed to remove sulfuric acid and residual sugars.

6.2 Steam explosion

Miscanthus was chopped and soaked overnight in a solution of 0.04 M H₂SO₄ for 16 hours. After draining and pressing, the steam explosion was performed in a discontinuous autohydrolysis reactor (RADIS, Souston, France) at 20 bars and 210°C and 150 seconds residence time. SE pretreated miscanthus was then recovered after a separation by pressing the recovered solid/liquid mixture.

ANNEXE

Analyse spectroscopique FT-IR

Annexe : Analyse spectroscopique FT-IR

Nous avons procédé à une étude des résidus de miscanthus étudiés dans le chapitre V par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) afin 1) d'apprécier l'impact du prétraitement à l'acide sulfurique dilué et l'explosion à la vapeur sur leur composition chimique et 2) d'identifier au niveau des résidus d'hydrolyse enzymatique les différences de performances des cocktails cellulolytiques des souches *Trichoderma reesei* CL847 L et CL847 L/X ou par des cocktails reconstitués. Les résidus végétaux absorbent les rayonnements infrarouges qui provoquent des excitations vibrationnelles et rotationnelles caractéristiques de liaisons chimiques présentes au sein du complexe lignocellulosique.

Nous avons utilisé un spectromètre FT-IR (Thermo Scientific Nicolet) pour enregistrer des spectres dans le moyen infrarouge (MIR) de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} . Ces mesures ont été effectuées sur de la poudre de miscanthus (dilué dans du KBr) en réflexion diffuse (DRIFT, Diffuse Reflectance Infra-red Fourier Transform). Nous avons concentré notre analyse sur la région $1900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ comportant les bandes d'absorption des polymères pariétaux : cellulose, hémicelluloses et lignines.

Les spectres enregistrés sont traités par le logiciel The Unscrambler® X (Camo software) pour éliminer l'effet du bruit de fond et les déformations de spectres dues à aux conditions expérimentales. Les différences qui existent entre les échantillons de miscanthus analysés (quantité, surface...) peuvent conduire à une déviation de la lumière de son trajet se traduisant par une dérive des spectres notamment pour les grands nombres d'onde. Cette dérive est éliminée (ou atténuée) par correction de la ligne de base en combinant les fonctions « baseline offset » et « linear baseline correction » proposées par ce logiciel. Cette étape est suivie de la normalisation des intensités, ce qui permet de comparer les spectres. Nous nous sommes basés sur l'analyse spectrale de lignocelluloses, polymères et oligomères pariétaux de référence pour l'attribution des bandes détectées au niveau de chaque spectre (tableau X) [390-392]. Il faut toutefois noter que les attributions résumées dans ce tableau X sont discutées et varient en fonction du substrat.

Tableau X: Attribution des spectres infrarouge.

N° pic	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Fonction chimique
1	1735	Hémicellulose, fonction C=O
2	1650	Eau d'hydratation
3	1602	Lignine, fonction C=C conjuguée avec le noyau aromatique
4	1512	Lignine, benzène tri-substitué 1,2,4
5	1460	Hémicellulose, déformation C-H symétrique dans CH ₂
6	1430	Cellulose, CH ₂ ; Lignine, vibration du squelette aromatique
7	1375	Cellulose, déformation C-H symétrique
8	1320	Cellulose, chaîne aliphatique
9	1265	Lignine, unités G
10	1238	Lignines
11	1205	Fonction C-H des alcanes
12	1160	Lignine, CH aromatique, unités G
13	1100	Alcool primaire
14	1060	Alcool primaire
15	1033	Lignine, unités G (C-H, C-OH)
16	896	Lignine, aromatique C-H
17	833	Lignine, benzène tri-substitué 1,2,4

1 Impact des prétraitements sur les parois de miscanthus

L'aspect général des spectres enregistrés à partir du miscanthus non prétraité, exposé à la vapeur ou prétraité à l'acide sulfurique dilué demeure semblable mais des modifications au niveau de certaines bandes sont perceptibles.

La comparaison des spectres fait ressortir une différence au niveau de la bande 1735 cm⁻¹, correspondant à une fonction carbonyle présente généralement dans des hémicelluloses tels que les xylanes. Comparativement aux autres bandes spectrales, l'intensité à 1735 cm⁻¹ diminue au niveau des spectres d'échantillons prétraités indiquant la dégradation d'une fraction importante des xylanes pariétaux conformément aux résultats d'analyses compositionnelle des parois (Tableau I, chapitre V). D'autres modifications sont perceptibles au niveau de la bande 1320 cm⁻¹, correspondant à de la cellulose, où l'on constate l'apparition d'une deuxième bande témoignant d'une probable modification de la cristallinité de ce polymère. L'apparition des deux bandes (1265 et 1238 cm⁻¹), correspondant aux lignines de

type G suggèrent un enrichissement des lignines de type G après traitement. Ceci est confirmé par les modifications observées au niveau des bandes 1033 et 833 cm^{-1} . Nous notons également que cette méthode ne nous permet pas de distinguer l'effet du prétraitement par explosion à la vapeur de celui de la cuisson à l'acide sulfurique à 150°C. Néanmoins les effets apparaissent plus marqués après explosion à la vapeur en milieu acide.

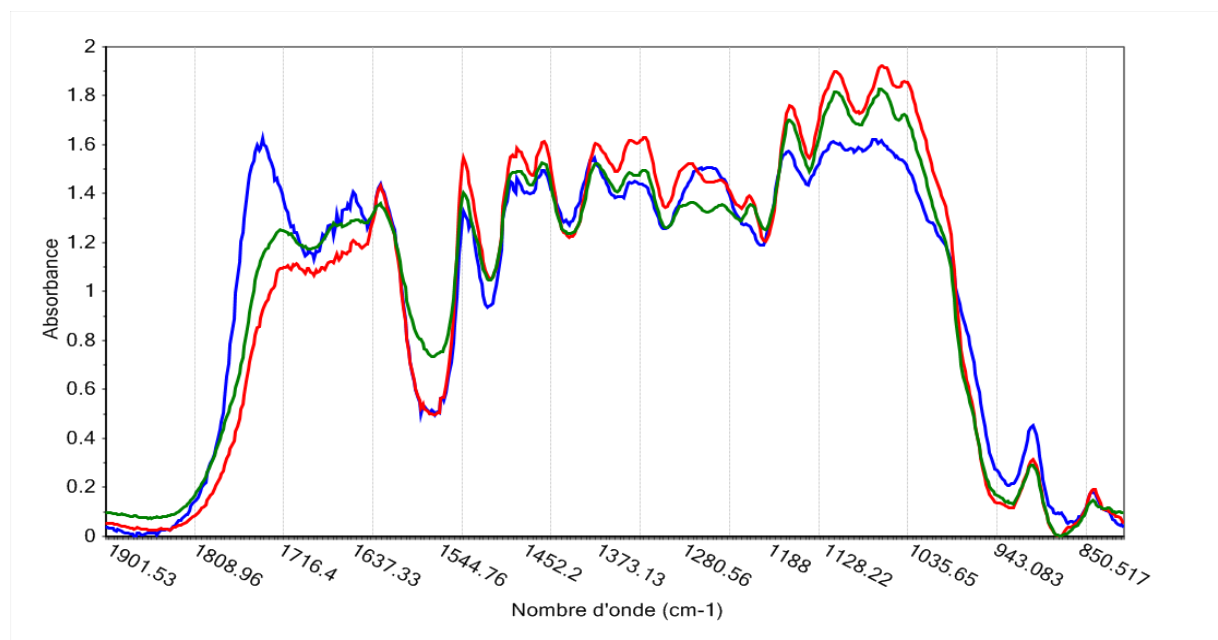


Figure 27: Impact des prétraitements sur les spectres infrarouges des parois de miscanthus. Natif (bleu), explosé à la vapeur (rouge), prétraité à l'acide sulfurique à 150°C (vert).

2 Impact des l'hydrolyse enzymatiques sur les spectres infrarouges

La comparaison des spectres après hydrolyse enzymatique du miscanthus natif (figure 28) révèle une diminution relative de l'absorption dans la région 1200-1000 cm^{-1} correspondant essentiellement à des polysaccharides malgré le faible rendement d'hydrolyse enzymatique décrit dans le chapitre V en utilisant des cocktails qui n'ont pas été supplémentés en β -glucosidase mais testés avec ou sans xylanase additionnelle.

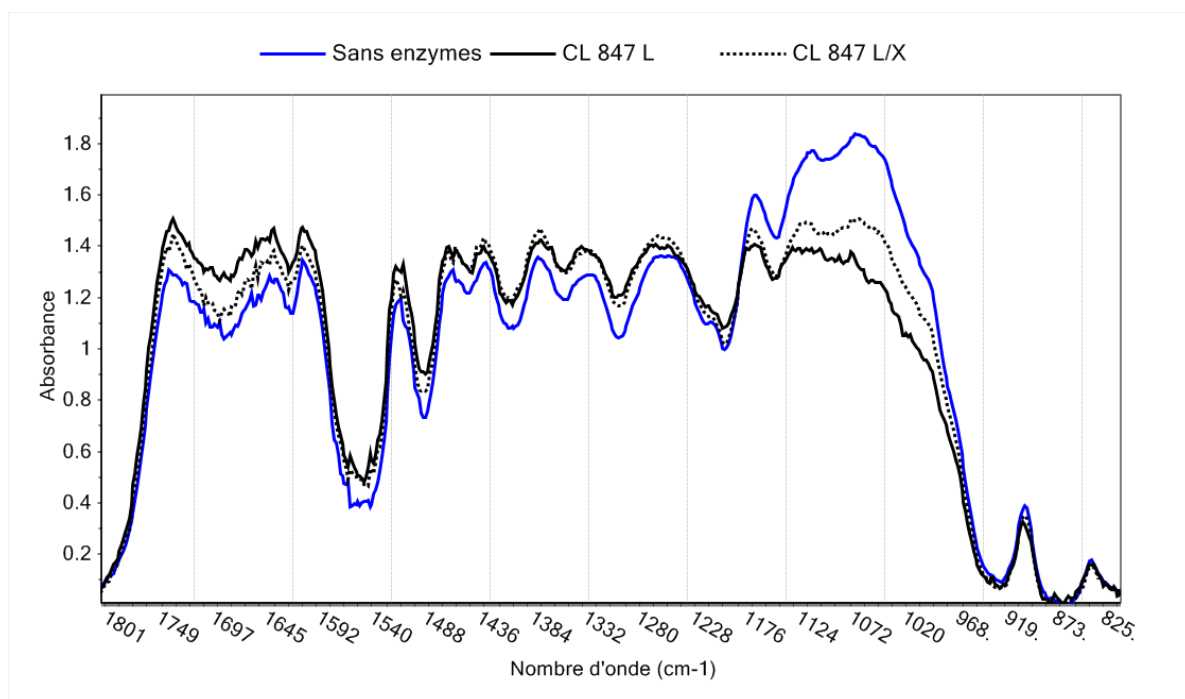


Figure 28: Spectres infrarouge de miscanthus natif après hydrolyse enzymatique.

L'hydrolyse enzymatique du miscanthus prétraité par explosion à la vapeur se traduit par une modification des spectres infrarouges au niveau des bandes 1600, 1510 et la région vers 1250 cm^{-1} suggérant un enrichissement relatif des résidus en lignine après hydrolyse des sucres pariétaux. L'aspect général des spectres ne varie que très légèrement après hydrolyse enzymatique avec les cocktails CL847 L et CL847 L/X (figure 29-A). Les mêmes observations ont été faites après hydrolyse enzymatique du miscanthus prétraité par cuisson acide à 150°C par les cocktails CL847 L et CL847 L/X (figure 29-B). La comparaison des spectres au niveau de la zone 1200 à 1000 cm^{-1} , correspondant aux polysaccharides, révèle une plus importante diminution lors de l'hydrolyse du miscanthus prétraité à l'acide dilué avec le cocktail CL847 L (figure 29-B). Nous avons en effet montré au cours de cette thèse que le cocktail CL847 L donnait de meilleurs rendements de saccharification que le CL847 L/X (Tableau III-chapitre V).

Nous avons ensuite analysé les spectres du miscanthus explosé à la vapeur après traitement avec des cocktails enzymatiques reconstitués CBH1 + CBH2 (C1C2) et CBH1 + CBH2 + XYN1 (C1C2X1) en présence d'un excès de β -glucosidase SP188. Là aussi nous constatons une diminution relative de l'intensité dans la région « polysaccharides ». Cette méthode ne nous permet pas de distinguer les deux cocktails reconstitués et leur effet apparaît très

similaire à celui observé lors de l'hydrolyse des parois avec des cocktails cellulolytiques complets (figure 30). Néanmoins, contrairement aux résidus obtenus après hydrolyse par les cocktails CL847 non supplémenté en β -glucosidase, l'intensité des bandes à 1430 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} et 1320 cm^{-1} ne diminue pas.

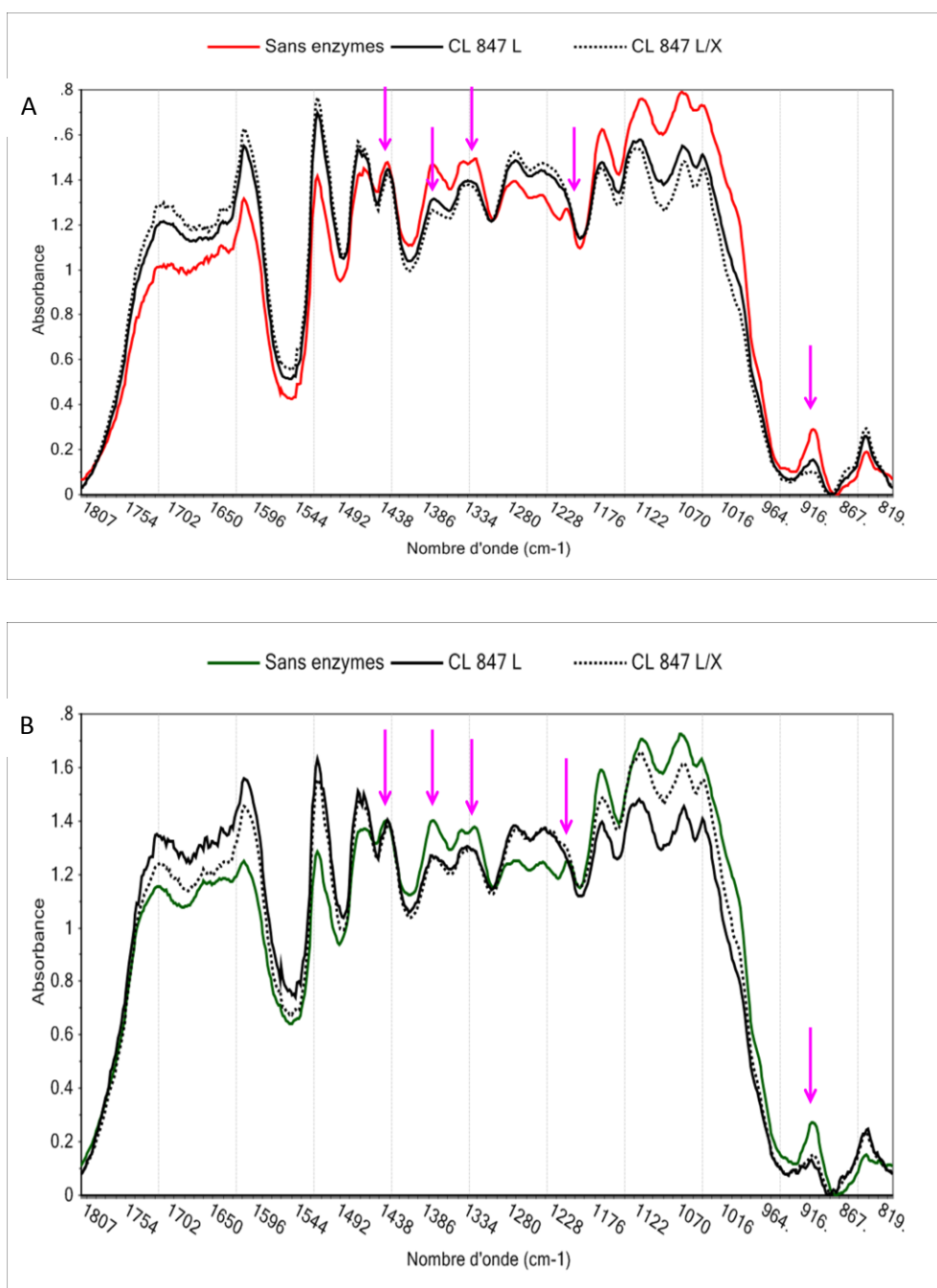


Figure 29: Spectres infrarouge de miscanthus (A) exposé à la vapeur et (B) dilué à l'acide après hydrolyse enzymatique.

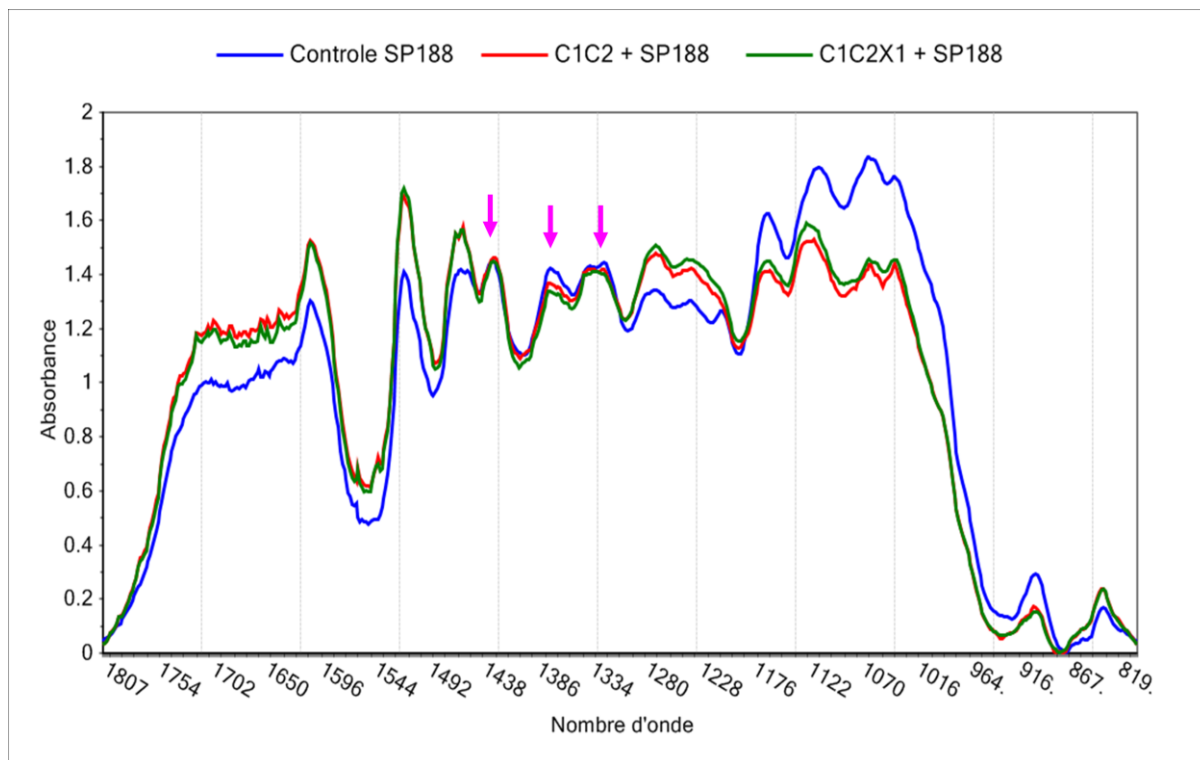


Figure 30: Spectres infrarouges de miscanthus exposé à la vapeur par des cocktails enzymatiques reconstitués.

3 Analyse en composantes principales

L'observation globale des spectres infrarouges ne permet pas de distinguer les résidus en fonction de la nature du prétraitement ou du cocktail enzymatique utilisé. Un traitement statistique peut réduire la variabilité intrinsèque des échantillons pour ne laisser apparaître que les informations pertinentes. L'analyse en composantes principales (ACP) est l'une des plus utilisées pour remplacer les variables d'origine (tel que l'absorbance) par une des variables synthétiques appelées composantes principales qui consistent en une combinaison linéaire des variables de départ. Nous avons tenté de réaliser ce type d'analyses pour comparer les caractéristiques spectrales de 15 échantillons de miscanthus (tableau XI); la zone de 1900 à 800 cm^{-1} a été retenue.

Tableau XI: Liste des échantillons analysé en ACP.

Echantillons	Nature du substrat	Traitement enzymatique
1	Natif	Sans
2	Natif	CL847 L
3	Natif	CL847 L/X
4	Exposé à la vapeur	Sans
5	Exposé à la vapeur	Sans
6	Exposé à la vapeur	CL847 L
7	Exposé à la vapeur	CL847 L
8	Exposé à la vapeur	CL847 L/X
9	Exposé à la vapeur	CL847 L/X
10	Cuisson acide 150°C	Sans
11	Cuisson acide 150°C	Sans
12	Cuisson acide 150°C	CL847 L
13	Cuisson acide 150°C	CL847 L
14	Cuisson acide 150°C	CL847 L/X
15	Cuisson acide 150°C	CL847 L/X

L'analyse de l'ensemble des spectres obtenus sur résidus prétraités et hydrolysés par les enzymes montre une dispersion des échantillons pour former trois groupes distincts : groupe n°1 « miscanthus prétraités ou non, sans enzymes », groupes n°2 « Miscanthus natif avec enzymes » et groupe n°3 «miscanthus prétraité avec enzymes» (figure 31-A). Les deux composantes PC1 et PC2 expliquent 85 % de la variance observée.

La composante PC1 qui contient 57 % de la variabilité permet de distinguer les échantillons ayant subi une hydrolyse enzymatique ou non (figure 31-A). Les échantillons traités avec des cellulases sont caractérisés par des bandes 1, 2 et 3 (valeurs positives) aux nombres d'onde 1696, 1590, 1506 cm^{-1} respectivement alors que les échantillons n'ayant pas subi d'hydrolyse enzymatique sont caractérisées par les bandes 4, 5 et 6 (valeurs négatives) aux alentours de 1200 à 1000 cm^{-1} en accord avec la dégradation des sucres (figure 31-B).

La composante PC2 expliquant 29 % de la variabilité observée en ACP permet de distinguer les échantillons natifs [valeurs positives : bandes (a) 1735, (b) 1640, (d) 1380, (f) 970 et (g) 896 cm^{-1}] des prétraités [valeurs négatives : bandes (c) 1513 et (e) 1210 cm^{-1}] témoignant d'une probable modification des lignines et perte d'hémicelluloses.

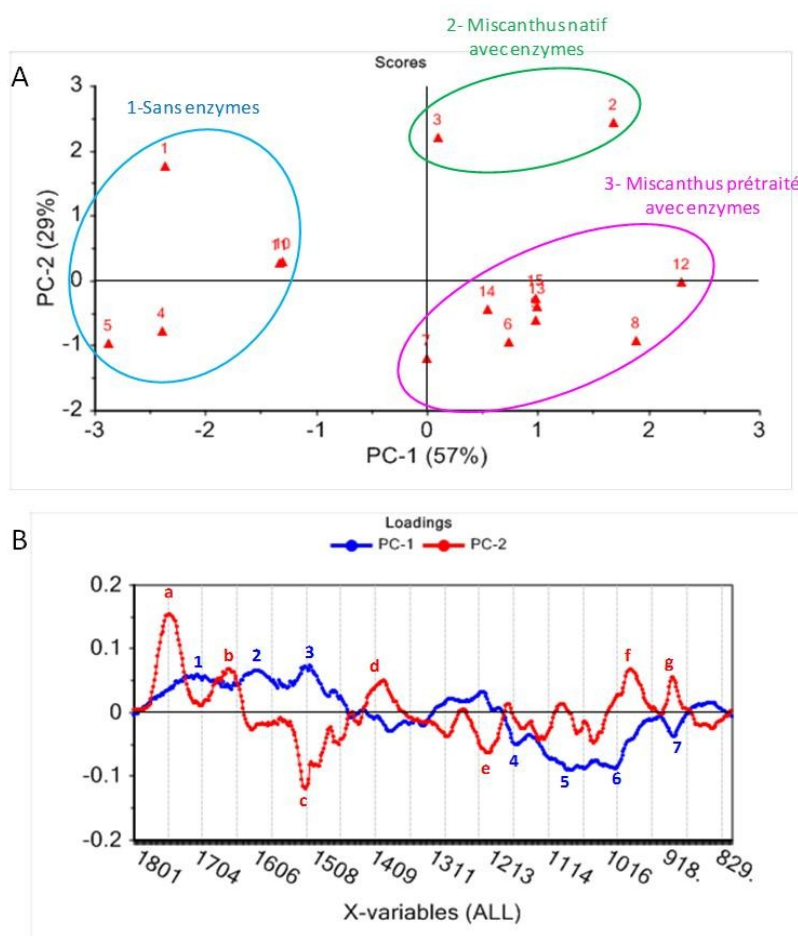


Figure 31: Analyse en composantes principales des spectres infrarouge du miscanthus natif ou prétraité, avant et après hydrolyse enzymatique.

L'analyse des variances existant entre les résidus de miscanthus prétraité SE ou DAP150 avant et après hydrolyse enzymatique au moyen des cocktails CL847 L et CL847 L/X a également été réalisée. Elle nous a permis de mieux distinguer les groupes d'échantillons en fonction des prétraitements subis. Ces groupes demeurent visibles après hydrolyse enzymatique sans toutefois distinguer l'action des deux cocktails (figure 32).

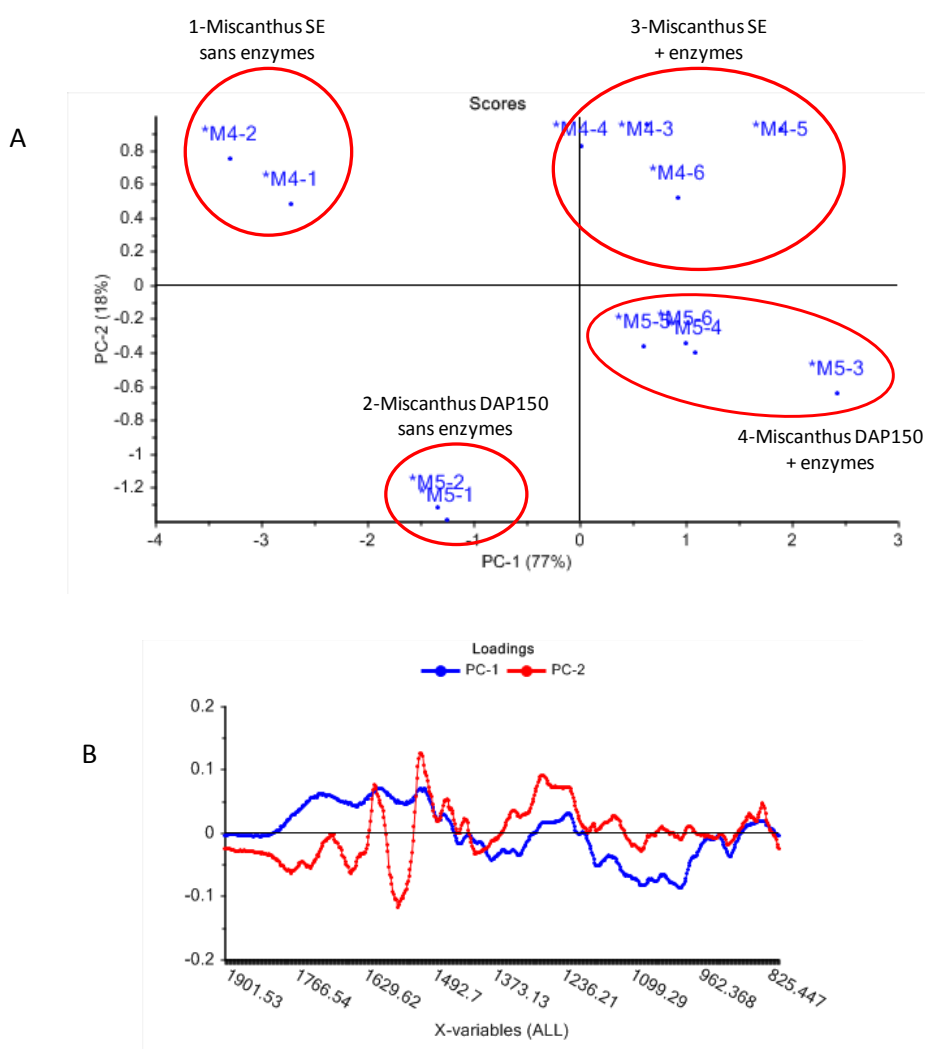


Figure 32: Analyse en composante principale des spectres infrarouge du miscanthus prétraité et hydrolysé.

Conclusions

L'analyse en moyen infrarouge permet de distinguer l'impact de chacun des prétraitements. De plus les différences entre ces deux groupes restent visibles après l'hydrolyse enzymatique. Néanmoins, les différences de performances en fonction des cocktails n'ont pas été révélées par l'analyse en composantes principales. Cette approche préliminaire pourrait être étendue aux résidus obtenus après l'action d'autres cocktails enzymatiques afin d'augmenter la taille de l'échantillonnage et ainsi mieux appréhender les possibilités de cette approche pour classer les résidus de saccharification en fonction des cocktails.

CHAPITRE VI

Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

1 Discussion générale

L'objectif de ce travail était d'explorer le potentiel de saccharification de l'espèce *Miscanthus x giganteus* pour son utilisation dans le procédé biologique de production de bioéthanol de deuxième génération. Nous avons ainsi pu déterminer l'impact de plusieurs prétraitements sur l'organisation tissulaire de cette graminée et évaluer les performances de cocktails cellulolytiques produits par des souches industrielles de *Trichoderma reesei*.

1.1 Relation entre hétérogénéité tissulaire et saccharification du miscanthus

Nous avons d'abord cherché à comprendre l'impact de l'hétérogénéité des parois cellulaires des tiges de miscanthus sur leur dégradation enzymatique. L'utilisation de fragments d'un entre-nœud basal d'une tige de miscanthus nous a permis d'évaluer plusieurs prétraitements tout en conservant l'intégrité structurale des différents tissus, ce qui était indispensable pour les études microspectroscopiques. L'analyse compositionnelle des parois de ces fragments montre des résultats en accord avec ceux rapportés par Le Ngoc *et al.*, (2010) [28] sur des entre-nœuds de miscanthus au même stade de maturité. Les prétraitements, classiquement utilisés pour prétraiter la biomasse lignocellulosique, affectent les lignines qui deviennent plus condensées et réduisent la quantité d'acides hydroxycinnamiques *p*CA et FA. En comparaison à l'ammoniaque, le prétraitement à l'acide dilué modifie plus profondément cette composition, notamment par la dégradation partielle des hémicelluloses, et conduit à un meilleur taux d'hydrolyse enzymatique de la cellulose. L'amélioration de la saccharification via un prétraitement de type acide est en accord avec des travaux similaires réalisés sur d'autres graminées [326, 393] et résulte d'une meilleure accessibilité de la cellulose aux cellulases [348]. Les rendements de saccharification restent cependant inférieurs au taux de conversion observés dans la littérature probablement à cause de la taille des fragments de miscanthus qui ne permettent pas un prétraitement optimal. De plus, la faible activité xylanase dans les cocktails utilisés pourrait affecter la conversion de la cellulose. Les xylanes résiduels générés après prétraitement peuvent en effet être un frein à l'hydrolyse enzymatique [322].

La microspectrophotométrie à transmission UV nous a permis d'apprécier la distribution des composés phénoliques au sein des différents types cellulaires de l'entre-nœud basal d'une tige de miscanthus tardif. Les analyses effectuées sur ce substrat indiquent une distribution des composés phénoliques typique des parois des graminées avec deux maxima d'absorption aux

alentours de 280 nm, du à l'ensemble des composés phénoliques, et 315 nm correspondant plus spécifiquement aux acides hydroxycinnamiques [317]. Quelques différences d'absorbance (intensité et ratio d'intensité aux deux longueurs d'ondes) ont pu être détectées entre les différents types cellulaires (sclérenchyme épidermique, sclérenchyme vasculaire et parenchyme) et les zones pariétales (paroi secondaire, jonction intercellulaire) suggérant une distribution hétérogène des composés phénoliques comme décrit par ailleurs chez d'autres graminées [317]. Les prétraitements à l'acide et à l'ammoniaque ont un effet globalement similaire sur l'absorbance des parois secondaires des différents types cellulaires, ces parois secondaires constituent l'essentiel de la masse des parois de miscanthus. La diminution du ratio A_{315}/A_{280} , plus marquée après traitement à l'ammoniaque, traduit une libération des acides hydroxycinnamiques en accord avec les résultats d'analyse chimique. Des différences dans l'absorbance à 280 nm selon les types cellulaires sont observées au niveau des jonctions cellulaires.

Nos observations microscopiques, réalisées sur un substrat prétraité puis hydrolysé avec un cocktail cellulolytique de *Trichoderma reesei*, révèlent des taux d'hydrolyses différents entre les parois du sclérenchyme et du parenchyme. Cette hydrolyse enzymatique préférentielle de certains types tissulaires a été par ailleurs rapportée par d'autres chercheurs dans le cas du maïs et de la paille de blé [31, 394]. Le changement des caractéristiques physicochimiques au sein de différents tissus peut être à l'origine des variations d'accessibilité de la cellulose aux cellulases, de cristallinité de la cellulose et d'inhibition des cellulases par les composés phénoliques pariétaux tels que les lignines résiduelles [174, 175, 291, 295]. L'analyse chimique globale des parois du miscanthus a montré que l'acide sulfurique affectait essentiellement les hémicelluloses pariétales réduisant ainsi considérablement la quantité d'acides féruliques estérifiés aux arabinoxylanes. Le traitement à l'ammoniaque quant à lui délignifie partiellement les lignines, se qui se traduit par une diminution d'acides *p*-coumariques et conduit également à la rupture des liaisons esters conduisant à la libération d'acide férulique. Toutefois l'analyse micro spectrophotométrique en transmission UV ne permet pas de distinguer l'impact de chacun des deux prétraitements sur chaque acide phénolique et/ou certaines structures de lignine qui seraient associées aux domaines pariétaux résistants.

1.2 Progression des cellulases dans les parois du miscanthus prétraité

L'étude de la progression, au sein des parois du miscanthus, de deux cellulases majeures du cocktail enzymatique de *Trichoderma reesei* (CBH1 et EG1), a été initiée au cours de cette thèse. Elle avait pour but d'identifier d'éventuels points bloquants au sein des complexes lignocellulosiques prétraités ou non. La démarche retenue consistait à utiliser des enzymes actives ou inactives afin d'évaluer le rôle de l'encombrement stérique des protéines enzymatiques dans cette progression.

La production de cellulases recombinantes a nécessité la construction de vecteurs d'expression contenant les gènes *cbh1* et *egl* exprimant des enzymes inactivés. L'inactivation est réalisée par mutagenèse dirigée des acides aminés nucléophiles identifiés dans leurs sites catalytiques respectifs. Des souches recombinantes de *Trichoderma reesei* CL847, préalablement délétées des gènes *cbh1* ou *egl*, ont été ensuite construites par recombinaison homologue (double crossing-over). Malheureusement l'expression de cellulases inactivées dans ces souches s'est révélée difficile probablement en raison de l'altération des souches suite au processus de transformation et de l'absence de contrôle du locus génomique d'intégration des cassettes d'expression. De nouvelles stratégies ont dû être adoptées pour produire ces cellulases inactives, via l'expression hétérologue d'EG1i dans la levure *Yarrowia lipolytica* et l'inactivation chimique de CBH1 par des sels de palladium [361, 362].

Les essais d'immunolocalisation des cellulases CBH1 et EG1, contenues dans le cocktail cellulolytique de la souche *Trichoderma reesei* TR3002, ont été réalisés au moyen d'anticorps polyclonaux anti-CBH1 et anti-EG1. Les premiers essais ont révélé des niveaux importants de reconnaissances non spécifiques entre le sérum et les parois lignocellulosiques qui fixeraient de manière non spécifique certains anticorps contenus dans le sérum polyclonal. Ces anticorps ont en effet été produits chez le lapin et pourraient avoir une certaine sensibilité envers les lignocelluloses qui font partie de l'alimentation de base de cet animal. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation du protocole d'immunolocalisation (appauvrissement des sérums par fixation sur miscanthus natif, optimisation du protocole de découpe des fragments et de la fixation des anticorps etc.), nous n'avons malheureusement pas pu mener à terme cette démarche. Récemment, Donohoe *et al.*, (2009) ont utilisé une approche immunocytochimique pour étudier la pénétration de cellulases CBH1 et EG1 actives dans les parois de maïs prétraité à l'acide dilué [320]. Ces auteurs ont utilisé des anticorps monoclonaux qui se sont

révélés plus efficaces pour démontrer l'impact de la destruction des parois, après prétraitement acide, sur la pénétration des cellulases.

1.3 Optimisation des mélanges enzymatiques et hydrolyse du miscanthus prétraité

L'amélioration des rendements de saccharification des parois du miscanthus passe nécessairement par une optimisation des mélanges enzymatiques en fonction des prétraitements appliqués. Les prétraitements acides ou alcalins entraînent une déstructuration physique et une modification chimique du substrat, ce qui implique d'adapter les cocktails d'enzymes en conséquence. Les capacités d'hydrolyse des différents cocktails enzymatiques produits par *Trichoderma reesei* ont été évaluées.

Le prétraitement de la biomasse aérienne de miscanthus par explosion à la vapeur en condition acide s'est avéré plus efficace que la cuisson à l'acide sulfurique à 150°C en termes de rendement et vitesse de conversion des glucanes. Les taux de saccharification de la cellulose (70%) sont proches mais un peu plus faibles que ceux obtenus pour d'autres ressources lignocellulosiques prétraitées à l'acide dilué, tels que le maïs et la paille de blé. Ceci montre que le miscanthus, bien que riche en cellulose, est réfractaire à l'hydrolyse enzymatique. Nos résultats révèlent la nécessité d'utiliser des quantités importantes d'enzymes (75 mg d'enzymes par gramme de matière sèche) pour atteindre des rendements de saccharifications maximaux. Ces quantités de protéines impactent fortement le coût global du procédé de production de bioéthanol de deuxième génération, néanmoins des temps d'hydrolyses trop longs sont également rédhibitoires pour sa viabilité. L'IFPEN a mis à disposition plusieurs cocktails enzymatiques ayant des activités cellulolytiques (FP et β -glucosidase) et hémicellulolytiques (xylanases) distinctes. La comparaison des performances des cocktails en termes de saccharification de miscanthus prétraités a confirmé la nécessité d'avoir une forte activité β -glucosidase dans le cocktail enzymatique produit par *Trichoderma reesei*. Ceci corrobore les résultats obtenus sur d'autres biomasses telles que la paille de blé [324], et démontre qu'une bonne activité β -glucosidase reste incontournable quelque soit la biomasse envisagée dans le procédé. On peut d'ailleurs noter que les principaux producteurs d'enzymes ont beaucoup travaillé sur cet aspect pour fournir des cocktails enzymatiques très riches en activité β -glucosidase (cocktails « Cellic C-tec » ou « Accélérase » de Genencor). Un niveau suffisant de β -glucosidase permet de limiter au maximum l'action inhibitrice du cellobiose sur les enzymes agissant sur les structures cellulosiques, et d'améliorer à la fois la cinétique initiale mais également le rendement final d'hydrolyse.

Un autre point a également été souligné : la nécessaire complémentarité entre cellulases et xylanases. Les xylanes résiduels sont en effet un frein non négligeable pour l'hydrolyse de la cellulose des parois du miscanthus, un cocktail possédant un bon niveau d'activité xylanase permet de faciliter l'accès des cellulases à leur substrat. Parmi les nombreuses hémicellulases présentes chez *Trichoderma reesei*, nous avons pu montrer, via la reconstitution de cocktail d'enzymes préalablement purifiées, que la xylanase 1 jouait un rôle primordial en hydrolysant à elle-seule la majorité des xylanes résiduels dans les premiers temps de l'hydrolyse. Cette enzyme permet d'améliorer significativement le taux de saccharification d'un cocktail cellulolytique. D'autres enzymes accessoires présentes dans les cocktails industriels de l'IFPEN peuvent également impacter l'hydrolyse enzymatique. Dans un tel contexte, la β -xylosidase par exemple pourrait avoir le même rôle d'accélérateur que la β -glucosidase pour les cellulases. Il y a enfin les enzymes de la famille GH61, dont on a montré que l'une d'elle est surexprimée conjointement avec les hémicellulases en cas d'ajout de xylose au cours de la production des enzymes.

2 Conclusions et perspectives

Au regard des résultats obtenus au cours de cette thèse, il apparaît que l'utilisation de l'espèce candidate *Miscanthus x giganteus* en tant que biomasse pour la production de bioéthanol de deuxième génération nécessite une optimisation du prétraitement et du cocktail enzymatique à employer. L'hydrolyse enzymatique de la biomasse aérienne du miscanthus requiert des prétraitements sévères capables d'en modifier les caractéristiques physicochimiques en vue d'optimiser l'accessibilité de la cellulose. L'optimisation des rendements de saccharification doit cependant obéir à des contraintes technico-économiques et des prétraitements moins sévères permettraient de réduire le coût opératoire. La réduction de la dose d'enzymes est également un facteur important, car leurs productions représentent encore aujourd'hui un tiers du coût global du procédé de production de bioéthanol de seconde génération.

Nos travaux de recherche ont révélé une distribution hétérogène des composés phénoliques au sein des parois cellulaires du miscanthus. Les différences de dégradation enzymatique observées lors de notre étude ne peuvent être expliquées par la seule distribution des composés phénoliques totaux. La visualisation de la distribution de chacun des acides hydroxycinnamiques par des anticorps reconnaissant spécifiquement le *p*CA et le FA pourrait compléter notre étude et contribuer à mieux comprendre les différences de dégradation observées [395]. De plus, les prétraitements agissent sur les autres constituants pariétaux tels

que la cellulose et les lignines. L'analyse en diffraction de rayons X à l'échelle cellulaire peut renseigner sur l'impact des prétraitements sur la structure de la cellulose [396]. L'identification des modifications des lignines suite au prétraitement, notamment à l'ammoniaque, est susceptible de mieux expliquer les phénomènes d'hydrolyse différentielle des parois du miscanthus selon les types cellulaires. Une cartographie de la distribution des types de lignines (domaines condensées/non condensées et proportion de monomères, motifs LCC par exemple) pourrait être envisagée par des approches complémentaires à la microspectroscopie UV telles que l'immunocytochimie au moyen d'anticorps spécifiques. Plus largement, les modifications des constituants pariétaux pourraient être étudiées à l'échelle cellulaire (micromètre) en microspectroscopie Raman [258].

L'élucidation des mécanismes régissant l'hydrolyse enzymatique des parois passe aussi par la caractérisation de ses constituants à l'échelle nanométrique. Les techniques de microscopie classiques que nous avons utilisées ne permettent pas de répondre à cet objectif alors que la microscopie électronique à balayage (SEM) ou à transmission (TEM) peut fournir ce genre d'informations. D'autres techniques de microscopie à champs proche (SPM : scanning probe microscopy) telle que la microscopie à force atomique (AFM, atomic force microscopy) [397] utilisées sur d'autres substrats lignocellulosiques, suggèrent la présence de gouttelettes de lignines relocalisées à la surface des parois et une augmentation de la porosité après prétraitement [215, 232, 233, 398].

L'ensemble des modifications que subissent les complexes lignocellulosiques lors des prétraitements sont susceptibles d'affecter directement la progression des enzymes cellulolytiques dans les tissus. Les ponctuations intercellulaires, fragilisées après action des réactifs chimiques, contribueraient plus efficacement à la progression des enzymes dans l'ensemble des cellules des fragments d'entre-nœuds [167]. La pénétration des enzymes au sein du réseau pariétal peut également être impactée par la modification des propriétés de surface des parois et de leur porosité. En particulier l'efficacité de ces enzymes dépend de l'accessibilité de la cellulose. Notre approche basée sur l'étude de la diffusion de deux cellulases clés du cocktail cellulolytique de *Trichoderma reesei*, CBH1 et EG1, devrait permettre l'identification d'éventuels points de blocage lié à l'architecture du réseau. L'utilisation d'anticorps monoclonaux constituerait une solution face aux possibles interactions non spécifiques entre les constituants des parois et anticorps polyclonaux, qui ont été observés au cours de ces travaux. De plus l'utilisation d'anticorps reconnaissant les

différents polysaccharides pariétaux complèterait l'analyse des modifications des strates pariétales suite au prétraitements [399].

L'autre levier pouvant permettre d'optimiser les rendements de saccharification des parois de miscanthus est l'amélioration des cocktails enzymatiques produits par *Trichoderma reesei*. Cet objectif peut être atteint par l'identification des enzymes les plus actives sur un substrat prétraité. Nos travaux ont montré l'importance d'enrichir les mélanges enzymatiques en activités hémicellulases et suggèrent une éventuelle implication d'autres enzymes auxiliaires telles que les GH61 [379]. Cette nouvelle famille d'enzymes actives sur cellulose fait actuellement l'objet d'intenses recherches pour déterminer sa fonction précise. Ces enzymes sont considérées comme des polysaccharides monooxygénases (PMOs) et pourraient favoriser l'action des cellulases "classiques" en clivant les cycles osidiques et/ou en modifiant la surface des microfibrilles de cellulose [371]. L'optimisation du cocktail enzymatique peut se faire soit par modification des conditions de production des enzymes ou par remodelage du génome des souches industrielles de *T. reesei*. Ces modifications devront cependant tenir compte des évaluations technico-économiques intégrant d'autres paramètres comme le coût des substrats carbonés induisant la production ou les doses d'enzymes employés pour chaque type de biomasses susceptibles d'être utilisées pour produire du bioéthanol de seconde génération. La production et les performances des nouveaux cocktails d'enzymes devront enfin être extrapolées à des échelles autres que le laboratoire afin de s'assurer de la robustesse des souches modifiées de *Trichoderma reesei*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'hare M, Kammen DM. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 2006;311:506.
- [2] Ballerini D. Les biocarburants de première génération: l'éthanol et le biodiesel. 2007.
- [3] Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010;14:578.
- [4] Gabrielle B. Intérêts et limites des biocarburants de première génération. *Journal de la Société de Biologie* 2008;202:161.
- [5] Damartzis T, Zabaniotou A. Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design--A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2011;15:366.
- [6] www.ifpenergiesnouvelles.fr/content/download/70596/1513732/version/2/file/Panorama2011_06-VF_Nouvelles-technos-Biocarburants.pdf.
- [7] Cadoret JP, Bernard O. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie* 2008;202:201.
- [8] Singh J, Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010;14:2596.
- [9] Chundawat SPS, Beckham GT, Himmel ME, Dale BE. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2011;2:121.
- [10] Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol* 2009;20:372.
- [11] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology* 2002;83:1.
- [12] Sánchez ÓJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 2008;99:5270.
- [13] Jacobs BF, Kingston JD, Jacobs LL. The origin of grass-dominated ecosystems. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1999;86:590.
- [14] Greef JM, Deuter M. Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* Greef-et-Deu. *Angew Bot* 1993;67:87.
- [15] Jorgensen U, Muhs H. *Miscanthus* breeding and improvement. In: Jones M, Walsh M, editors. *Miscanthus for Energy and Fibre*. London: James & James; 2001, p. 68.

- [16] Kimball B. Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agron j* 1983;75:779.
- [17] Steve P L. 7 - Environmental Responses. In: Rowan FS, Russell KM, editors. *C4 Plant Biology*. San Diego: Academic Press; 1999, p. 215.
- [18] Nielsen P. The productivity of the *Miscanthus* cultivar *Giganteus*. *Tidsskr Planteavl* 1987;91:361.
- [19] Lewandowski I, Clifton-Brown JC, Scurlock JMO, Huisman W. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy* 2000;19:209.
- [20] Clifton-brown JC, Stampfl PF, Jones MB. *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology* 2004;10:509.
- [21] Cadoux S, Vanderdriessche V, Machet J, Mary B, Beaudouin N, Lemaire G, et al. Potential yield and main limiting factors of *Miscanthus giganteus* in France. Identification of the needs for further research. 2008.
- [22] Zub H, Brancourt-Hulmel M. Agronomic and Physiological Performances of Different Species of *Miscanthus*, a Major Energy Crop. *Sustainable Agriculture Volume 2* 2011:469.
- [23] Heaton E, Dohleman F, Long S. Meeting US biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. *Global change biology* 2008;14:2000.
- [24] Heaton EA, Long SP, Voigt TB, Jones MB, Clifton-Brown J. *Miscanthus* for Renewable Energy Generation: European Union Experience and Projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 2004;9:433.
- [25] Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass and Bioenergy* 2003;25:335.
- [26] Amougou N, Bertrand I, Machet J-M, Recous S. Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization. *Plant and Soil* 2011;338:83.
- [27] Hodgson EM, Lister SJ, Bridgwater AV, Clifton-Brown J, Donnison IS. Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass and Bioenergy* 2010;34:652.
- [28] Le Ngoc Huyen T, Rémond C, Dheilly RM, Chabbert B. Effect of harvesting date on the composition and saccharification of *Miscanthus x giganteus*. *Bioresource Technology* 2010;101:8224.

- [29] <http://www.charlesquentin.com/pages/SVT/Miscanthus.htm>.
- [30] Jung HG, Casler MD. Maize Stem Tissues. *Crop Sci* 2006;46:1793.
- [31] Bertrand I, Chabbert B, Kurek B, Recous S. Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant and Soil* 2006;281:291.
- [32] Brett, C.T. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*; 1996.
- [33] http://www.clermont.inra.fr/plateau_technique_microscopie/galleries_d_images/domaine_vegetal.
- [34] Carpita NC, Gibeaut DM. STRUCTURAL MODELS OF PRIMARY-CELL WALLS IN FLOWERING PLANTS - CONSISTENCY OF MOLECULAR-STRUCTURE WITH THE PHYSICAL-PROPERTIES OF THE WALLS DURING GROWTH. *Plant J* 1993;3:1.
- [35] McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. *Annual Review of Biochemistry* 1984;53:625.
- [36] Carpita NC. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 1996;47:445.
- [37] Jarvis MC, McCann MC. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: Concepts and methodology. *Plant Physiology and Biochemistry* 2000;38:1.
- [38] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 2008;454:841.
- [39] Barnoud. *La cellulose*. 1980.
- [40] Fry SC. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*: Longman Group Limited; 1988.
- [41] Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, et al. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* 2004;306:2206.
- [42] O'Sullivan A. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 1997;4:173.
- [43] Atalla. *Celluloses*. *Comprehensive natural products chemistry*; 1999.
- [44] McCann MC, Wells B, Roberts K. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science* 1990;96:323.
- [45] Nakashima J, Mizuno T, Takabe K, Fujita M, Saiki H. Direct Visualization of Lignifying Secondary Wall Thickenings in *Zinnia elegans* Cells in Culture. *Plant and Cell Physiology* 1997;38:818.
- [46] Ding S-Y, Himmel ME. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:597.

- [47] Bocek AM. Effect of Hydrogen Bonding on Cellulose Solubility in Aqueous and Nonaqueous Solvents. *Russian Journal of Applied Chemistry* 2003;76:1711.
- [48] Saha B. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003;30:279.
- [49] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* 2010;61:263.
- [50] Buchala AJ, Wilkie KCB. The ratio of $\beta(1\rightarrow3)$ to $\beta(1\rightarrow4)$ glucosidic linkages in non-endospermic hemicellulosic β -glucans from oat plant (*Avena sativa*) tissues at different stages of maturity. *Phytochemistry* 1971;10:2287.
- [51] Buchala AJ, Wilkie KCB. Total hemicelluloses from wheat at different stages of growth. *Phytochemistry* 1973;12:499.
- [52] Kato Y, Nevins DJ. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl-[α]-l-arabinofuranosyl)-1 ($\rightarrow$ 3)-O-[β]-d-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-d-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydrate Research* 1985;137:139.
- [53] Fry SC. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell-walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 1986;37:165.
- [54] Bunzel M, Ralph J, Funk C, Steinhart H. Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology* 2003;217:128.
- [55] Rouau X, Cheynier V, Surget A, Gloux D, Barron C, Meudec E, et al. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry* 2003;63:899.
- [56] Ralph J. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* 2010;9:65.
- [57] Bunzel M, Ralph J, Funk C, Steinhart H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* 2005;46:5845.
- [58] Bunzel M. Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews* 2010;9:47.
- [59] Zhang A, Lu F, Sun R, Ralph J. Ferulate–coniferyl alcohol cross-coupled products formed by radical coupling reactions. *Planta* 2009;229:1099.
- [60] Bunzel M, Dobberstein D, Heuermann B, Bruning P, Funk C, Steinhart H, et al. Ferulate Trimers and Tetramers in Cereal Grains. 2007.
- [61] Grabber JH, Ralph J, Lapierre C, Barrière Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin–cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* 2004;327:455.

- [62] Lygin AV, Upton J, Dohleman FG, Juvik J, Zabolina OA, Widholm JM, et al. Composition of cell wall phenolics and polysaccharides of the potential bioenergy crop – *Miscanthus*. *GCB Bioenergy* 2011;3:333.
- [63] Buranov AU, Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 2008;28:237.
- [64] Sarkanen KV, Ludwig CH. Lignins: occurrence, formation, structure and reactions: Wiley-Interscience New York; 1971.
- [65] Ralph J, Brunow G, Boerjan W. Lignins. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
- [66] Lapierre C, Pollet B, Rolando C. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates* 1995;21:397.
- [67] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 2003;54:519.
- [68] Billa, E., Monties, B. Structural variability of lignins and associated phenolic acids in wheat straw. Bucuresti: Editura Academiei Române; 1995.
- [69] Hatfield R, Marita J. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls. *Phytochemistry Reviews* 2010;9:35.
- [70] Terashima N, Fukushima, K., He, L.-F., Takabe, K.,. Comprehensive model of the lignified plant cell wall: ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI,; 1993.
- [71] He L, Terashima N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. III. Heterogeneity of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Lignin with Respect to the Composition of Structural Units in Different Morphological Regions. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 1990;10:435.
- [72] He L, Terashima N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons IV. Deposition Process and Structural Diversity of the Lignin in the CellWall of Sugarcane and Rice Plant Studied by Ultraviolet Microscopic Spectroscopy. *Holzforschung* 1991;45:191.
- [73] Buxton DR, Russell JR. LIGNIN CONSTITUENTS AND CELL-WALL DIGESTIBILITY OF GRASS AND LEGUME STEMS. *Crop Sci* 1988;28:553.
- [74] Chen L, Auh C, Chen F, Cheng X, Aljoe H, Dixon RA, et al. Lignin Deposition and Associated Changes in Anatomy, Enzyme Activity, Gene Expression, and Ruminant Degradability in Stems of Tall Fescue at Different Developmental Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:5558.

- [75] Morrison, A. T, Jung, G. H, Buxton, R. D, et al. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. Madison, WI, ETATS-UNIS: Crop Science Society of America; 1998.
- [76] Chesson A, Provan GJ, Russell W, Scobbie L, Chabbert B, Monties B. Characterisation of Lignin from Parenchyma and Sclerenchyma Cell Walls of the Maize Internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1997;73:10.
- [77] Hatfield RD, Wilson JR, Mertens DR. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999;79:891.
- [78] Linder Å, Bergman R, Bodin A, Gatenholm P. Mechanism of assembly of xylan onto cellulose surfaces. *Langmuir* 2003;19:5072.
- [79] Boukari I, Putaux J-L, Cathala B, Barakat A, Saake B, Rémond C, et al. In Vitro Model Assemblies To Study the Impact of Lignin–Carbohydrate Interactions on the Enzymatic Conversion of Xylan. *Biomacromolecules* 2009;10:2489.
- [80] Iiyama K, Lam TBT, Stone BA. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 1990;29:733.
- [81] Hatfield R, Marita J, Frost K, Grabber J, Ralph J, Lu F, et al. Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. *Planta* 2009;229:1253.
- [82] Jacquet G, Pollet B, Lapierre C, Mhamdi F, Rolando C. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *Journal of agricultural and food chemistry* 1995;43:2746.
- [83] Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* 1995;275:167.
- [84] Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P. The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol* 1973;51:188.
- [85] McCann MC, Bush M, Milioni D, Sado P, Stacey NJ, Catchpole G, et al. Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry* 2001;57:811.
- [86] Morrison IM. Structural investigations on the lignin-carbohydrate complexes of *Lolium perenne*. *The Biochemical journal* 1974;139:197.

- [87] Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* 2002;66:506.
- [88] Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:521.
- [89] Bayer EA, Henrissat B, Lamed R. The cellulosome: a natural bacterial strategy to combat biomass recalcitrance. *Biomass Recalcitrance* 2008:407.
- [90] Schulein M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of biotechnology* 1997;57:71.
- [91] Ellouz Chaabouni S, Belguith H, Hassairi I, M'Rad K, Ellouz R. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. *Applied microbiology and biotechnology* 1995;43:267.
- [92] Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F, Olsson L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial technology* 2003;32:851.
- [93] Ong LGA, Abd-Aziz S, Noraini S, Karim MIA, Hassan M. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation using palm kernel cake as substrate. *Applied biochemistry and biotechnology* 2004;118:73.
- [94] Hayashida S, Ohta K, Mo K. Cellulases of *Humicola insolens* and *Humicola grisea*. *Methods in Enzymology* 1988;160:323.
- [95] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93:7755.
- [96] Reese E. History of the cellulase program at the US army Natick Development Center. 1976, p. 9.
- [97] Teeri T, Penttilä M, Keränen S, Nevalainen H, Knowles J. Structure, function, and genetics of cellulases. *Biotechnology and Bioengineering* 1992;21:417.
- [98] Margolles-clark E, Ihnen M, Penttilä M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* 1997;57:167.

- [99] Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, et al. Transcriptional Regulation of Biomass-degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:31988.
- [100] Shoemaker S, Schweickart V, Ladner M, Gelfand D, Kwok S, Myambo K, et al. Molecular Cloning of Exo-Cellobiohydrolase I Derived from *Trichoderma Reesei* Strain L27. *Nature biotechnology* 1983;1:691.
- [101] Penttilä M, Lehtovaara P, Nevalainen H, Bhikhabhai R, Knowles J. Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* 1986;45:253.
- [102] Teeri TT, Lehtovaara P, Kauppinen S, Salovuori I, Knowles J. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* 1987;51:43.
- [103] Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles J, Jones T. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 1990;249:380.
- [104] Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*1. *Journal of molecular biology* 1998;275:309.
- [105] Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews* 2005;29:719.
- [106] Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* 2009;2:19.
- [107] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology* 2008;26:553.
- [108] Vinzant T, Adney W, Decker S, Baker J, Kinter M, Sherman N, et al. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. *Applied biochemistry and biotechnology* 2001;91:99.
- [109] Herpoel-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Molle D, Lignon S, et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnology for Biofuels* 2008;1.
- [110] Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology* 2003;14:438.

- [111] Durand H, Clanet M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology* 1988;10:341.
- [112] Warzywoda M, Vandecasteele JP, Pourquié J. A comparison of genetically improved strains of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters* 1983;5:243.
- [113] Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology* 2011.
- [114] Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, Penttilä M. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology* 2005;151:135.
- [115] Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:16151.
- [116] Mandels M, Parrish FW, Reese ET. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *Journal of Bacteriology* 1962;83:400.
- [117] Kubicek C, Penttilä M. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium* 1998;2:49.
- [118] Ilmen M, Thrane C, Penttilä M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Molecular and General Genetics MGG* 1996;251:451.
- [119] Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular microbiology* 1996;21:1273.
- [120] Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:13909.
- [121] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases-and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied microbiology and biotechnology* 2008;78:211.
- [122] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, Penttilä M. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:24309.

- [123] Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. ACEI of *Trichoderma reesei* Is a Repressor of Cellulase and Xylanase Expression. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:56.
- [124] Portnoy T, Margeot A, Seidl-Seiboth V, Le Crom S, Ben Chaabane F, Linke R, et al. Differential Regulation of the Cellulase Transcription Factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* Strains Producing High and Low Levels of Cellulase. *Eukaryotic Cell* 2011;10:262.
- [125] Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* (London, England : 1993) 1995;3:853.
- [126] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 1991;280:309.
- [127] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 1993;293:781.
- [128] <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>.
- [129] Ohmiya K, Sakka K, Karita S, Kimura T. Structure of cellulases and their applications. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 1997;14:365.
- [130] Reeta RS. Chapter 8 - Production of Cellulolytic Enzymes for the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. In: Ashok P, Christian L, Steven CR, Claude-Gilles D, Edgard GnansounouA2 - Ashok Pandey CLSCRC-GD, Edgard G, editors. *Biofuels*. Amsterdam: Academic Press; 2011, p. 177.
- [131] Tomme P, Van Tilbeurgh H, Pettersson G, Van Damme J, Vandekerckhove J, Knowles J, et al. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. *European Journal of Biochemistry* 1988;170:575.
- [132] Gilkes N, Warren R, Miller Jr RC, Kilburn DG. Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:10401.
- [133] <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>.
- [134] Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 2004;382:769.
- [135] Sukumaran RK, Singhanian RR, Pandey A. Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2005;64:832.
- [136] Medve J, Karlsson J, Lee D, Tjerneld F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar

production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 1998;59:621.

[137] Kleman-Leyer KM, Siika-Aho M, Teeri TT, Kirk TK. The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Synergistically To Solubilize Native Cotton Cellulose but Not To Decrease Its Molecular Size. *Applied and Environmental Microbiology* 1996;62:2883.

[138] Medve J, Ståhlberg J, Tjerneld F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 1994;44:1064.

[139] Nidetzky B, Steiner W, Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochemical Journal* 1994;303:817.

[140] Jeoh T, Michener W, Himmel ME, Decker SR, Adney WS. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnology for Biofuels* 2008;1:10.

[141] Beckham GT, Matthews JF, Bomble YJ, Bu L, Adney WS, Himmel ME, et al. Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. *The Journal of Physical Chemistry B* 2010;114:1447.

[142] Linder M, Teeri TT. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of biotechnology* 1997;57:15.

[143] Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles J, et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 1994;265:524.

[144] Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Ståhlberg J, et al. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes¹. *Journal of molecular biology* 1997;272:383.

[145] Lappalainen A. Purification and characterization of xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and applied biochemistry* 1986;8:437.

[146] Wong K, Tan L, Saddler JN. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiology and molecular biology reviews* 1988;52:305.

[147] Sundberg M, Poutanen K. Purification and properties of two acetylxylan esterases of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and applied biochemistry* 1991;13:1.

- [148] Margolles-Clark E, Tenkanen M, Söderlund H, Penttilä M. Acetyl Xylan Esterase from *Trichoderma reesei* Contains an Active-Site Serine Residue and a Cellulose-Binding Domain. *European Journal of Biochemistry* 1996;237:553.
- [149] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry* 2007;42:497.
- [150] Zeilinger S, Kristufek D, Arisan-Atac I, Hodits R, Kubicek C. Conditions of formation, purification, and characterization of an alpha-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Applied and Environmental Microbiology* 1993;59:1347.
- [151] Poutanen K. An [alpha]-l-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *Journal of biotechnology* 1988;7:271.
- [152] Siika-aho M, Tenkanen M, Buchert J, Puls J, Viikari L. An [alpha]-glucuronidase from *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Enzyme and Microbial technology* 1994;16:813.
- [153] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology* 2001;56:326.
- [154] Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S, Okada H. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 1983;47:957.
- [155] Biely P, Vrsanska M, Kratky Z. Xylan-degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Identification and cellular localization. *European journal of biochemistry / FEBS* 1980;108:313.
- [156] Peter B. Microbial xylanolytic systems. *TRENDS in Biotechnology* 1985;3:286.
- [157] Chundawat SPS, Lipton MS, Purvine SO, Uppugundla N, Gao D, Balan V, et al. Proteomics-based Compositional Analysis of Complex Cellulase–Hemicellulase Mixtures. *Journal of Proteome Research* 2011;10:4365.
- [158] Zeilinger S, Mach RL, Schindler M, Herzog P, Kubicek CP. Different Inducibility of Expression of the Two Xylanase Genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:25624.
- [159] Ogasawara W, Shida Y, Furukawa T, Shimada R, Nakagawa S, Kawamura M, et al. Cloning, functional expression and promoter analysis of xylanase III gene from *Trichoderma reesei*. *Applied microbiology and biotechnology* 2006;72:995.
- [160] Saarelainen R, Paloheimo M, Fagerström R, Suominen PL, Nevalainen KMH. Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (*pl 9*) gene *xln2*. *Molecular and General Genetics MGG* 1993;241:497.

- [161] Torronen A, Rouvinen J. Structural comparison of two major endo-1, 4-xylanases from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 1995;34:847.
- [162] Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M, Kluepfel D. Endo-[beta]-1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of biotechnology* 1997;57:151.
- [163] Lynd LR, Laser MS, Bransby D, Dale BE, Davison B, Hamilton R, et al. How biotech can transform biofuels. *Nature biotechnology* 2008;26:169.
- [164] Zhang YHP. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2008;35:367.
- [165] Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:850.
- [166] Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 2007;315:804.
- [167] Viamajala S, Selig MJ, Vinzant TB, Tucker MP, Himmel ME, McMillan JD, et al. Catalyst Transport in Corn Stover Internodes Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. In: McMillan JD, Adney WS, Mielenz JR, Klasson KT, editors: Humana Press; 2006, p. 509.
- [168] Chesson A, Gardner PT, Wood TJ. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1997;75:289.
- [169] Gardner PT, Wood TJ, Chesson A, Stuchbury T. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999;79:11.
- [170] Ishizawa CI, Davis MF, Schell DF, Johnson DK. Porosity and Its Effect on the Digestibility of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:2575.
- [171] O'Driscoll, D., Read, M. S, Steer, W. M. Determination of cell-wall porosity by microscopy: walls of cultured cells and pollen tubes. Amsterdam, PAYS-BAS: Royal Botanical Society of the Netherlands; 1993.
- [172] Muñoz IG, Ubhayasekera W, Henriksson H, Szabó I, Pettersson G, Johansson G, et al. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. *Journal of Molecular Biology* 2001;314:1097.

- [173] Muñoz IG, Mowbray SL, Ståhlberg J. The catalytic module of Cel7D from *Phanerochaete chrysosporium* as a chiral selector: structural studies of its complex with the beta blocker (R)-propranolol. *Acta Crystallographica Section D* 2003;59:637.
- [174] Rahikainen J, Mikander S, Marjamaa K, Tamminen T, Lappas A, Viikari L, et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood—study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnology and Bioengineering* 2011;108:2823.
- [175] Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, Kadla J, Maximenko V, Kubo S, et al. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology* 2006;125:198.
- [176] Zilliox C, Debeire P. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme and Microbial technology* 1998;22:58.
- [177] Hatfield RD. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* 1993:285.
- [178] Grabber J, Hatfield R, Ralph J. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. 1998.
- [179] Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46:2609.
- [180] Mitchell DJ, Grohmann K, Himmel ME, Dale BE, Schroeder HA. Effect of the degree of acetylation on the enzymatic digestion of acetylated xylans. *Journal of wood chemistry and technology* 1990;10:111.
- [181] Selig M, Adney W, Himmel M, Decker S. The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose* 2009;16:711.
- [182] Zhu L, O'Dwyer JP, Chang VS, Granda CB, Holtzaple MT. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresour Technol* 2008;99:3817.
- [183] Chang V, Holtzaple M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84-86:5.
- [184] Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Progress* 1999;15:804.
- [185] Matthews JF, Skopec CE, Mason PE, Zuccato P, Torget RW, Sugiyama J, et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . *Carbohydrate Research* 2006;341:138.

- [186] Nishiyama Y, Langan P, Chanzy H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 2002;124:9074.
- [187] Ramos LP, Breuil C, Saddler JN. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial technology* 1993;15:19.
- [188] Yang B, Willies DM, Wyman CE. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion. *Biotechnology and Bioengineering* 2006;94:1122.
- [189] Converse AO, Matsuno R, Tanaka M, Taniguchi M. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnology and Bioengineering* 1988;32:38.
- [190] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering* 1990;36:275.
- [191] Eriksson T, Karlsson J, Tjerneld F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied biochemistry and biotechnology* 2002;101:41.
- [192] Kadam KL, Rydholm EC, McMillan JD. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnology progress* 2004;20:698.
- [193] Kumar R, Wyman CE. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource technology* 2009;100:4203.
- [194] Yu P, Maenz DD, McKinnon JJ, Racz VJ, Christensen DA. Release of Ferulic Acid from Oat Hulls by *Aspergillus* Ferulic Acid Esterase and *Trichoderma* Xylanase. *Journal of agricultural and food chemistry* 2002;50:1625.
- [195] Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, Hazlewood GP, Williamson G. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999;79:428.
- [196] Arantes V, Saddler J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 2010;3:4.
- [197] Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 2004;88:797.

- [198] Wyman CE. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *TRENDS in Biotechnology* 2007;25:153.
- [199] Heinzelman P, Snow CD, Wu I, Nguyen C, Villalobos A, Govindarajan S, et al. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:5610.
- [200] Liu W, Hong J, Bevan DR, Zhang YHP. Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;103:1087.
- [201] Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances* 2006;24:452.
- [202] Tu M, Chandra RP, Saddler JN. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology progress* 2007;23:398.
- [203] Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat Biotech* 2007;25:759.
- [204] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008;2:26.
- [205] Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2009;48:3713.
- [206] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology* 2005;96:2026.
- [207] Millett MA, Baker AJ, Satter LD. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Journal Name: Biotechnol Bioeng Symp; (United States); Journal Volume: 6 1976;Medium: X; Size: Pages: 125.*
- [208] Chum HL, Johnson DK, Black S, Baker J, Grohmann K, Sarkanen KV, et al. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnology and Bioengineering* 1988;31:643.
- [209] Millett Merrill A, Effland Marilyn J, Caulfield Daniel F. Influence of Fine Grinding on the Hydrolysis of Cellulosic Materials? Acid Vs. Enzymatic. *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1979, p. 71.*

- [210] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2005;96:673.
- [211] Yang B, Wyman CE. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* 2004;86:88.
- [212] Hinman N, Schell D, Riley J, Bergeron P, Walter P. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Applied biochemistry and biotechnology* 1992;34:639.
- [213] Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Miller SJ. Effects of two-stage dilute acid pretreatment on the structure and composition of lignin and cellulose in loblolly pine. *BioEnergy Research* 2008;1:205.
- [214] Selig MJ, Viamajala S, Decker SR, Tucker MP, Himmel ME, Vinzant TB. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology progress* 2007;23:1333.
- [215] Donohoe BS, Decker SR, Tucker MP, Himmel ME, Vinzant TB. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering* 2008;101:913.
- [216] Brunecky R, Vinzant TB, Porter SE, Donohoe BS, Johnson DK, Himmel ME. Redistribution of xylan in maize cell walls during dilute acid pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;102:1537.
- [217] Root DF. Kinetics of the acid catalyzed conversion of xylose to furfural: University of Wisconsin--Madison; 1956.
- [218] Sanchez B, Bautista J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial technology* 1988;10:315.
- [219] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial technology* 1999;24:151.
- [220] Chang VS, Burr B, Holtzapple MT. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied biochemistry and biotechnology* 1997;63:3.
- [221] Chang VS, Nagwani M, Holtzapple MT. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied biochemistry and biotechnology* 1998;74:135.

- [222] Kong F, Engler CR, Soltes EJ. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Applied biochemistry and biotechnology* 1992;34:23.
- [223] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Biofuels* 2007;41.
- [224] Lapiere C, Jouin D, Monties B. On the molecular origin of the alkali solubility of Gramineae lignins. *Phytochemistry* 1989;28:1401.
- [225] Kim T, Lee Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. *Appl Biochem Biotechnol* 2007;137-140:81.
- [226] Zhu S, Wu Y, Yu Z, Chen Q, Wu G, Yu F, et al. Microwave-assisted Alkali Pretreatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis. *Biosystems Engineering* 2006;94:437.
- [227] Rémond C, Aubry N, Crônier D, Noël S, Martel F, Roge B, et al. Combination of ammonia and xylanase pretreatments: Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. *Bioresource Technology* 2010;101:6712.
- [228] Isci A, Himmelsbach J, Pometto A, Raman D, Anex R. Aqueous Ammonia Soaking of Switchgrass Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2008;144:69.
- [229] Pu Y, Zhang D, Singh PM, Ragauskas AJ. The new forestry biofuels sector. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008;2:58.
- [230] Allen S, Spencer M, Antal Jr M, Laser M, Lynd L. Hot liquid water pretreatment of lignocellulosics at high solids concentrations. *Developments in thermochemical biomass conversion* 1997;1:765.
- [231] Kaparaju P, Felby C. Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre-treatment processes of wheat straw and corn stover. *Bioresource Technology* 2010;101:3175.
- [232] Kristensen J, Thygesen L, Felby C, Jorgensen H, Elder T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuels* 2008;1:5.
- [233] Hansen MAT, Kristensen JB, Felby C, Jørgensen H. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) - The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresource Technology* 2011;102:2804.
- [234] Zeng M, Mosier NS, Huang C-P, Sherman DM, Ladisch MR. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;97:265.

- [235] Li J, Henriksson G, Gellerstedt G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource technology* 2007;98:3061.
- [236] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2009;100:10.
- [237] Overend R, Chornet E, Gascoigne J. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A, Mathematical and Physical Sciences* 1987;321:523.
- [238] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 2000;74:25.
- [239] Jacquet N, Vanderghem C, Blecker C, Paquot M. La steam explosion: application en tant que prétraitement de la matière cellulosique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement [= BASE]* 2010;14.
- [240] Xu F, Sun R-C, Sun J-X, Liu C-F, He B-H, Fan J-S. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chimica Acta* 2005;552:207.
- [241] Sun X, Xu F, Sun R, Fowler P, Baird M. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Research* 2005;340:97.
- [242] Excoffier G, Peguy A, Rinaudo M, Vignon M. Evolution of lignocellulosic components during steam explosion. Potential applications. 1991, p. 83.
- [243] Li J, Gellerstedt G, Toven K. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresource technology* 2009;100:2556.
- [244] Grous WR, Converse AO, Grethlein HE. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme and Microbial technology* 1986;8:274.
- [245] Schultz TP, Templeton MC, Biermann CJ, McGinnis GD. Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. *Journal of agricultural and food chemistry* 1984;32:1166.
- [246] Horn SJ, Nguyen QD, Westereng B, Nilsen PJ, Eijsink VGH. Screening of steam explosion conditions for glucose production from non-impregnated wheat straw. *Biomass and Bioenergy* 2011;35:4879.
- [247] Toussaint B, Excoffier G, Vignon M. Effect of steam explosion treatment on the physico-chemical characteristics and enzymic hydrolysis of poplar cell wall components. *Animal Feed Science and Technology* 1991;32:235.

- [248] Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour Technol* 2007;98:2503.
- [249] Bura R, Chandra R, Saddler J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology progress* 2009;25:315.
- [250] Sørensen A, Teller PJ, Hilstrøm T, Ahring BK. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresour Technol* 2008;99:6602.
- [251] Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. Springer; 2006, p. 496.
- [252] Bura R, Mansfield SD, Saddler JN, Bothast RJ. SO₂-catalyzed steam explosion of corn fiber for ethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology* 2002;98:59.
- [253] Kumar L, Chandra R, Chung PA, Saddler J. Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields? *Bioresour Technol* 2010;101:7827.
- [254] Monavari S, Galbe M, Zacchi G. Impact of impregnation time and chip size on sugar yield in pretreatment of softwood for ethanol production. *Bioresource technology* 2009;100:6312.
- [255] Ewanick SM, Bura R, Saddler JN. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;98:737.
- [256] Wu MM, Chang K, Gregg DJ, Boussaid A, Beatson RP, Saddler JN. Optimization of steam explosion to enhance hemicellulose recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. *Applied biochemistry and biotechnology* 1999;77:47.
- [257] Gollapalli LE, Dale BE, Rivers DM. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. *Applied biochemistry and biotechnology* 2002;98:23.
- [258] Chundawat SPS, Donohoe BS, da Costa Sousa L, Elder T, Agarwal UP, Lu F, et al. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science* 2011;4:973.
- [259] Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, Dale BE. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology* 2005;96:2014.
- [260] Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI, Dale BE. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied biochemistry and biotechnology* 2005;124:1133.

- [261] Murnen HK, Balan V, Chundawat SPS, Bals B, Sousa LdC, Dale BE. Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to Fermentable Sugars. *Biotechnology Progress* 2007;23:846.
- [262] Balan V, Sousa LC, Chundawat SPS, Marshall D, Sharma LN, Chambliss CK, et al. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*). *Biotechnology progress* 2009;25:365.
- [263] Bals B, Wedding C, Balan V, Sendich E, Dale B. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource technology* 2011;102:1277.
- [264] Zhao X, Cheng K, Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology* 2009;82:815.
- [265] López F, Alfaro A, Jiménez L, Rodríguez A. Alcohols as organic solvents for the obtainment of cellulose pulp. *Afinidad* 2006;63:174.
- [266] Neilson MJ, Shafizadeh F, Aziz S, Sarkanen K. Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 1983;25:609.
- [267] Holtzapple MT, Humphrey AE. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnology and Bioengineering* 1984;26:670.
- [268] Bonn G, Hörmeyer H, Bobleter O. Hydrothermal and organosolv pretreatments of poplar wood and wheat straw for saccharification by a *Trichoderma viride* cellulase. *Wood science and technology* 1987;21:179.
- [269] Brosse N, Sannigrahi P, Ragauskas A. Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2009;48:8328.
- [270] El Hage R, Brosse N, Chrusciel L, Sanchez C, Sannigrahi P, Ragauskas A. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polymer Degradation and Stability* 2009;94:1632.
- [271] Sannigrahi P, Ragauskas AJ, Miller SJ. Lignin structural modifications resulting from ethanol organosolv treatment of loblolly pine. *Energy & Fuels* 2009;24:683.
- [272] Heiss-Blanquet S, Zheng D, Ferreira NL, Lapierre C, Baumberger S. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresour Technol* 2011;102:5938.

- [273] Hallac BB, Ray M, Murphy RJ, Ragauskas AJ. Correlation between anatomical characteristics of ethanol organosolv pretreated *Buddleja davidii* and its enzymatic conversion to glucose. *Biotechnology and Bioengineering* 2010;107:795.
- [274] Lee J, Gwak K, Park J, Park M, Choi D, Kwon M, et al. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL* 2007;45:485.
- [275] Bak JS, Kim MD, Choi IG, Kim KH. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. *New biotechnology* 2010;27:424.
- [276] Dias AA, Freitas GS, Marques GSM, Sampaio A, Fraga IS, Rodrigues MAM, et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource technology* 2010;101:6045.
- [277] Taniguchi M, Suzuki H, Watanabe D, Sakai K, Hoshino K, Tanaka T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of bioscience and bioengineering* 2005;100:637.
- [278] Isroi RM, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Ludquist K, Taherzadeh MJ. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources* 2011;6.
- [279] Camarero S, Bocchini P, Galletti G. Compositional changes of wheat lignin by a fungal peroxidase analyzed by pyrolysis-GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2001;58:413.
- [280] Zeng J, Singh D, Chen S. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. *Bioresource technology* 2010.
- [281] Yu H, Zhang X, Song L, Ke J, Xu C, Du W, et al. Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase. *Journal of bioscience and bioengineering* 2010;110:660.
- [282] Xu C, Ma F, Zhang X, Chen S. Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010.
- [283] Yu J, Zhang J, He J, Liu Z, Yu Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource technology* 2009;100:903.
- [284] Ma F, Yang N, Xu C, Yu H, Wu J, Zhang X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. *Bioresour Technol* 2010;101:9600.

- [285] Gan Q, Allen S, Taylor G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochemical engineering journal* 2002;12:223.
- [286] Gan Q, Allen SJ, Taylor G. Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2005;80:688.
- [287] Alfani F, Albanesi D, Cantarella M, Scardi V, Vetromile A. Kinetics of enzymatic saccharification of cellulose in a flat-membrane reactor. *Biomass* 1982;2:245.
- [288] Henley R, Yang R, Greenfield P. Enzymatic saccharification of cellulose in membrane reactors. *Enzyme and Microbial technology* 1980;2:206.
- [289] Chen S-F, Mowery RA, Scarlata CJ, Chambliss CK. Compositional Analysis of Water-Soluble Materials in Corn Stover. *Journal of agricultural and food chemistry* 2007;55:5912.
- [290] Yang S-J, Kataeva I, Hamilton-Brehm SD, Engle NL, Tschaplinski TJ, Doeppke C, et al. Efficient Degradation of Lignocellulosic Plant Biomass, without Pretreatment, by the Thermophilic Anaerobe “*Anaerocellum thermophilum*” DSM 6725. *Applied and Environmental Microbiology* 2009;75:4762.
- [291] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial technology* 2010;46:170.
- [292] Boukari I, O'Donohue M, Rémond C, Chabbert B. Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2011;72:130.
- [293] Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, Ladisch MR. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial technology* 2011;48:408.
- [294] Tejirian A, Xu F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial technology* 2011;48:239.
- [295] Ximenes E, Kim Y, Felix S, Mosier NS, Ladisch MR. Inhibition of cellulolytic enzymes due to products of hemicellulose hydrolysis. The 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Ladisch. Agricultural Engineering, Purdue University, Potter Engineering Center, 500 Central Drive, West Lafayette, IN 47907-2022; 2010.
- [296] Helle SS, Duff SJB, Cooper DG. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 1993;42:611.

- [297] Gama F, Mota M. Enzymatic hydrolysis of cellulose (II): X-ray photoelectron spectroscopy studies on cellulase adsorption. Effect of the surfactant Tween 85. *Biocatalysis and Biotransformation* 1997;15:237.
- [298] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial technology* 2002;31:353.
- [299] Yang B, Wyman CE. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 2006;94:611.
- [300] Pan X, Xie D, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied biochemistry and biotechnology* 2005;124:1069.
- [301] Berlin A, Gilkes N, Kurabi A, Bura R, Tu M, Kilburn D, et al. Weak lignin-binding enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology* 2005;121:163.
- [302] Wilson DB. Cellulases and biofuels. *Current opinion in biotechnology* 2009;20:295.
- [303] Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou YC, Baker JO, Michener W, et al. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose* 2009;16:699.
- [304] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial technology* 2005;37:175.
- [305] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Maximenko V, Bura R, Markov A, et al. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Springer*; 2006, p. 528.
- [306] Kabel MA, Van der Maarel MJEC, Klip G, Voragen AGJ, Schols HA. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* 2006;93:56.
- [307] Selig MJ, Knoshaug EP, Adney WS, Himmel ME, Decker SR. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresour Technol* 2008;99:4997.
- [308] Gao D, Chundawat SPS, Krishnan C, Balan V, Dale BE. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. *Bioresource technology* 2010;101:2770.
- [309] Gao D, Chundawat SPS, Liu T, Hermanson S, Gowda K, Brumm P, et al. Strategy for identification of novel fungal and bacterial glycosyl hydrolase hybrid mixtures that can efficiently saccharify pretreated lignocellulosic biomass. *BioEnergy Research* 2010;3:67.

- [310] Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Walton JD. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnology for Biofuels* 2010;3.
- [311] Dresbøll DB, Magid J. Structural changes of plant residues during decomposition in a compost environment. *Bioresource Technology* 2006;97:973.
- [312] Kaack K, Schwarz K-U, Brander PE. Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of *Miscanthus* genotypes differing in mechanical properties. *Industrial Crops and Products* 2003;17:131.
- [313] Ververis C, Georghiou K, Christodoulakis N, Santas P, Santas R. Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production. *Industrial Crops and Products* 2004;19:245.
- [314] Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2007;1:119.
- [315] Hartley RD, Ford CW. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. *Plant cell wall polymers, biogenesis and biodegradation* 1989;399:137.
- [316] Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial technology* 2011;48:54.
- [317] Akin DE. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2008;2:288.
- [318] Siqueira G, Milagres A, Carvalho W, Koch G, Ferraz A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnology for Biofuels* 2011;4:7.
- [319] Jeoh T, Ishizawa CI, Davis MF, Himmel ME, Adney WS, Johnson DK. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;98:112.
- [320] Donohoe BS, Selig MJ, Viamajala S, Vinzant TB, Adney WS, Himmel ME. Detecting cellulase penetration into corn stover cell walls by immuno-electron microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;103:480.
- [321] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology* 2010;101:4851.

- [322] Qing Q, Yang B, Wyman CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology* 2010;101:9624.
- [323] Qing Q, Wyman C. Supplementation with xylanase and beta-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels* 2011;4:18.
- [324] Billard H, Faraj A, Lopes Ferreira N, Menir S, Heiss-Blanquet S. Optimization of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Biotechnology for Biofuels* 2012;5:9.
- [325] Hu J, Arantes V, Saddler J. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels* 2011;4:36.
- [326] Sun Y, Cheng JJ. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology* 2005;96:1599.
- [327] Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* 2005;40:3693.
- [328] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, et al. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* 2006;311:484.
- [329] Orts WJ, Holtman KM, Seiber JN. Agricultural Chemistry and Bioenergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:3892.
- [330] Schmer MR, Vogel KP, Mitchell RB, Perrin RK. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:464.
- [331] Tilman D, Hill J, Lehman C. Carbon-Negative Biofuels from Low-Input High-Diversity Grassland Biomass. *Science* 2006;314:1598.
- [332] Anderson E, Arundale R, Maughan M, Oladeinde A, Wycislo A, Voigt T. Growth and agronomy of *Miscanthus × giganteus* for biomass production. *Biofuels* 2011;2:167.
- [333] Henrissat B, Teeri TT, Warren RAJ. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters* 1998;425:352.
- [334] Grohman K, Torge R, Himmel ME. Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Biomass. *Biotech Bioeng Symp* 1985;15:59.
- [335] Grohman K, Bothast R. Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute sulphuric acid and enzymes. *Process Biochemistry* 1997;32:405.

- [336] Kim TH, Lee YY. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresource Technology* 2005;96:2007.
- [337] Anderson W, Akin D. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2008;35:355.
- [338] Wilson JR, Hatfield RD. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research* 1997;48:165.
- [339] Koch G, Kleist G. Application of Scanning UV Microspectrophotometry to Localise Lignins and Phenolic Extractives in Plant Cell Walls. *Holzforschung* 2001;55:563.
- [340] Goto M, Takabe K, Abe I. Histochemistry and UV-microspectrometry of cell walls of untreated and ammonia-treated barley straw. *Canadian Journal of Plant Science* 1998;78:437.
- [341] Yoshinaga A, Wada A, Fujita M, Chabbert B, Pilate G. Modified lignification in the cell walls of CAD depressed poplars. *IAWA Journal* 1997;48:457.
- [342] Iiyama K, Wallis AFA. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Science and Technology* 1988;22:271.
- [343] Lapierre C, Monties B, Rolando C. Thioacidolysis of poplar lignins - Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaicyl-Syringyl lignin fractions. *Holzforschung* 1986;40:113.
- [344] Beaugrand J, Crônier D, Thiebeau P, Schreiber L, Debeire P, Chabbert B. Structure, Chemical Composition, and Xylanase Degradation of External Layers Isolated from Developing Wheat Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:7108.
- [345] Durand H, Soucaille P, Tiraby G. Comparative study of cellulases and hemicellulases from 4 fungi mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium sp* and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme and Microbial Technology* 1984;6:175.
- [346] Goldschmid O. Ultraviolet spectra. K V Sarkanen and CH Ludwig, eds Lignins Occurrence, formation, structure and reactions Wiley-Interscience, New York, NY 1971:241.
- [347] Vidal BC, Dien BS, Ting K, Singh V. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Applied biochemistry and biotechnology* 2011;164:1405.
- [348] Pingali SV, Urban VS, Heller WT, McGaughey J, O'Neill H, Foston M, et al. Breakdown of Cell Wall Nanostructure in Dilute Acid Pretreated Biomass. *Biomacromolecules* 2010;11:2329.

- [349] Kim TH, Nghiem NP, Hicks KB. Pretreatment and Fractionation of Corn Stover by Soaking In Ethanol and Aqueous Ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009;153:171.
- [350] Zeng M, Ximenes E, Ladisch MR, Mosier NS, Vermerris W, Huang C-P, et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: Enzymatic hydrolysis (part 1). *Biotechnology and Bioengineering* 2012;109:390.
- [351] Sannigrahi P, Pu Y, Ragauskas A. Cellulosic biorefineries--unleashing lignin opportunities. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 2010;2:383.
- [352] Lopez S, Murison SD, Travis AJ, Chesson A. Degradability of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated at different developmental stages from a newly extended maize internode. *Acta Botanica Neerlandica* 1993;42:165.
- [353] Zeng M, Ximenes E, Ladisch MR, Mosier NS, Vermerris W, Huang C-P, et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: SEM imaging (part 2). *Biotechnology and Bioengineering* 2012;109:398.
- [354] Beaugrand J, Paës G, Reis D, Takahashi M, Debeire P, O'Donohue M, et al. Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* 2005;222:246.
- [355] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* 1976;72:248.
- [356] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265.
- [357] Laemmli U. Relevant page on gel electrophoresis. *Nature* 1970;227:681.
- [358] Berges T, Bequeret J. Amélioration génétique du champignon filamenteux cellulolytique *Trichoderma reesei*. Développement d'un système de transfert de gènes. Expression de gènes hétérologues codant pour l'invertase. 1991.
- [359] Ståhlberg J, Divne C, Koivula A, Piens K, Claeysens M, Teeri TT, et al. Activity Studies and Crystal Structures of Catalytically Deficient Mutants of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Journal of molecular biology* 1996;264:337.
- [360] Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, Seo J-A, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2004;41:973.

- [361] Shultz MD, Lassig JP, Gooch MG, Evans BR, Woodward J. Palladium-a new inhibitor of cellulase activities. *Biochemical and biophysical research communications* 1995;209:1046.
- [362] Lassig JP, Shultz MD, Gooch MG, Evans BR, Woodward J. Inhibition of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* by palladium. *Archives of biochemistry and biophysics* 1995;322:119.
- [363] Dien BS, Jung H-JG, Vogel KP, Casler MD, Lamb JFS, Iten L, et al. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 2006;30:880.
- [364] Obama P, Ricochon G, Muniglia L, Brosse N. Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: Effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresource Technology* 2012;112:156.
- [365] Keshwani DR, Cheng JJ. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresource Technology* 2009;100:1515.
- [366] Chandra R, Bura R, Mabee W, Berlin A, Pan X, Saddler J. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels* 2007;67.
- [367] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 2009;37:D233.
- [368] Ilmen M, Saloheimo A, Onnela M, Penttilä M. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1298.
- [369] Jalak J, Kurašin M, Teugjas H, Våljamäe P. Endo-exo Synergism in Cellulose Hydrolysis Revisited. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:28802.
- [370] Zhang J, Tang M, Viikari L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresource Technology* 2012;121:8.
- [371] Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen J-C, Brown K, et al. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry* 2010;49:3305.
- [372] Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;97:287.
- [373] Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Bongers M, Walton JD. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology* 2010;101:9097.

- [374] Chir J-L, Wan C-F, Chou C-H, Wu A-T. Hydrolysis of cellulose in synergistic mixtures of β -glucosidase and endo/exocellulase Cel9A from *Thermobifida fusca*. Biotechnology Letters 2011;33:777.
- [375] Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. Proceedings of the National Academy of Sciences 2011;108:15079.
- [376] Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørlie M, et al. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. Science 2010;330:219.
- [377] Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA. Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. ACS Chemical Biology 2011;6:1399.
- [378] Alvira P, Negro MJ, Ballesteros M. Effect of endoxylanase and α -l-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. Bioresource technology 2011;102:4552.
- [379] Gao D, Uppugundla N, Chundawat SPS, Yu X, Hermanson S, Gowda K, et al. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. Biotechnology for Biofuels 2011;4:1.
- [380] Ayriinhac C, Margeot A, Ferreira NL, Ben Chaabane F, Monot F, Ravot G, et al. Improved Saccharification of Wheat Straw for Biofuel Production Using an Engineered Secretome of *Trichoderma reesei*. Org Process Res Dev 2011;15:275.
- [381] M P, P A, A D, WS Y. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. Plant J 1999;20:629.
- [382] Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. Journal of the American Chemical Society 2012.
- [383] Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D, Cherry JR, Meyer AS. Evaluation of Minimal *Trichoderma reesei* Cellulase Mixtures on Differently Pretreated Barley Straw Substrates. Biotechnology Progress 2007;23:1270.
- [384] Benkő Z, Siika-aho M, Viikari L, Réczey K. Evaluation of the role of xyloglucanase in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. Enzyme and Microbial technology 2008;43:109.

- [385] Markov AV, Gusakov AV, Kondratyeva EG, Okunev ON, Bekkarevich AO, Sinitsyn AP. New Effective Method for Analysis of the Component Composition of Enzyme Complexes from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70:657.
- [386] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680.
- [387] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 1987;59:257.
- [388] Kidby DK, Davidson DJ. Convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in nanomole range. *Anal Biochem* 1973;55:321.
- [389] Dence C. The determination of lignin. *Methods in Lignin Chemistry* 1992:33.
- [390] Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
- [391] Kacuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N, Ebringerová A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 2000;43:195.
- [392] Gierlinger N, Goswami L, Schmidt M, Burgert I, Coutand C, Rogge T, et al. In situ FT-IR microscopic study on enzymatic treatment of poplar wood cross-sections. *Biomacromolecules* 2008;9:2194.
- [393] Guo G-L, Chen W-H, Chen W-H, Men L-C, Hwang W-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresource Technology* 2008;99:6046.
- [394] Zeng M, Ximenes E, Ladisch MR, Mosier NS, Vermerris W, Huang C-P, et al. Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: SEM imaging (part 2). *Biotechnology and Bioengineering* 2011:n/a.
- [395] Tranquet O, Saulnier L, Utile J-P, Ralph J, Guillon F. Monoclonal antibodies to p-coumarate. *Phytochemistry* 2009;70:1366.
- [396] Müller M, Hori R, Itoh T, Sugiyama J. X-ray Microbeam and Electron Diffraction Experiments on Developing Xylem Cell Walls. *Biomacromolecules* 2001;3:182.
- [397] Yarbrough JM, Himmel ME, Ding SY. Plant cell wall characterization using scanning probe microscopy techniques. *Biotechnology for Biofuels* 2009;2:17.
- [398] Koo B-W, Min B-C, Gwak K-S, Lee S-M, Choi J-W, Yeo H, et al. Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the effect on enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy* 2012;42:24.

[399] Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z, et al. A Comprehensive Toolkit of Plant Cell Wall Glycan-Directed Monoclonal Antibodies. *Plant Physiology* 2010;153:514.

Etude de la saccharification enzymatique du miscanthus par les cocktails cellulolytiques de *Trichoderma reesei*

Parmi les ressources d'origines agricole et forestière utilisables aujourd'hui en tant que biomasse à destination énergétique, le miscanthus apparait comme l'une des espèces de graminées les plus prometteuses pour la production de bioéthanol de seconde génération grâce à son haut potentiel en biomasse. Ce procédé dit "2G" convertit la cellulose contenue dans ces biomasses lignocellulosiques en bioéthanol et ce *via* un procédé intégrant prétraitement physico-chimique, hydrolyse enzymatique et fermentation. Le principal objectif de ce projet de thèse visait à étudier l'impact de l'hétérogénéité tissulaire et structurale du miscanthus sur sa saccharification et s'est décliné en différents volets liés à l'étude de l'efficacité des prétraitements et à l'analyse des performances de différents cocktails enzymatiques de *Trichoderma reesei*.

L'hydrolyse enzymatique est essentiellement limitée par la structure et la porosité des complexes pariétaux qui réduisent l'accessibilité de la cellulose aux cellulases. En plus des constituants hémicelluloses et lignines qui recouvrent la cellulose, les parois cellulaires du miscanthus sont riches en acides hydroxycinnamiques (*p*CA et FA) qui jouent un rôle important dans la cohésion du réseau pariétal complexe. L'application de prétraitements acide et alcalin sur le miscanthus a ainsi révélé une différence de réactivité en fonction des types cellulaires. Les parois secondaires du sclérenchyme sont plus facilement dégradées par les cellulases fongiques après prétraitement acide. L'étude de la distribution des composés phénoliques au niveau cellulaire par micro spectrophotométrie UV a rapporté une nette diminution de l'absorbance UV dans tous les tissus après chaque prétraitement. Ceci n'expliquant pas totalement les différences de réactivité observées, d'autres facteurs physicochimiques seraient donc impliqués. Une approche visant à évaluer la progression des cellulases au sein des parois par immunocytochimie a également été initiée mais elle s'est heurtée à des problématiques techniques liées à la nature des tissus et aux anticorps employés.

Les performances en terme de conversion de la cellulose ont été évaluées avec des cocktails enzymatiques de *T. reesei* comprenant des activités (hemi-)cellulolytiques variables. Une meilleure efficacité du prétraitement par explosion à la vapeur a ainsi pu être montrée par réduction de la quantité d'enzymes mises en œuvre. Comme c'est le cas pour d'autres graminées, ces travaux ont permis de confirmer le rôle crucial de l'enzyme β -glucosidase, permettant de limiter l'inhibition par le cellobiose et améliorant la cinétique initiale de saccharification. L'amélioration du rendement d'hydrolyse par l'utilisation d'un sécrétome comprenant une bonne activité hémicellulolytique a pu être ensuite démontrée. L'utilisation de cocktails enzymatiques reconstitués à partir d'enzymes pures a enfin permis de définir un mélange "optimal" composé des quatre principales cellulases de *T. reesei* (CBH1, CBH2, EG1 et EG2) associées à une hémicellulase (XYN1).

Mots clés : Cellulase, β -glucosidase, xylanase, *Trichoderma reesei*, miscanthus, lignine, acides hydroxycinnamiques, saccharification.

Enzymatic saccharification of miscanthus using *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes cocktails

Among agricultural and forest resources, the grass specie miscanthus has emerged as one of the most promising feedstock candidates for 2G-biofuel production due to its high biomass yield. The biofuels 2G-production process is based on cellulose conversion into bioethanol *via* physicochemical pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. The main objective of this Ph.D. project was to evaluate the effect of tissue and structure heterogeneity of miscanthus on its saccharification by evaluating pretreatment efficiency and analyzing the performance of different *Trichoderma reesei* cellulolytic cocktails.

Enzymatic hydrolysis is mainly hindered by cell wall structure and porosity which limit cellulose accessibility to cellulase. In addition to hemicelluloses and lignin polymers, miscanthus cell walls, contain high amounts of hydroxycinnamic acids (*p*CA and FA) that play a significant role in cross-linking polymers into cohesive network. Applying acid and alkali pretreatments on miscanthus revealed a distinctive reactivity depending on cell types. Secondary cell walls of sclerenchyma appeared more digested by fungal cellulases after acid pretreatment. Addressing phenolics distribution (lignin and hydroxycinnamic acids) at cell level by UV micro spectrophotometry highlighted a significant decrease in UV absorbance after both pretreatments irrespective to cell type indicating that other physicochemical and structural features are involved in distinct cell wall reactivity. We have also attempted to evaluate cellulase progression into miscanthus cell walls by immunocytochemistry but we have had many technical problems due to the nature of miscanthus tissues and used antibodies.

Cellulose conversion ability was then evaluated using enzymatic cocktails of *T. reesei* which vary in their (hemi-)cellulolytic activities. Higher efficiency of the steam explosion pretreatment was demonstrated by reducing enzymes loading. As reported previously on other grasses, β -glucosidase plays a crucial role by limiting the inhibiting effect of cellobiose and improving the initial saccharification step. We furthermore showed that the use of hemicellulases-improved cocktails allowed significant increase in saccharification yields. We finally identified an optimal reconstituted enzyme mixture composed of four major cellulases of *T. reesei* (CBH1, CBH2, EG1 and EG2) and the hemicellulase XYN-1.

Key word: cellulase, β -glucosidase, xylanase, *Trichoderma reesei*, miscanthus, lignin, hydroxycinnamic acids, saccharification