

**INRA**

Institut National de la Recherche Agronomique



**UNIVERSITÉ  
DE REIMS  
CHAMPAGNE-ARDENNE**

## **UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

### **THÈSE DE DOCTORAT**

**Spécialité: Physico-Chimie**

**Etude de la lignification de parois végétales de graminées par des assemblages modèles: Réactivité, organisation et structure supramoléculaire**

**Par**

**Abdellatif BARAKAT**

Soutenue le 27 Mars 2007 devant le Jury composé de:

<b>Mr M. LAHAYE, Directeur de recherche INRA, Nantes</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr S. HAWKINS, Professeur USTL, Lille</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr D. LAIREZ, Ingénieur de recherche CEA, Saclay.</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Mr J-L. PUTAUX, Chargé de recherche CNRS, Grenoble.</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Mr R. DOUILLARD, Directeur de recherche INRA, Reims.</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mme B. CHABBERT, Chargée de recherche INRA, Reims.</b>	<b>Co-directrice de thèse</b>
<b>Mr B. CATHALA, Directeur de recherche INRA, Nantes.</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>

**Laboratoire INRA-UMR-614 Fractionnement des AgroRessources et Emballage, Reims**



# *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Roger DOUILLARD, directeur du laboratoire de m'avoir accueilli au sein de l'UMR FARE. Je le remercie également d'avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour sa sympathie à mon égard.

J'adresse mille remerciements à Brigitte CHABBERT et Bernard CATHALA qui ont encadré ce travail sans relâche. Je les remercie infiniment pour l'aide scientifique qu'ils ont su m'apporter tout au long de ces trois années et pour m'avoir ouvert au monde de la recherche, mais aussi pour leur patience, leur disponibilité, leur soutien, leur encouragement et leurs nombreuses relectures de mon manuscrit... Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Bernard CATHALA pour m'avoir transmis sa vision de physico-chimiste sur des phénomènes biologiques complexes...

Je remercie vivement Marc LAHAYE et Simon HAWKINS, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail ainsi que Didier LAIREZ, Jean Luc PUTAUX et Roger DOUILLARD pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie très sincèrement Didier LAIREZ, Directeur de recherche CEA/CNRS à Saclay de m'avoir accueilli dans son laboratoire et initié aux techniques de diffusion de la lumière et des neutrons aux petits angles malgré son emploi du temps chargé ; je le remercie pour sa sympathie, ses conseils et l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je tiens à remercier vivement Jean Luc PUTAUX pour sa contribution dans les observations en Microscopie Electronique à Transmission. Je suis reconnaissant à Jean Luc pour ces discussions, sa disponibilité, sa sympathie et l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Bodo SAAKE et Heiko WINTER, pour leur participation active à la réalisation de ce travail. Je les remercie pour leur sympathie et leur disponibilité.

Je tiens à présenter mes remerciements les plus chaleureux à Luc SAULNIER de m'avoir accueilli deux semaines dans son laboratoire à l'INRA de Nantes afin de purifier des arabinoxylanes destinés à cette étude. Je le remercie pour son aide, sa gentillesse, ses conseils et l'intérêt qu'il a apporté à mes travaux.

Je remercie très sincèrement Corinne RONDEAU-MOURO pour sa disponibilité et son investissement dans les caractérisations par RMN à l'INRA de Nantes.

Je remercie aussi tous les membres de mon comité de thèse notamment Catherine LAPIERRE, Danièle REIS, pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Un grand merci à mes ami(e)s, à NANTES, à REIMS, au MAROC et en ITALIE. Un grand merci à tous les chercheurs, les techniciens, les post-docs, les thésards, les stagiaires et d'autres, que j'ai rencontré durant ces trois années à Reims et ailleurs, merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez témoigné ainsi que pour votre aide.

Je tiens à remercier ma famille, en particulier ma femme, mon père et ma mère qui m'ont donné la force et le courage de continuer sur ce chemin.



# *Remerciements*

*Je dédie ce travail à ma petite famille, ma femme ASMAA et mon fils NASSIM.*

*À ma grande famille*

*Mon père, ma mère, MUSTAPHA, ABDELGHANI, KALID, SALAH et ma sœur NOURA*

*À toute ma famille au Maroc...*



***Avant propos***

**Nom et Prénom de l'auteur:**

BARAKAT Abdellatif

[barakat40@hotmail.com](mailto:barakat40@hotmail.com)

[abdellatif.barakat@reims.inra.fr](mailto:abdellatif.barakat@reims.inra.fr)

Ce travail a été réalisé au laboratoire INRA, UMR-614 Fractionnement de Agroressources et Emballages, Reims, et a été effectué grâce à un financement INRA /Région Champagne Ardenne.

**Publications**

- [1] A. Barakat, J-L. Putaux, L. Saulnier, B. Chabbert, B. Cathala. **Characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers = synthetic lignin polymers) nanoparticles** (Biomacromolecules, accepté).
- [2] A. Barakat, B. Chabbert and B. Cathala. **Impact of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds** (soumis à Phytochemistry).
- [3] A. Barakat, H. Winter, C. Rondeau-Mouro, B. Saake, B. Chabbert and B. Cathala. **Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation** (Planta, accepté).
- [4] H. Winter, A. Barakat, B. Cathala and B. Saake. **Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation.** *Macromolecular Symposium*. 2006, 232, 74–84.

**Communications orales**

- [1] A. Barakat, J. L. Putaux, D. Lairez, L. Saulnier, B. Chabbert, B. Cathala. **Formation and Morphology of heteroxylan -DHP (Dehydrogenation Polymers = Lignin Model Compounds)**



**Nanoparticles.** *The 3rd International Congress of Nanotechnology (ICNT 2006) October 30-November 2, 2006, San Francisco USA.*

[2] A. Barakat, H. Winter, B. Saake, D. Lairez, B. Chabbert and B. Cathala. **Dégradation par une xylanase d'un complexe lignine de synthèse/glucuronoarabinoxylane: Caractérisation de l'organisation supramoléculaire.** *Journées du Réseau Français des Parois (RFP), 5-7 September 2005, Rouen France.*

[3]A. Barakat, B. Chabbert and B. Cathala. **Polymérisation de l'alcool coniférylique en présence d'arabinoxylanes: une étude modèle de la lignification des parois végétales de graminées.** *Journées du GDR AMV (Groupement de Recherche INRA/CNRS sur l'Assemblage des Molécules Végétales), 2-4 December 2004, Draveil France.*

### **Communications par affiches**

[1] A. Barakat, H. Winter, C. Rondeau-Mouro, B. Saake, B. Chabbert and B. Cathala. **A model study of lignin carbohydrate complex formation.** *Gordon Research Conference on PLANT CELL WALLS 29 July-04 August 2006, University of New England, BIDDEFORD, ME. USA.*

[2] A. Barakat, J.L. Putaux, L. Saulnier, B. Chabbert, B. Cathala. **Synthesis and characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers = lignin model compounds) nanoparticles.** *Nanobioeurope, 14-16 Mai 2006, Grenoble, France*

[3] H. Winter, A. Barakat, B. Cathala and B. Saake. **Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation.** *ZELLCHEMING 2005, 27-30 June.2005, Wiesbaden, Allemagne.*

[4] H. Winter, A. Barakat, B. Cathala and B. Saake. **Sorption of arabinoxylan on bacterial cellulose.** *European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE), 05-08 April, 2006, Institute of Chemical Fibres, Lodz, Poland.*

---



## ***Liste des figures***

### **Introduction générale**

**Figure 1 :** A) Modèle d'association des polymères de la paroi végétale lignifiée. B) Représentation schématique d'une paroi végétale montrant ces différents niveaux d'organisation (**p 2**)

**Figure 2 :** Ensemble d'évènements impliqués dans la mise en place de la cellulose dans la paroi. (**p 4**).

### **Synthèse bibliographique**

**Figure 3 :** Structure chimique d'arabinoxylane (**p 10**).

**Figure 4:** Structure chimique des acides férulique (FA) et p-coumarique (pCA) (**page 12**).

**Figure 5 :** Mécanisme d'oxydation de l'acide férulique (FA) formation des dimères de l'acide férulique (di-FA) (**p 12**)

**Figure 6 :** Réticulation des arabinoxylanes entre eux et avec la lignine (**p 13**)

**Figure 7 :** Schéma de la biosynthèse des lignines (**p 14**)

**Figure 8 :** Schéma de la polymérisation radicalaire des monomères (**p 16**).

**Figure 9 :** Exemple de liaisons inter-monomères au sein des lignines A) condensées B) labiles ou non condensées (R = H ou OCH<sub>3</sub>) (**p 18**).

**Figure 10 :** Structure chimique d'un modèle de lignine. A) Graminées (Sun *et al.*, 1997) et B) Gymnospermes (Alder, 1977) (**p 19**).

---



**Figure 11 :** Représentation schématique de la biosynthèse des parois lignifiées (d'après Terashima et Fukushima, 1993) (**p 21**).

**Figure 12 :** Relation entre le dépôt des polymères pariétaux et la formation de la structure hétérogène de la lignine chez les graminées (d'après Terashima et Fukushima, 1993) (**p 22**).

**Figure 13 :** Mécanisme de formation des liaisons benzyle éther et ester entre la lignine et les hémicelluloses selon un « mécanisme nucléophile » *via* la méthylène quinone (MQ) (**p 26**).

**Figure 14 :** Représentation schématique des liaisons ester et éther entre les arabinoxylanes et la lignine (**p 27**).

**Figure 15 :** Couplage entre la lignine et les hémicelluloses selon un « mécanisme oxydatif » *via* l'acide férulique (**page 29**).

**Figure 16 :** Mécanisme de formation des dimères de l'alcool coniférylique (**p 37**)

## **Discussion générale**

**Figure 17 :** De la chimie moléculaire à la chimie supramoléculaire (**p 121**).

**Figure 18 :** Représentation schématique de la réticulation des xylanes avec la lignine selon un mécanisme oxydatif *via* l'acide férulique (FA) (**p 125**).

**Figure 19 :** Représentation schématique de la réticulation des xylanes avec la lignine selon un mécanisme nucléophile *via* le méthylène quinone (MQ) (**p 125**).

## **ANNEXE**

**Figure 20 :** Principe de diffusion de rayonnement (**p 132**)

**Figure 21 :** Schéma d'un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles (**p 135**).

---



**Figure 22** : Principe de diffusion de neutrons aux petits angles (**p 136**)

**Figure 23** : Principe de diffusion d'une onde de neutrons monochromatique (**p 137**)

## ***Liste des tableaux***

### **Synthèse bibliographique**

**Tableau 1:** Unités et monomères de lignine (**p 15**)

**Tableau 2:** Distribution molaire des monomères H/G/S issus de la dégradation par thioacidolyse de parois de différentes origines végétales (**p 20**).

### **Discussion générale**

**Tableau 3:** Récapitulatif des différents paramètres structuraux déterminés par DL, MET et CES-DLMA pour les différents échantillons : HX90-DHP-G, HX90-DHP-GS, HX40-DHP-G et HX40-DHP-GS (**p 129**).

### **ANNEXE**

**Tableau 4:** Longueurs de diffusion de neutrons (**p 138**)



## Liste des abréviations

**AX:** arabinoxylane

**HX:** hétéroxylane

**FA:** acide férulique

**di-FA :** dimère d'acide férulique

**ti-FA:** trimère d'acide férulique

**pCA:** acide p-coumarique

**AC:** alcool coniférylique

**DHP:** DeHydrogenation Polymers (modèle de lignine)

**H :** précurseur de lignine Hydroxyphényle

**G:** précurseur de lignine Gaïacyle

**S:** précurseur de lignine Syringyle

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyde d'hydrogène

**MQ :** méthylène quinone

**LCCs :** lignin-carbohydrate complexes

**CES-DLMA :** Chromatographie d'Exclusion Stérique couplé à la Diffusion de Lumière Multi-Angle.

**MET:** Microscopie Electronique à Transmission.

**DL:** Diffusion de la Lumière

**DNPA:** Diffusion de Neutrons aux Petits Angles.



# Sommaire



# Sommaire

---

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>I Généralités</b>	<b>1</b>
<b>II La paroi végétale</b>	<b>2</b>
<b>III Objectifs du travail</b>	<b>5</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>7</b>
<b>I Constituants de la paroi</b>	<b>7</b>
<b>I .1 La cellulose</b>	<b>7</b>
<b>I .2 Les pectines</b>	<b>7</b>
<b>I .3 Les hémicelluloses</b>	<b>8</b>
I .3.1 Les xyloglucanes	8
I .3.2 Les (1→4)(1→3) $\beta$ -glucanes	9
I .3.3 Les mannanes	9
I .3.4 Les xylanes	9
<b>I .4 Les acides phénoliques</b>	<b>11</b>
<b>I .5 La lignine</b>	<b>14</b>
I .5.1 La biosynthèse de la lignine	14
I .5.2 La polymérisation des monomères de lignine	15
I .5.3 La variabilité structurale des lignines	17
<b>II La mise en place de la paroi</b>	<b>20</b>
<b>III Interaction lignine-polyosides</b>	<b>25</b>
<b>III .1 Interactions covalentes <i>via</i> la méthylène quinone</b>	<b>25</b>
<b>III .2 Interactions covalentes <i>via</i> les acides phénoliques</b>	<b>27</b>
<b>IV Modèles chimiques des parois végétales lignifiées</b>	<b>30</b>
<b>IV .1 Synthèse des DHPs (DeHydrogenative Polymers = modèle de lignine)</b>	<b>30</b>
<b>IV .2 Paramètres réactionnels affectant la structure des DHPs</b>	<b>30</b>
<b>IV .3 Modélisation des interactions Lignine/Polyosides</b>	<b>32</b>
IV .3.1 Effet sur la structure chimique	36
IV .3.2 Effet sur les particularités macromoléculaires	38
IV .3.3 Effet sur l'ultrastructure	38

---



---

**CHAPITRE n°1****41**

---

**Publication n°1**

**Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation**

---

**CHAPITRE n°2****59**

---

**Publication n°2**

**Impact of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds.**

ABSTRACT	60
ABBREVIATION	60
GRAPHICAL ABSTRACT	61
INTRODUCTION	62
RESULTS AND DISCUSSION	66
EXPERIMENTS	76
REFERENCES	88

---

**CHAPITRE n°3****83**

---

**Publication n°3**

**Characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers = lignin model compounds) nanoparticles.**



---

**CHAPITRE n°4** **95**

---

**Publication n°4**

**Synthèse et caractérisation de nanoparticules DHP-Hétéroxylane:  
Diffusion de la lumière et des neutrons aux petits angles.**

INTRODUCTION	96
MATERIELS ET METHODES	98
RESULTATS	103
DISCUSSION	116
ABBREVIATION	118
REFERENCES	119

---

**DISCUSSION GENERALE** **121**

---

---

**ANNEXE** **132**

---

-Brève introduction à la diffusion de rayonnement	132
-Brève introduction à la diffusion des neutrons aux petits angles	135
-Publication: Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation	143

---

**BIBLIOGRAPHIE** **155**

---



# Introduction générale



### **I. Généralités**

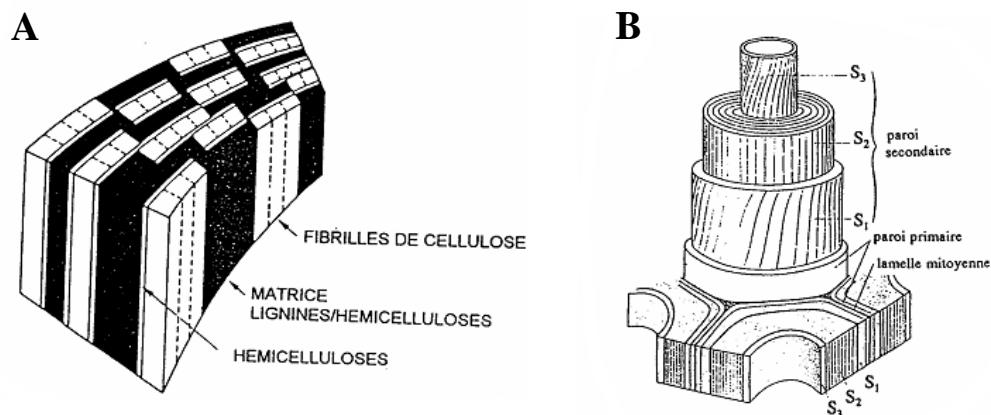
La biomasse lignocellulosique est utilisée dans de nombreux domaines: production de biopolymères (utilisation pharmaceutiques, médicale,...), d'énergie et la transformation des matériaux lignocellulosiques (panneaux composites, pâtes à papier et produits papetiers). Parmi les diverses productions agricoles, les graminées constituent une source importante pour l'alimentation humaine (céréales) et animale (nourriture des herbivores producteurs de viande) mais sont également utilisées dans le domaine non alimentaire (matériaux, papier, bioéthanol,...). Cependant, une grande part de la biomasse des graminées est peu valorisée. L'amélioration des procédés de transformation suppose une meilleure connaissance de la structure de la matière première.

La structure chimique des parois de graminées, moins étudiée que celle du bois présente des caractéristiques distinctes. En effet, la teneur en lignine des parois cellulaires de graminées est plus faible que celle des bois de gymnospermes et d'angiospermes, mais par contre la structure chimique de ces lignines est beaucoup plus complexe<sup>[1-3]</sup>. De plus, les hémicelluloses de graminées sont réticulées avec la lignine par l'intermédiaire des acides phénoliques (acide férulique et p-coumarique), ce qui conduit à la mise en place d'une structure ternaire lignine-acides phénoliques-hémicellulose<sup>[4,5]</sup>. Ces complexes limiteraient la déstructuration des composés pariétaux<sup>[6]</sup>. L'étude des propriétés associatives de ces polymères et de leur assemblage supramoléculaire est susceptible de fournir des éléments déterminants pour la compréhension de la structure et des propriétés de la paroi et par conséquent la bioconversion des ressources lignocellulosiques.

### II. La paroi végétale

La paroi végétale est une structure extracellulaire organisée et complexe, semi rigide et dynamique qui enveloppe la membrane cytoplasmique des cellules végétales. Parmi des nombreuses fonctions, elle joue un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques des organes, participe à la croissance des tissus et assure un rôle de barrière qui permet aux cellules de résister à la pression osmotique et aux attaques des pathogènes.

La paroi végétale est un composite pluristratifié hiérarchisé composé d'un assemblage de divers polyosides (cellulose, hémicelluloses et pectines) imprégnés de composés phénoliques dont les lignines<sup>[7,8]</sup> (Figure 1A) sans exclure l'intervention de certaines protéines<sup>[9]</sup>. La nature et les proportions relatives de ces différents polymères varient selon la plante considérée et son développement<sup>[10]</sup>.



**Figure 1 :** A) Modèle d'association des polymères de la paroi végétale lignifiée. B) Représentation schématique d'une paroi végétale montrant ces différents niveaux d'organisation,

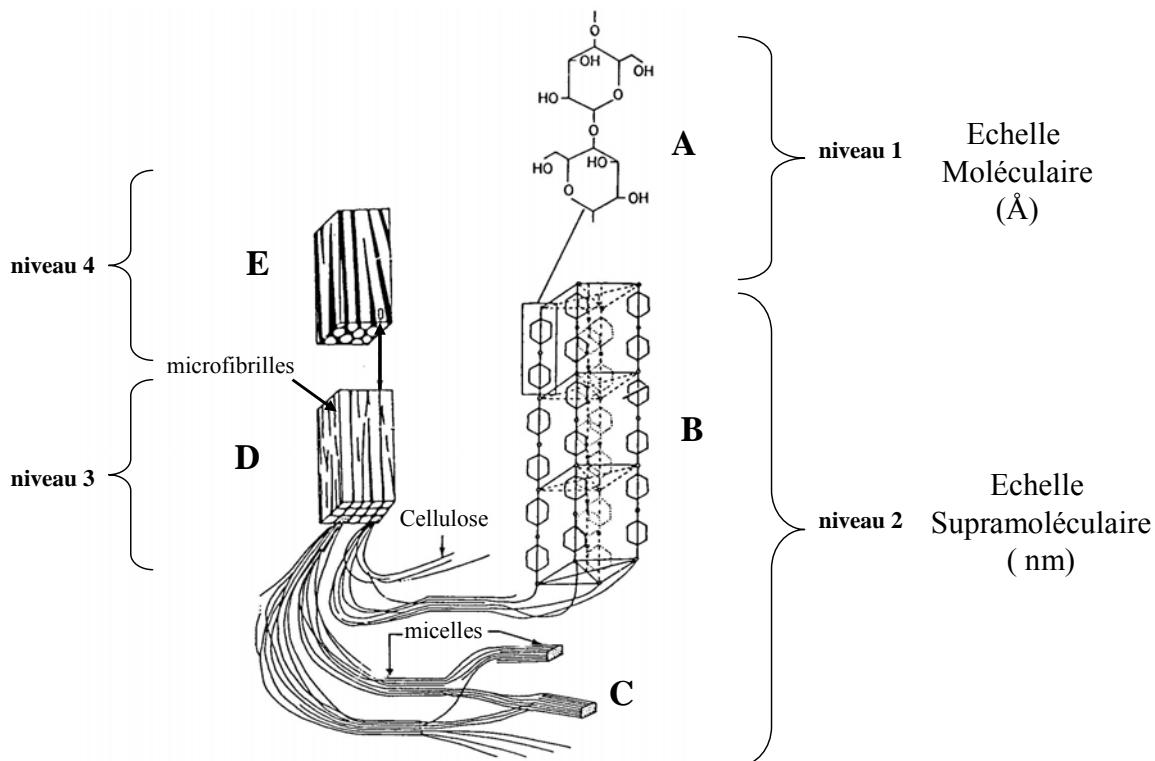
Ces polymères organisés en trois couches hétérogènes et dynamiques évoluent en fonction du type et de la physiologie des cellules. On distingue, la lamelle mitoyenne, la paroi

## **Introduction générale**

---

primaire et la paroi secondaire (Figure 1B). Ces régions pariétales présentent des compositions chimiques et des organisations supramoléculaires distinctes correspondant à des stades successifs de maturation<sup>[9,11]</sup>. En conséquence, la formation de la paroi est un ensemble de processus soumis à la fois à des contraintes biosynthétiques (disponibilité des enzymes par exemple) mais également à des contraintes physico-chimiques (gradient de concentration, gradient de macromolécules, variabilité structurale des polymères etc....). La prise en compte des caractéristiques physicochimiques des réseaux pariétaux est indispensable à la compréhension de la formation et l'architecture de la paroi végétale et par conséquence leurs propriétés ultérieures (aptitude au fractionnement, porosité, etc....).

La possibilité de construction d'un ensemble macromoléculaire est définie par des associations intra- et intermoléculaires. S'il on prend l'exemple des microfibrilles de celluloses, on peut définir plusieurs niveaux de mise en place dans la paroi: les monomères de glucose se polymérisent en des chaînes de glucose qui s'allongent par des liaisons osidiques, ces chaînes de glucose s'associent essentiellement par des liaisons d'hydrogène, formant les microfibrilles de cellulose. Les microfibrilles se groupent en macrofibrilles qui s'incorporent dans la paroi (Figure 2). Si ce schéma est évident dans le cas de la cellulose, il est beaucoup moins simple dans le cas de la matrice lignocellulosique, car toutes ses fonctionnalités (support mécanique, cohésion, susceptibilité aux dégradations chimiques et enzymatiques) ne sont pas encore complètement comprises. Une meilleure approche des fondements des ses fonctionnalités consiste à prendre en compte les processus d'assemblage de cette matrice et de caractériser l'organisation supramoléculaire qui en découle. Ces deux paramètres (processus d'assemblage et organisation finale), sont une clé essentielle pour une meilleure maîtrise du désassemblage des composés pariétaux et par conséquence leurs utilisations dans les différents processus d'application.



**Figure 2 :** Ensemble d'évènements impliqués par la mise en place de la cellulose dans la paroi. **A** : cellobiose unité de base de la cellulose constituée de deux glucose liés en  $\beta(1 \rightarrow 4)$  par une liaison glycosidiques ; **B** : chaîne de cellulose ; **C** : structure de microfibrilles, assemblage de molécules de cellulose ; **D** : fragment de macrofibrilles montrant les microfibrilles ; **E** : fragment de la couche pariétale montrant des microfibrilles de cellulose (blanc) et une matrice de hémicellulose /lignine (noir) (d'après Esau, 1977)<sup>[12]</sup>.

Mon étude a consisté à identifier et comprendre certains phénomènes reliant la structure chimique des polymères élémentaires (type de monomères de lignines, structures des polyosides,...), leur réactivité au cours des processus d'assemblage et finalement l'organisation finale de ces assemblages supramoléculaires. Par analogie à l'exemple de la cellulose cité plus haut, mon travail se situe entre l'échelle moléculaire (niveau 1) et l'échelle supramoléculaire (niveau 2).

Une des particularités importantes des lignines réside dans l'étape finale de formation du polymère. En effet, le processus de polymérisation déhydrogénative est initié enzymatiquement mais se déroule ensuite selon un processus chimique. En conséquence d'une part ce processus est sensible aux conditions de milieux, mais également de pouvoir être reproduits de façon simple *in vitro*. Même insatisfaisantes, les approches modèles de la lignification ont été largement utilisées par le passé et ont permis une meilleure compréhension de la lignification. En effet, en simplifiant le système d'étude, ces approches permettent de déconnecter certains phénomènes liés *in vivo*. Ils ont pour avantage d'autoriser de nombreuses conditions techniques expérimentales inaccessibles dans le monde biologique. C'est pourquoi, l'ensemble de mes travaux a été abordé par le biais d'approches modèles.

Au début de cette étude, nous avons commencé à développer des modèles ternaires à base de la cellulose bactérienne à savoir le composite cellulose/xylane/lignine, ces travaux ont abouti à une publication sur les propriétés de sorption des xyloses (**Annexes**). Toutefois, compte tenu de la difficulté à maîtriser l'hétérogénéité de ces dispositifs, nous avons focalisé notre étude par la suite sur des modèles binaires en solution à savoir xylane/lignine.

### **III. Objectifs du travail**

L'objectif de ce travail est donc de relier des structures chimiques à des organisations supramoléculaires au moyen de structure modèles en vue de comprendre des phénomènes physico-chimiques non accessibles par des approches biologiques ou biochimiques. Dans ce contexte, nous avons focalisé notre approche sur l'étude de la réaction de polymérisation de lignine en présence d'hétéroxylanes (hémicelluloses majoritaire de graminées) afin de modéliser la mise en place des parois végétales de graminées. Nous n'avons pas cherché à décrire en priorité la structure fine de complexes lignine-polyosides, mais plutôt à obtenir des informations relatives à la réactivité des monolignols dans ces milieux complexes et aux

propriétés associatives de ces polymères. Nous avons ainsi abordé deux grands volets, se déclinant chacun en deux sous-chapitres. Ces parties formeront les quatre chapitres résultats de ma thèse et seront précédées par une synthèse bibliographique:

### **Réactivité des monolignols en présence d'arabinoxylanes:**

Nous avons étudié la réactivité des monolignols en examinant d'une part l'effet des complexes xylanes/DHPs sur la formation de liens covalents entre les polyosides et les lignines modèles (Chapitre n°1).

La majorité des études modèles a été réalisée en milieu dilué alors que la paroi est à l'évidence un milieu dense. C'est pourquoi dans le deuxième chapitre, j'ai abordé les modifications structurales (et donc la réactivité associée) provoquées par une densification du milieu de polymérisation des lignines modèles (Chapitre n°2).

### **Organisation supramoléculaire de complexes arabinoxylanes/lignines modèles:**

Nous avons étudié par différentes techniques l'organisation supramoléculaire de complexes arabinoxylanes/lignine modèles. Les hétéroxylanes (HX) étudiés varient entre eux structuralement par la quantité d'acides phénoliques, présents une caractéristique majeure des graminées.

-Dans une première partie la morphologie des complexes a été étudiée par microscopie électronique à transmission et leur formation a été suivie par chromatographie d'exclusion stérique couplée à un détecteur de diffusion de lumière (Chapitre n°3).

-Le second chapitre de cette partie explore la structure interne des complexes par diffusion de la lumière statique et dynamique et surtout par diffusion des neutrons aux petits angles utilisant une approche de contraste isotopique permettant de distinguer les deux partenaires au sein du complexe (Chapitre n°4).

# Synthèse bibliographique



### I. Constituants de la paroi

#### I.1. La cellulose

La cellulose est un homopolymère linéaire formé d'unités D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons de type glycosidique  $\beta$ -(1→4). Le cellobiose (dimère de glucose) est le motif répétitif de la cellulose<sup>[13]</sup>. Cette conformation explique la linéarité de la molécule qui se trouve stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires et intramoléculaires. Le nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose, appelé degré de polymérisation DP, dépend de l'origine et du traitement subi par la cellulose au cours de sa purification. Le DP de la cellulose dans les parois secondaires varie entre 13000 et 14000, alors que dans les parois primaires le DP est plus faible et varie entre 2000 et 6000<sup>[14]</sup>. Les microfibrilles de cellulose correspondent à des assemblages entre les chaînes  $\beta$ -(1→4) D-glucanes par formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires<sup>[13]</sup>. Ce réseau permet de maintenir ensemble les molécules et favorise l'établissement d'un état solide ordonné. Le cœur de ces microfibrilles est très cristallin tandis que les chaînes de surface constituent les zones dites amorphes<sup>[15]</sup>. On distingue plusieurs types de cellulose. La cellulose native<sup>[15]</sup> (nommée cellulose I) est constituée de deux phases cristallines: les allomorphes I $\alpha$  et I $\beta$  dont les proportions varient selon l'origine de la cellulose<sup>[16-18]</sup>. Les autres allomorphes de cellulose sont obtenus par traitements chimiques ou thermiques de la cellulose I<sup>[15,19]</sup>.

#### I.2. Les pectines

Les pectines ont pour structure de base un enchaînement linéaire d'unités acide D-galacturonique, qui peut être interrompu par des enchaînements alternés de résidus rhamnose et acide D-galacturonique (rhamnogalacturonanes). Ces derniers enchaînements peuvent être ramifiés par des chaînes latérales riches en unité arabinose et galactose (arabinanes,

galactanes et arabinogalactanes)<sup>[20-22]</sup>. Les pectines sont localisées principalement dans la paroi primaire et la lamelle mitoyenne des plantes vasculaires. Ce sont les composants principaux des parois primaires des dicotylédones ; les pectines sont présentes en quantités moindres dans les parois des monocotylédones, en particulier des graminées<sup>[8]</sup>.

### I.3. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polyosides amorphes, constitués de sucres neutres (xylose, arabinose, galactose, mannose) et d'acides uroniques. On distingue plusieurs types de composés dont la structure varie selon l'origine, le tissu, le type cellulaire et selon le stade de maturité des tissus.

#### I.3.1. Les xyloglucanes

Les xyloglucanes sont constitués d'une chaîne linéaire de monomères de D-glucose liés en  $\beta$  (1→4) et substitués par des unités de xylose dont certaines peuvent être prolongées par du galactose et du fucose. Les proportions des différents constituants et le degré de substitution peuvent varier donnant lieu à différents xyloglucanes<sup>[23]</sup>. Les liaisons  $\beta$ -(1→4) rigidifient la molécule et lui permettent de se lier aux microfibrilles de cellulose par de nombreuses liaisons hydrogène<sup>[24,25]</sup>. Les xyloglucanes sont les principales hémicelluloses de la paroi primaire des dicotylédones. Ils sont également présents en plus faible quantité dans les parois des monocotylédones et se distinguent par leur degré de ramification plus important<sup>[26]</sup>.

### I.3.2. Les (1→4) (1→3)- $\beta$ -glucanes

Les (1→4) (1→3)- $\beta$ -glucanes contiennent en moyenne 30% de liaisons  $\beta$ -(1→3) et 70% de  $\beta$ -(1→4) et ne sont pas ramifiés. Les chaînes sont constituées d'une répétition d'un motif de base de 3 à 4 glucanes lié en  $\beta$ -(1→4) séparé par des liaisons  $\beta$ -(1→3) isolées altérant la rigidité de la chaîne. Ces glucanes se trouvent principalement dans les parois primaires des graminées<sup>[8,22]</sup>.

### I.3.3. Les mannanes

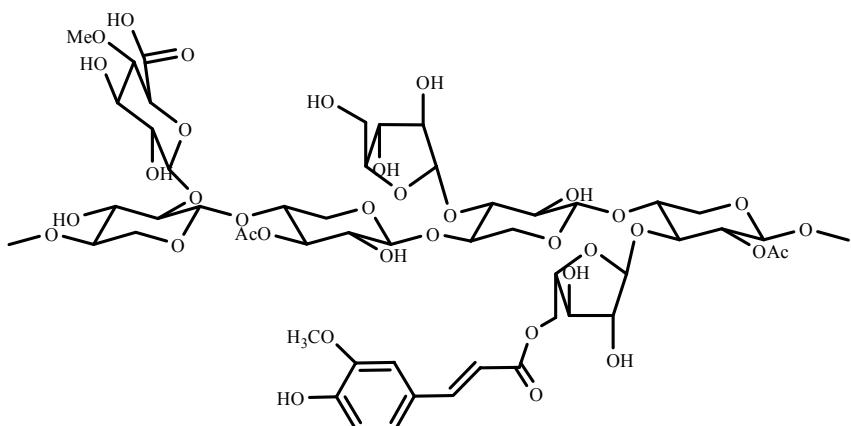
Les mannanes regroupent les glucomannanes et des galactoglucomannanes. La chaîne principale est constituée d'unités mannose et glucose liées en  $\beta$  (1→4). Les chaînes peuvent être également ramifiées par des unités de galactose. Ces hémicelluloses sont surtout retrouvées dans les parois de gymnospermes. Chez les angiospermes, les mannanes sont absents (graminées) ou faiblement représentés<sup>[8,26]</sup>.

### I.3.4. Les xylanes

Ces polymères osidiques sont constitués d'une structure linéaire, le plus souvent ramifiée par des segments courts et dispersés. Les xylanes sont constitués de sucres neutres (xylose, arabinose, galactose, glucose, mannose) et d'acides uroniques (acide glucuronique et acide-4-O-méthyl-glucuronique). La variabilité de ces composés selon l'origine, le tissu ou le type cellulaire et selon le stade de maturité des tissus, génère une grande diversité structurale<sup>[27-30]</sup>. On distingue parmi les différents types de xylanes, les arabinoxylanes, hémicelluloses majoritaires des parois végétales de graminées.

Les arabinoxylanes sont des chaînes d'unités de D-xylose liées en  $\beta$  (1→4), substituées par des unités de L-arabinose liées en O-3 et/ou O-2 des résidus D-xylose de la chaîne

principale (Figure 3). Ils peuvent porter des substituants tels que l'acide D-glucuronique et l'acide 4-O-méthyl glucuronique liée en O-2 au D-xylose. Les arabinoxylanes peuvent être estérifiés sur la position O-5 des unités d'arabinose par l'acide férulique et l'acide p-coumarique (Figure 3). Certains arabinoxylanes sont substitués irrégulièrement par des groupements acétyles en position O-2 et O-3 des résidus D-xylosyl<sup>[31,32]</sup>. Lors de leur isolement par des solutions alcalines, les arabinoxylanes sont désacétylés, et les acides phénoliques estérifiant les substituants arabinose sont libérés. Des résidus D-galactose et D-glucose sont également présents en plus faible quantité<sup>[33-36]</sup>. Le degré de substitution varie fortement selon l'origine botanique et le mode d'extraction.



**Figure 3 :** Structure chimique d'arabinoxylane

En général, les arabinoxylanes présentent une variabilité importante de leurs caractéristiques structurales. Le degré de substitution des chaînes xylanes par l'arabinose (Arabinose/Xylose : Ara /Xyl)<sup>[37]</sup>, la masse molaire, le type et la distribution de substitution déterminent leur degré de solubilité ainsi que leur capacité à se lier aux constituants de la paroi végétale<sup>[38-40]</sup>. Chez les graminées, ce sont les arabinoxylanes qui ponteraient les microfibrilles de cellulose. Seuls les arabinoxylanes peu ramifiés sont capables de créer des liaisons hydrogènes inter chaînes et avec la cellulose<sup>[22]</sup>. Il faut noter que les arabinoxylanes

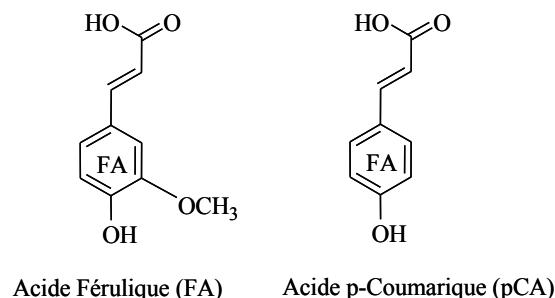
sont également susceptibles d'interagir de manière covalente avec les autres polymères pariétaux, notamment la lignine *via* les acides phénoliques<sup>[41,42]</sup>.

### I.4. Les acides phénoliques

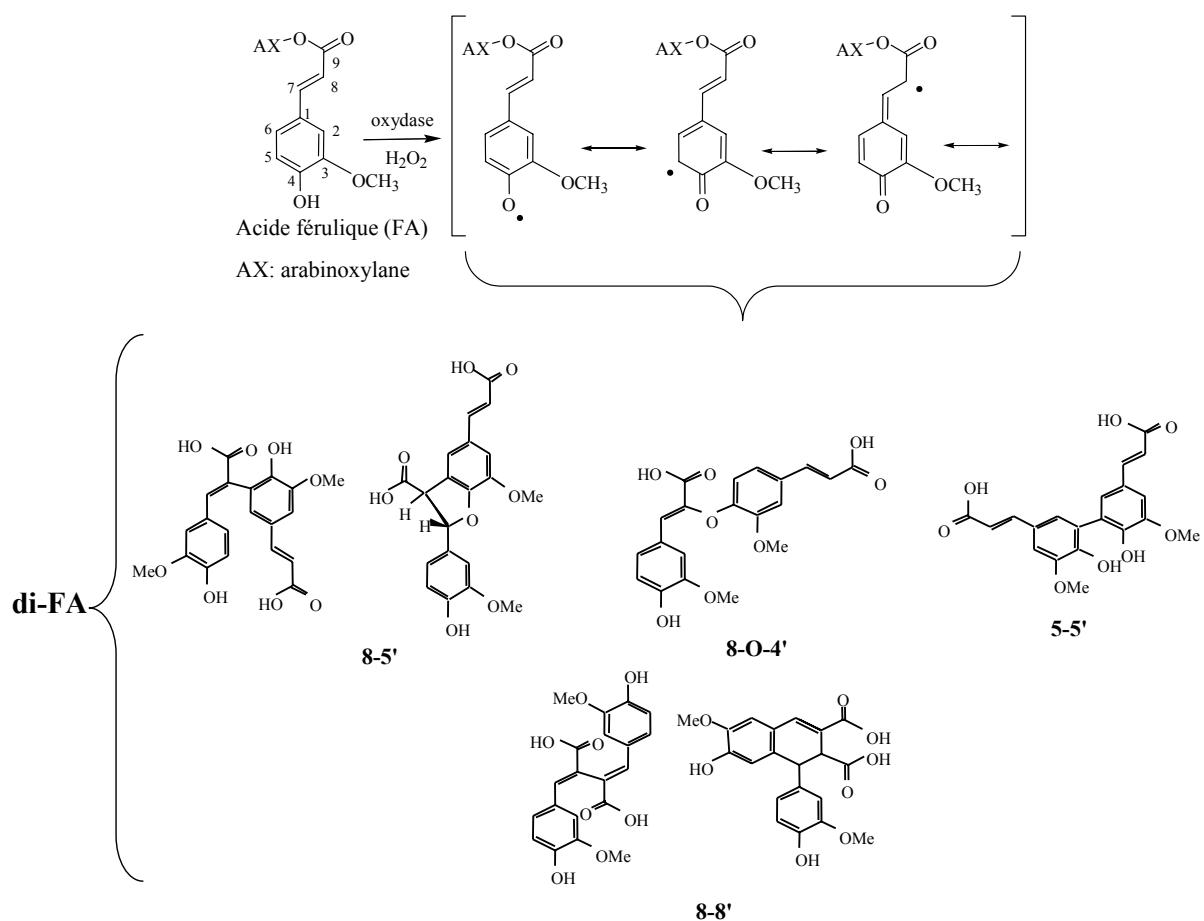
Les parois de graminées sont caractérisées par la présence d'acides *p*-coumarique (pCA) et férulique (FA). Ces deux acides sont distingués par le nombre de groupements méthoxy ( $\text{OCH}_3$ ) associés au cycle aromatique (Figure 4). Les pCA peuvent être liés aux lignines, cette particularité sera traitée dans la partie suivante dédiée aux lignines. Nous n'aborderons dans cette partie que les acides phénoliques (FA et pCA) estérifiés aux unités arabinose des arabinoxylanes. Le FA et dans une moindre mesure, le pCA, présentent une forte réactivité sous l'action d'enzymes oxydatives (peroxydase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>[41,43]</sup>. Au cours de cette réaction, l'acide férulique est oxydé pour former un radical phénoxyle. La réaction de dimérisation s'effectue selon un mécanisme non enzymatique par un simple couplage des deux radicaux phénoxyl. La réactivité des composés phénoliques dépend de leur structure chimique. L'acide férulique porte un groupement hydroxyle sur le noyau aromatique en position para- conjugué à une chaîne propénoïque. Cette substitution permet la délocalisation de l'électron non apparié lorsque l'acide férulique est sous la forme oxydée (radical phénoxyle). Selon la localisation de l'électron au moment de couplage radicalaire entre deux radicaux, différentes formes peuvent être produites: acides diféruliques (di-FA) ou déhydrodimères (Figure 5), trimères et tétramères<sup>[44-48]</sup>.

Sous l'action d'oxydant ou d'un système peroxydase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , les arabinoxylanes féruloylés peuvent former des gels<sup>[46,47,49]</sup>. Ces phénomènes de gélification sont provoqués par la dimérisation des acides phénoliques. Ces connections inter chaînes conduisent à la construction de réseaux d'arabinoxylanes définis dans les trois dimensions de l'espace. Les

régions d'interconnection ou « zones de jonction » peuvent intéresser deux chaînes d'arabinoxynane ou plus.

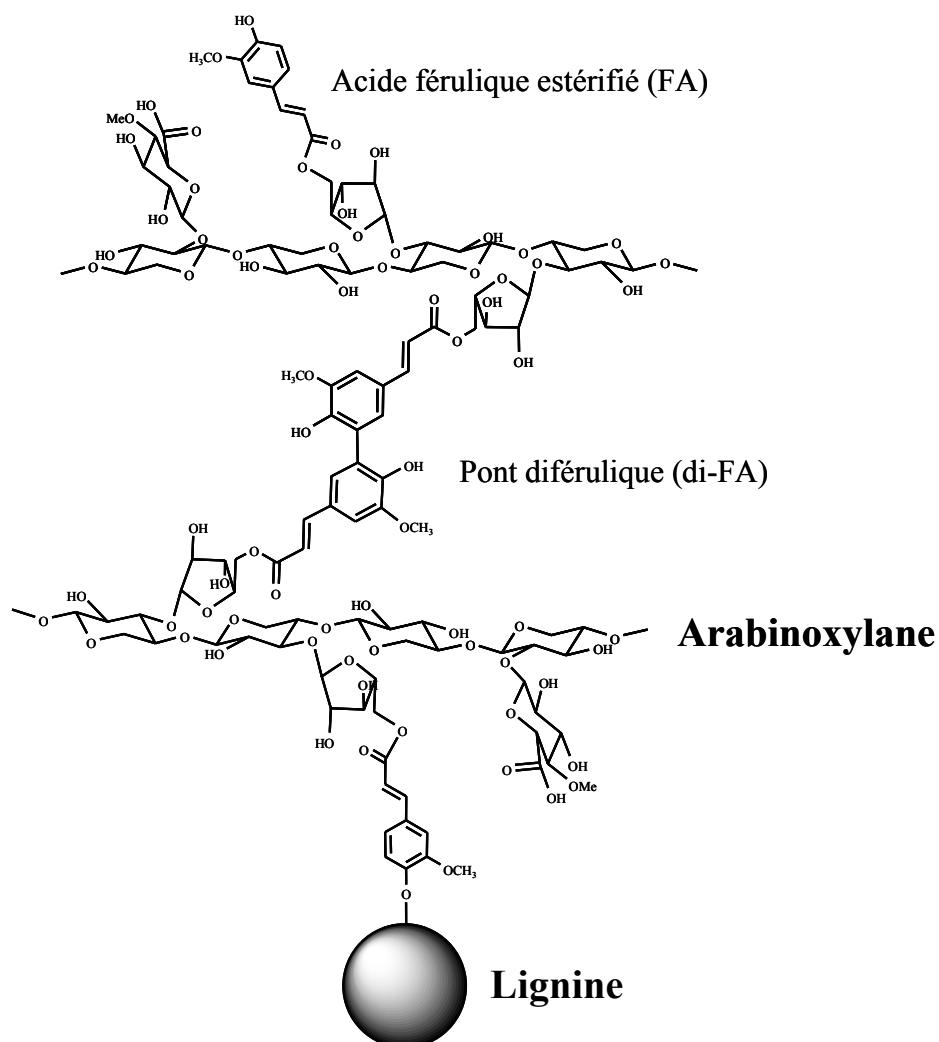


**Figure 4:** Structure chimique des acides férule (FA) et p-coumarique (pCA).



**Figure 5 :** Mécanisme d'oxydation de l'acide férule (FA) et formation des dimères de l'acide férule (di-FA)

Les phénomènes de dimérisation (*in vivo*) jouent un rôle important dans la structuration de la paroi<sup>[41,50]</sup>. Dans les parois des graminées, FA se présente majoritairement sous une forme estérifiée aux arabinoxylanes. Ainsi deux FA estérifiés chacun par un arabinoxylane sont susceptibles de se lier pour former des points de réticulation «pont di-FA» entre deux chaînes d'arabinoxylanes ou avec la lignine (Figure 6). De telles interactions pourraient contribuer à compacter le réseau pariétal<sup>[51,52]</sup>. De plus, les di-FA seraient impliqués dans l'adhésion des cellules entre elle et entre les couches cellulaires<sup>[53]</sup>. Monomères (FA) et dimères (di-FA) pourraient être des points d'initiation de la lignification dans les parois des graminées<sup>[48,54,55]</sup>.



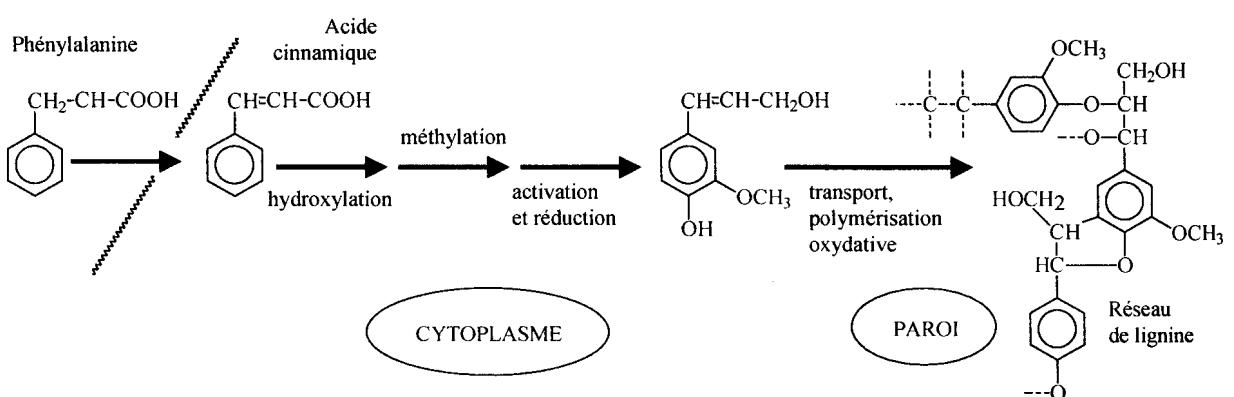
**Figure 6 :** Réticulation des arabinoxylanes entre eux et avec la lignine

## I.5. Les lignines

### I.5.1. La biosynthèse de la lignine

Les lignines représentent un polymère aromatique tridimensionnel de structure complexe<sup>[56]</sup>. La biosynthèse des monomères de lignine est multi étape et fait intervenir plusieurs enzymes de la voie des phenylpropanoïdes. Un acide aminé aromatique (la phénylalanine) est désaminé en acide trans-cinnamique avec libération d'ion ammonium.

Par hydroxylation puis éventuellement méthylation (en 3 et/ou 5 du cycle aromatique), l'acide cinnamique conduit aux acides phénoliques p-coumarique, férulique ou sinapique (Figure 7). Les fonctions carboxyles sont activées puis réduites en alcool. Au cours des 20 dernières années, cette voie biosynthétique a fait l'objet de nombreux travaux dont les résultats ont permis de préciser les différentes étapes conduisant à la formation des monomères de lignine<sup>[57]</sup>: l'alcool p-coumarylique (H) (3-(4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol), l'alcool coniférylique (G) (3-(3-méthoxy-4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol) et l'alcool sinapylique (S) (3-(3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol) (Tableau 1). Ces monomères diffèrent entre eux par la présence de groupements méthoxyles en *ortho* et *para* du groupement phénol.



**Figure 7 :** Schéma de la biosynthèse des lignines

**Tableau 1:** Monomères et unités de lignine

Alcool	Unité	Symbol	Structure
p-coumarylique	p-Hydroxyphényle	H	
Coniférylique	Gaïacyle	G	
Sinapylique	Syringyle	S	

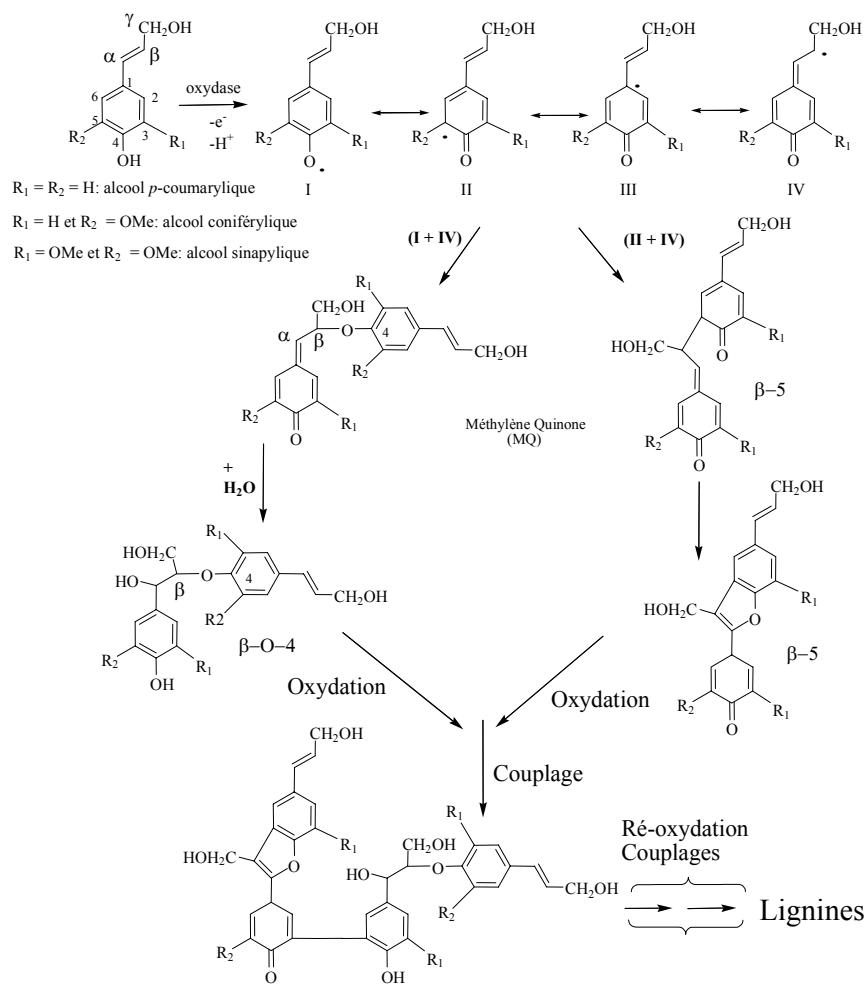
### I.5.2. La polymérisation des monomères de lignine

Les alcools cinnamyliques (monomères) peuvent être oxydés par des oxydases<sup>[58]</sup>.

Comme dans le cas de FA, l'oxydation des monolignols conduit à un radical existant sous quatre formes mésomères en équilibre. Ce processus est sous le contrôle des conditions du milieu et non pas sous un contrôle enzymatique direct. Suivant les conditions de la polymérisation, les radicaux se couplent dans des proportions différentes (Figure 8). Le couplage deux à deux des radicaux conduit à la formation de dimères, qui peuvent être réoxydés et couplés entre eux pour former des espèces de plus haut poids moléculaire. Cette polymérisation radicalaire conduit à un polymère dont la structure est statique et fortement ramifiée.

Durant cette réaction, des liaisons covalentes peuvent être établies avec les autres polymères pariétaux, essentiellement les hémicelluloses. Elles seraient en partie responsables de la difficulté à isoler la lignine et les polyosides et rendent les systèmes insolubles.

Un mécanisme de formation de ces liaisons covalentes met en jeu l'addition nucléophile des polyosides (fonctions carboxyliques des acides uroniques ou groupements hydroxyl) sur la méthylène quinone (MQ) formée durant la réaction de polymérisation<sup>[59]</sup> (Figure 8). Le deuxième, notamment dans le cas des graminées, implique FA qui peut relier les polyosides et la lignine par l'intermédiaire de déhydro-oligomères<sup>[41,48,54]</sup>. Ces liaisons sont formées par oxydation monoélectronique des motifs phénoliques. Le pCA est rencontré essentiellement dans la paroi secondaire<sup>[60,61]</sup> et sous forme estérifiée aux lignines<sup>[62-64]</sup>.

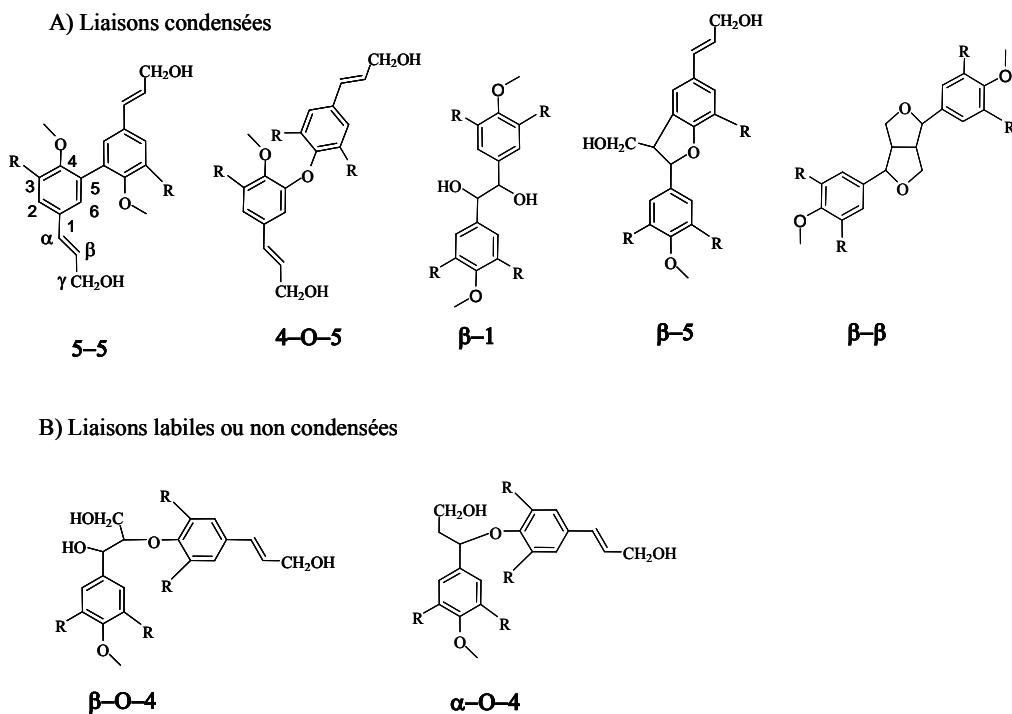


**Figure 8 :** Schéma de la polymérisation radicalaire des monomères

Scalbert et *al.*(1985) ont montré que, dans la paille de blé, 93% des liaisons entre les acides phénoliques et les lignines étaient assurées par des liaisons esters impliquant le pCA<sup>[62]</sup>; la liaison s'établirait exclusivement en position  $\gamma$  des monomères de lignine<sup>[65]</sup>. Le pCA n'est pas uniquement impliqué dans des liaisons de type ester. Une étude des acides phénoliques liés en éther a montré que 13.3 % de pCA total des parois est concerné par ce type de liaison<sup>[66]</sup>.

### I.5.3. La variabilité structurale des lignines

La synthèse et le dépôt de lignine s'effectuent après la croissance des cellules, pendant la synthèse de la paroi secondaire. Au sein même de la cellule, la proportion en lignines décroît de la lamelle mitoyenne jusqu'à la paroi secondaire<sup>[67]</sup>. De même, la nature et la quantité en monomères de lignines (H, G, S) varie selon la localisation spatiale dans la cellule<sup>[68]</sup>. Les trois unités monomères phénylpropanes (H, G, S ; Tableau 1) peuvent être liées entre elles par différents types de liaisons. Celles-ci sont classées en liaisons carbone-carbone (liaisons 5-5,  $\beta$ -1,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ ) ou diaryl éther (liaisons 4-O-5), ces types de liaisons sont dites « condensées ». Elles sont résistantes aux dégradations chimiques usuelles. D'autres liaisons qualifiées de « non condensées » ou « labiles » sont de type éther (liaisons  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -O-4), les liaisons  $\beta$ -O-4, étant les plus fréquentes dans les lignines naturelles. Elles sont rompues facilement par les méthodes de dégradation chimiques (thioacidolyse, oxydation au nitrobenzène alcalin,...)<sup>[1,69-71]</sup>. L'estimation de la quantité des liaisons  $\beta$ -O-4 par les méthodes chimiques de dégradation et par spectroscopie RMN et FTIR est couramment utilisée pour classer les différents types de lignine<sup>[2,69,72-74]</sup>. Cependant, la quantité des liaisons détectées et la proportion de lignines analysées sont dépendantes des méthodes utilisées.



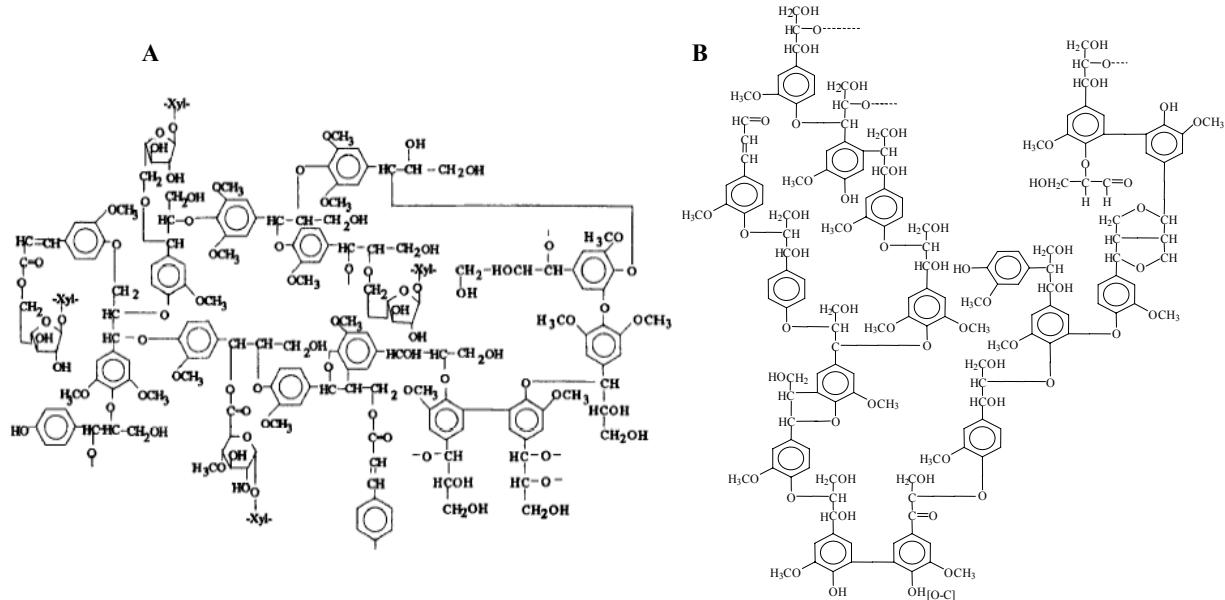
**Figure 9 :** Exemple de liaisons inter-monomères au sein des lignines A) condensées B) labiles ou non condensées ( $R = H$  ou  $OCH_3$ ).

La structure des lignines varie d'une part selon le type d'unités présentes c'est-à-dire selon leur degré de méthoxylation et d'autre part selon le type de liaisons présentes et donc selon le degré de condensation.

Un autre facteur d'hétérogénéité des lignines est lié à l'origine botanique et à l'état de maturation de la plante. En effet la teneur relative en unités H, G et S est spécifique de l'origine végétale des lignines<sup>[75-77]</sup> mais également du type cellulaire<sup>[52]</sup>. Les lignines de gymnospermes sont constituées principalement d'unités G. Les lignines d'angiospermes présentent, en plus des unités G, des unités S en quantité variable selon, l'âge, le tissu et l'espèce de la plante<sup>[2,69,77]</sup>. Les lignines de la famille de Graminées, les plus complexes, sont

caractérisées par la présence des unités G, S majoritaire et d'unité H en faible quantité<sup>[2,3,78]</sup>

(Tableau 2, Figure 10).



**Figure 10 :** Structure chimique d'un modèle de lignine. **A)** Graminées<sup>[79]</sup> et **B)** de Gymnospermes<sup>[80]</sup>.

Billa et Monties (1995) ont démontré une variabilité des teneurs en lignines et acides phénoliques pariétaux dans différentes parties anatomiques de la paille de blé<sup>[81]</sup>. La composition monomérique et le degré de condensation des lignines *in situ* varient selon le tissu considéré (les nœuds, les entre-nœuds ou les feuilles). Par exemple le rapport S/G augmente de 0.5 (lignines de feuilles) à 1.9 (lignines des nœuds)<sup>[81]</sup>. De plus, les lignines des nœuds et entre-nœuds sont moins condensées que les lignines de feuilles<sup>[81]</sup>. La composition en monomères des lignines dépend également de l'âge de la plante. En effet, au cours de la maturation de la plante et dans une cellule donnée, les lignines ont tendance à s'enrichir en

unités constitutives S, en particulier dans la paroi secondaire. L'augmentation du rapport S/G est un signe à la fois de l'évolution et de la maturité des lignines et de la plante<sup>[82]</sup>.

**Tableau 2 :** Distribution molaire des monomères H/G/S issus de la dégradation par thioacidolyse de parois de différentes origines végétales<sup>[78,83]</sup>.

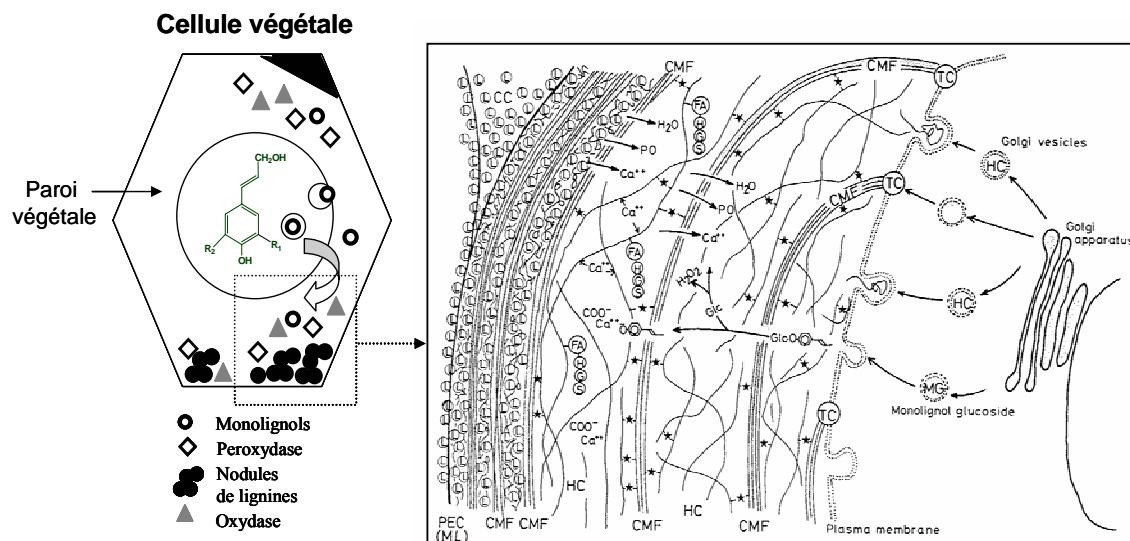
Origine du végétale	Composition monomérique H/G/S
Conifère (Gymnospermes) « Epicéa »	2/98/tr
Feuillus (Angiospermes dicotylédones) « Peuplier »	-/32/63
Graminées (Angiospermes monocotylédones) « Paille de blé »	5/49/46

tr : traces

Cependant, peu d'informations précises sont disponibles sur l'organisation des lignines G par rapport aux GS notamment, leurs interactions avec les autres polymères pariétaux, l'effet de l'acide férulique sur leurs réactivités et par conséquence leurs morphologies et leurs structures moléculaires.

## II. La mise en place de la paroi lignifiée

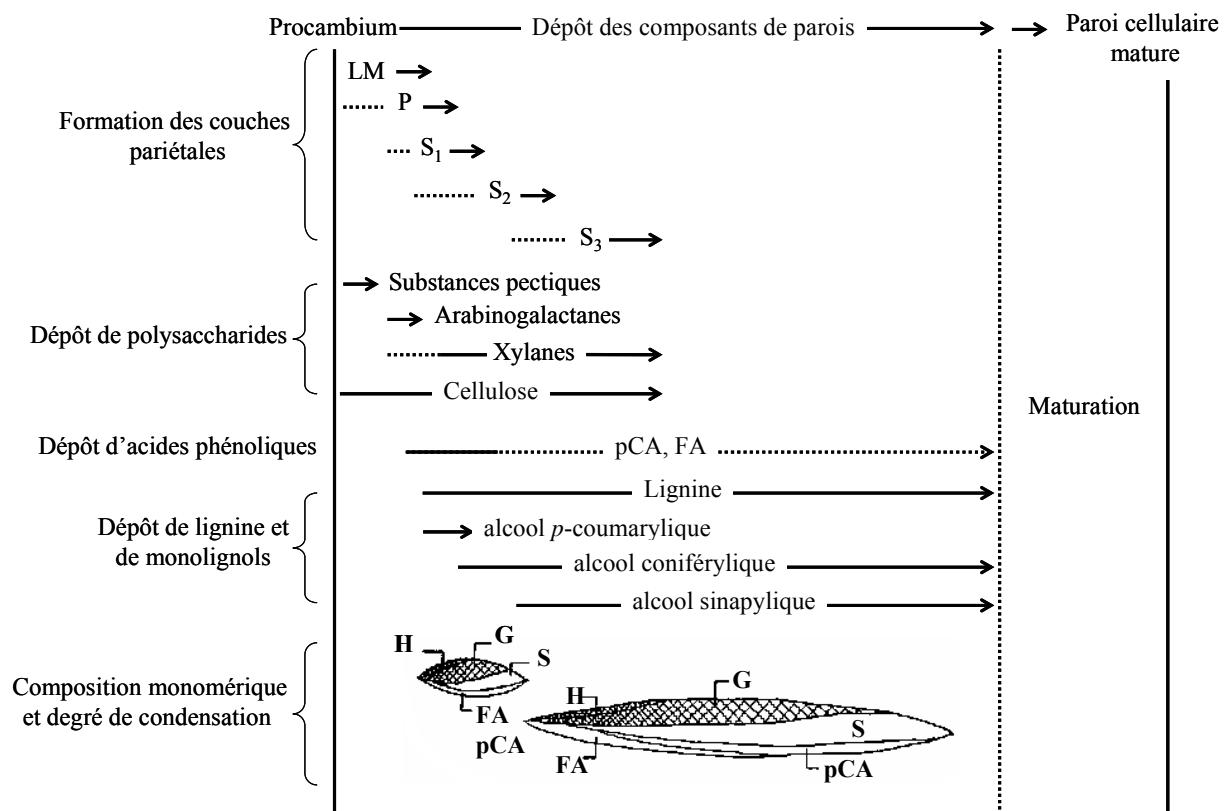
Après sécrétion dans l'espace extracellulaire, les polymères pariétaux s'organisent et s'assemblent en une structure cohésive: la paroi. Cette structure assure de nombreuses fonctions qui évoluent au cours de la vie de la plante. L'évolution chimique et architecturale de cette structure est associée aux événements biologiques de la cellule mais également aux modifications des propriétés physico-chimiques des parois<sup>[26]</sup>.



**Figure 11 :** Représentation schématique de la biosynthèse des parois lignifiées<sup>[82]</sup> TC : complexe terminal ; CMF : microfibrilles de cellulose ; HC : hémicelluloses ; L : lignine ; PEC : pectines ; FA : acide férulique. PO : peroxydase ; H, G, S : précurseurs de lignine.

La première étape est la formation de la lamelle mitoyenne, où plusieurs vésicules golgiennes viennent déverser leur contenu (Figure 11,12). Cette structure est formée d'un gel épais et rigide constitué principalement de pectines associées entre elles *via* des ions de calcium.

Dans un deuxième temps, au cours de l'expansion et de la différenciation cellulaire, l'apposition, de pectines, de microfibrilles de cellulose et des hémicelluloses conduit à la formation de la paroi primaire (Figure 11,12). L'établissement des diverses liaisons entre ces constituants permet la formation d'une structure fibrillaire souple, extensible et très hydrophile tant qu'elle n'est pas lignifiée<sup>[23,84]</sup>.



**Figure 12 :** Relation entre le dépôt des polymères pariétaux et la formation de la structure hétérogène de la lignine chez les Graminées<sup>[82]</sup>, LM : Lamelle mitoyenne ; P : paroi primaire ; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> : couches des parois secondaires ; FA : acide férulique ; pCA : acide p-coumarique ; H, G, S : précurseurs de lignine.

Lorsque la croissance cellulaire a cessé, certaines cellules (les cellules impliquées dans les fonctions de soutien et de conduction) élaborent, au niveau de la face interne de la paroi primaire, une paroi secondaire. C'est une structure épaisse, compacte, mécaniquement inextensible et résistante. La formation des parois secondaires correspond à un épaississement de la paroi primaire par dépôt successif de polyosides (Figure 11,12). Quand la paroi secondaire s'épaissit, la production de pectines est stoppée et la formation de chaînes de xylanes estérifiées par les acides phénoliques débute<sup>[82]</sup>. La paroi secondaire est composée d'hémicelluloses et de microfibrilles cristallines de cellulose organisées dans trois

couches ( $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$ ), qui se distinguent par des orientations différentes des microfibrilles de cellulose par rapport à l'axe de la cellule. La cellulose et les hémicelluloses apparaissent plus organisées structurellement que dans la paroi primaire, ce qui confère aux parois secondaires de remarquables propriétés mécaniques<sup>[85]</sup>.

Après le dépôt de polyosides, le réseau va être incrusté par la lignine (Figure 11,12). L'inclusion de la lignine ajoute davantage de rigidité et de complexité à la matrice pariétale<sup>[82]</sup>. La structure et l'organisation de la lignine au sein de cette matrice varie en fonction de l'état physiologique (âge, stress,...) du tissu et de l'espèce considérée.

La lignification apparaît en premier lieu dans les coins cellulaires puis se propage tangentially dans la lamelle mitoyenne (ML) puis dans la paroi primaire (P) (Figure 11,12). Ces zones, comme décrites précédemment sont constituées par des réseaux cellulosiques, hémicellulosiques, et pectiques hydrophiles et interpénétrés. Lorsque la lignification est complète, la proportion de la lignine dans ces régions (LM et P) peut atteindre plus de 50 % en poids de la structure<sup>[86]</sup>.

Les premiers monomères intervenant dans la lignification sont de type p-hydroxylphényle (H) (Figure 12). Les monomères de lignine sont synthétisés dans le cytoplasme et sont excrétés à travers la membrane cytoplasmique sous forme de glucoside<sup>[82,87]</sup> (Figure 11). Suite à leur sécrétion dans la matrice pariétale, les précurseurs diffuseraient dans cette structure gélifiée puis s'adsorberaient dans un premier temps à la surface des microfibrilles de cellulose<sup>[88]</sup>. Sous l'action de  $\beta$ -glucosidase, de peroxydases et de laccases, les trois monomères seraient oxydés puis polymériseraient (Figure 11).

Après ces premières étapes, la lignification s'étend aux parois secondaires et s'effectue au cours de la déposition de cellulose et d'hémicelluloses dans  $S_2$  (Figure 11,12). Cette dernière étape, la plus longue, affecte principalement la paroi secondaire. Elle commence dès

la formation de S<sub>3</sub> et se caractérise chez les Angiospermes par une lignine riche en unités S (Figure 12).

Les composés phénoliques (FA et pCA) ne sont pas simplement déposés et polymérisés dans la paroi mais contribuent à son architecture en établissant diverses liaisons covalentes avec les autres polymères<sup>[65,89,90]</sup>. Ces liaisons participent aux mécanismes d'arrêt de la croissance cellulaire en conférant à la cellule sa forme définitive<sup>[5,91,92]</sup>. FA et pCA s'accumulent à des stades différents de la maturation des parois (Figure 12). FA s'accumulerait avant et au début de la lignification, en parallèle avec des lignines de type G (Figure 12), alors que pCA intervient plus tardivement et accompagnerait la synthèse d'une lignine riche en unités S<sup>[60]</sup>. Le pCA ne semble pas intervenir dans la formation des esters/éthers entre les différents types de polymères. Il est très intéressant de remarquer qu'avec la maturité, la quantité relative de FA estérifiée diminue<sup>[93,94]</sup>. Cette diminution est due à la mise en place de liaisons éthers entre certains FA et les lignines<sup>[66]</sup>. Du fait de cette liaison, les FA estérifiés impliqués ne sont plus dosés en tant que FA estérifiés. Lam et al.(1994) ont montré, dans le cas des lignines du Björkman isolées de pailles de blé, que la totalité des FA éthérifiés aux lignines sont également estérifiés aux polyosides<sup>[95]</sup>. En effet, seuls les complexes lignine-polyosides *via* l'acide férulique ancrant les lignines aux polyosides agiraient comme initiateur et/ou comme site de nucléation pour la lignification des parois<sup>[48,62,96]</sup>.

D'autres part, les polyosides et la lignine pourraient être additionnés au carbone- $\alpha$  (C <sub>$\alpha$</sub> ) de la méthylène quinone, conduisant à la formation des complexes lignine-polyosides<sup>[97-100]</sup>. Ces différents modes d'associations entre les polyosides et la lignine affectent la structure et l'ultrastructure des lignines et par conséquent l'architecture de la paroi végétale.

### III. Interaction lignine-polyosides

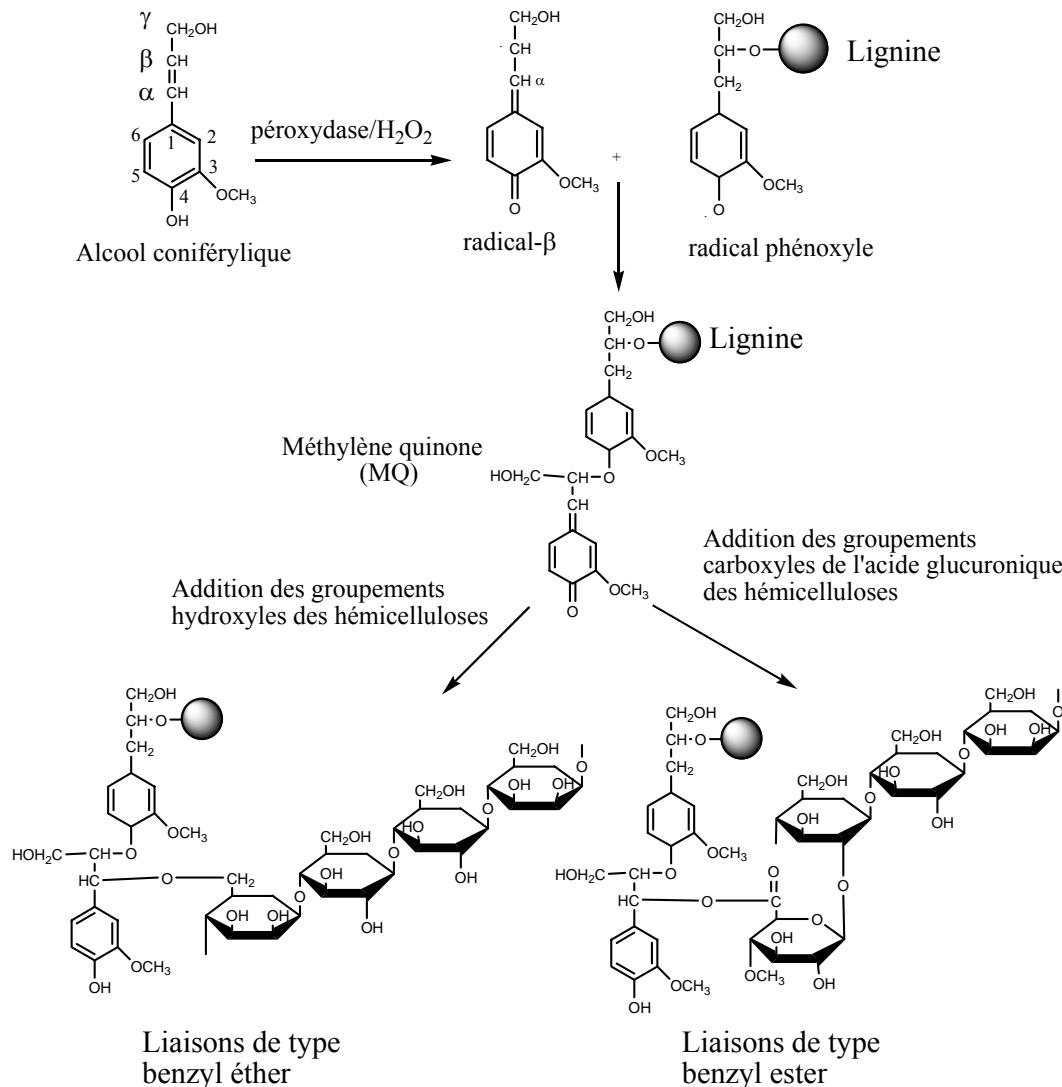
Une étude approfondie de la structure et des fonctions de la paroi végétale nécessite la connaissance des interactions entre les divers polymères constitutifs. En effet, par l'intermédiaire d'associations physiques et chimiques, les polymères pariétaux s'organisent en une structure rigide et insoluble pour former la paroi, chimiquement et biologiquement résistante. Les parois doivent pouvoir résister à des pressions turgescentes mais elles doivent également pouvoir subir une expansion durant la croissance cellulaire. La cohésion entre les différents polymères pariétaux est assurée par différents types de liaisons: liaisons non covalentes (hydrogènes, hydrophobes, ioniques,...) et covalentes. Nous décrirons ici uniquement les liaisons covalentes entre les polyosides et la lignine.

Les lignines sont étroitement imbriquées avec les autres constituants pariétaux : hémicelluloses, cellulose, pectines, glycoprotéines. Les liaisons covalentes entre les lignines et les polyosides forment des complexes LCC (Lignine Carbohydrates Complexes). Nous décrirons les LCCs entre les polyosides et la lignine qui font intervenir le méthylène quinone (MQ) et les acides phénoliques.

#### III.1. Interactions covalentes *via* la méthylène quinone (MQ)

Plusieurs méthodes d'extraction et d'identification ont été utilisées afin de caractériser les LCCs. Ces liaisons conduisent à accroître la rigidité pariétale et la cohésion intercellulaire et rendent généralement le système très insoluble et limiteraient ainsi la digestibilité des parois<sup>[6]</sup>. Trois grandes classes de LCC ont été reportées dans la littérature : les liaisons (1) benzyl éther<sup>[97,100]</sup>; (2) benzyl ester<sup>[101,102]</sup> et (3) de façon plus marginale des types glycosidiques<sup>[103]</sup>. Les deux premiers types se forment suite à un mécanisme d'addition nucléophile des groupements hydroxyl ou carboxyle des polyosides au C<sub>a</sub> de la méthylène

quinone (MQ) formée pendant la polymérisation des monolignols (Figure 13). Ce mécanisme réactionnel est en concurrence avec l'addition d'une autre nucléophile notamment l'addition de l'eau.

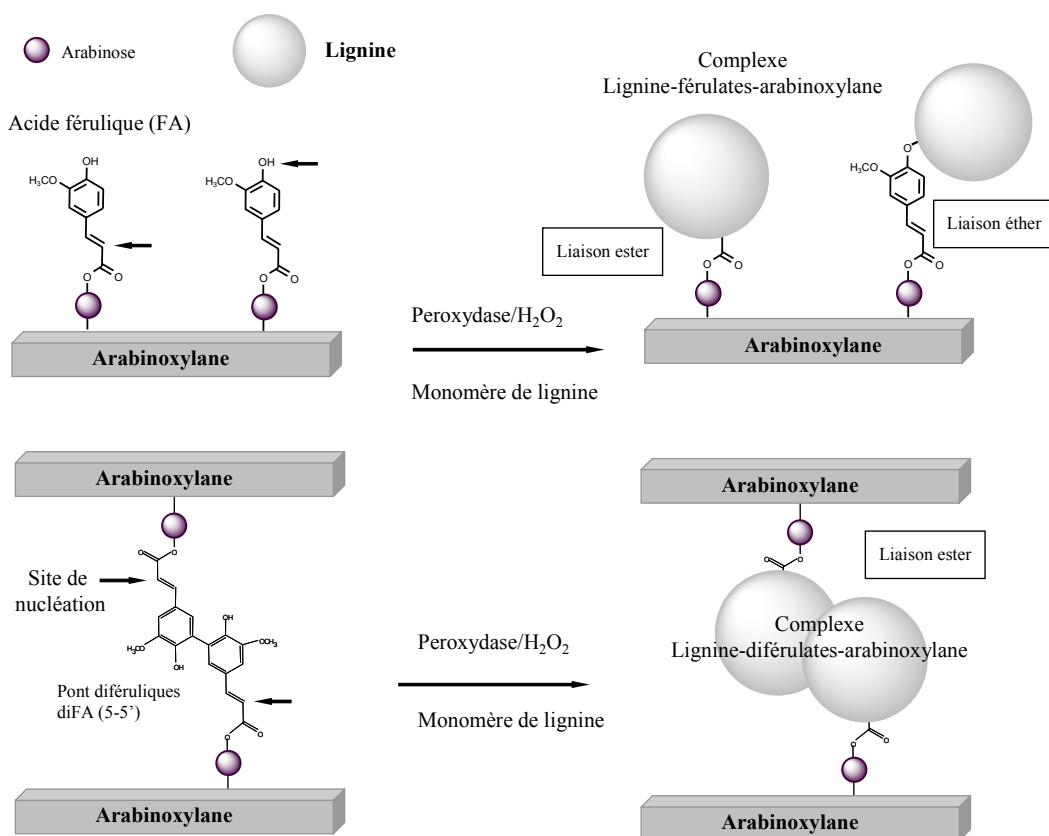


**Figure 13 :** Mécanisme de formation des liaisons benzyle éther et ester entre la lignine et les hémicelluloses selon un « mécanisme nucléophile » *via* la méthylène quinone (MQ).

La complexité de cette réaction nucléophile a conduit plusieurs auteurs à retenir des approches modèles pour expliquer ce mécanisme réactionnel. Ces travaux seront développés dans la partie dédiée à la modélisation des interactions lignine-polyosides.

### III.2. Interactions covalentes *via* les acides phénoliques

Dans le cas des graminées un autre mode d'association covalente entre les réseaux polyosidiques et la lignine se met en place via les acides phénoliques<sup>[41,54]</sup> (Figure 14). Les acides phénoliques, sont des molécules « bifonctionnelles » car elles peuvent engager leur fonction carboxylique (COOH) dans des liaisons esters et leurs groupements hydroxy-phénol dans des liaisons éther<sup>[62,104]</sup>. Ils constituent des agents potentiels de la réticulation des polymères pariétaux.

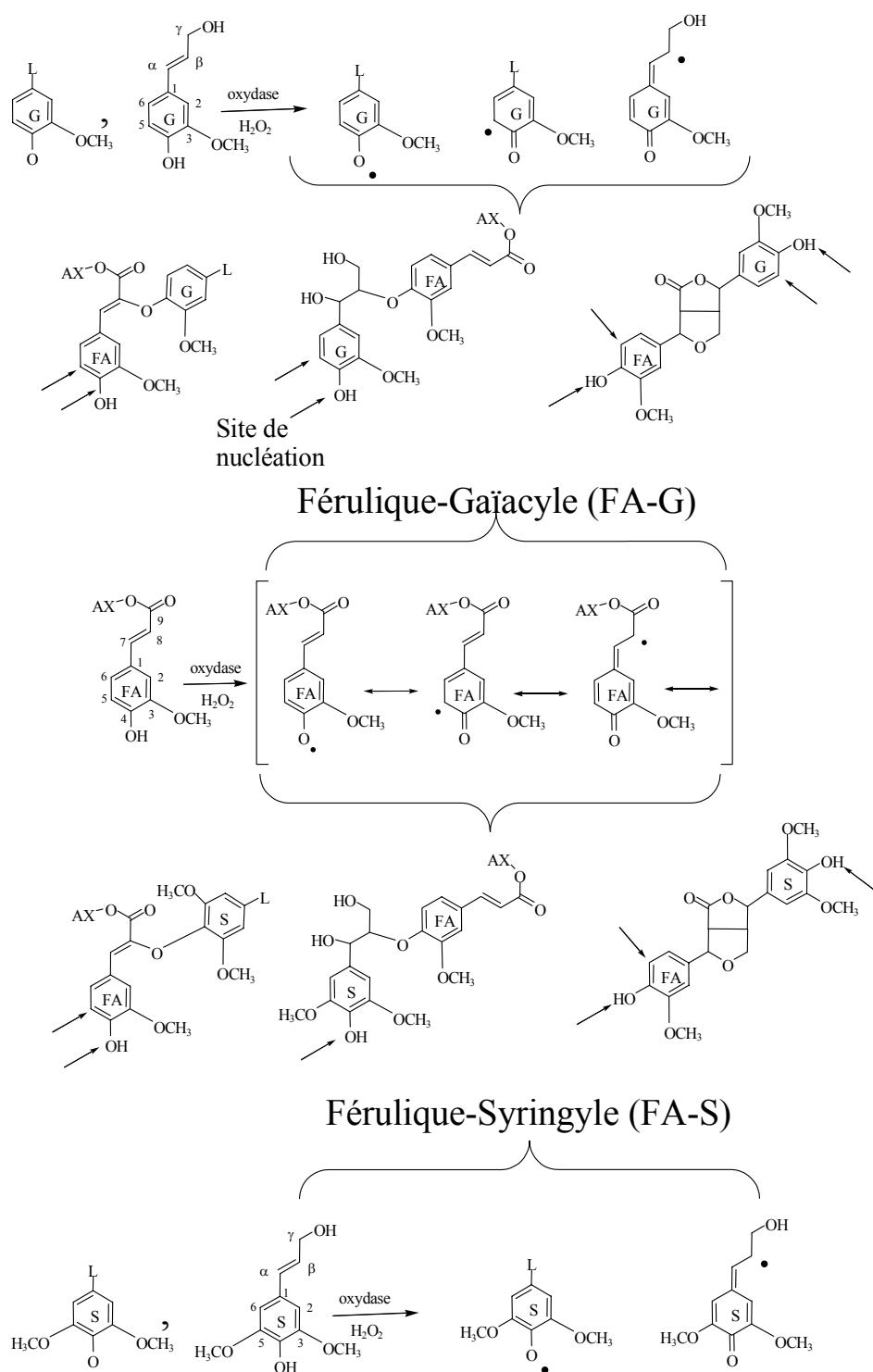


**Figure 14 :** Représentation schématique des liaisons ester et éther entre les arabinoxylanes et la lignine<sup>[105]</sup>.

L'acide férulique (FA) est principalement lié aux lignines par liaison éther<sup>[62,106,107]</sup>. Jacquet (1997) a montré que cette liaison par couplage radicalaire intervient au niveau du

carbone  $\beta$  des unités constitutives des lignines<sup>[104]</sup> (Figure 15). Les dimères de type  $\beta$ -O-4 identifiés par Jacquet (1997) sont la signature formelle du couplage radicalaire d'une molécule d'ester férulique avec un alcool précurseur de lignines<sup>[104]</sup> (Figure 15). Ceci implique que les esters féruliques liés aux xylanes soient co-polymérisés oxydativement avec les précurseurs des lignines de graminées (Figure 14,15). Ils apparaissent comme des points de croissance pour le polymère lignine ainsi fortement ancré aux hémicelluloses. Monomères, dimères (di-FA) et/ou trimères (tri-FA) et tétramères d'acide férulique<sup>[45,48,108,109]</sup> engendrent par leur pontage des associations étroites entre les polyosides tels que les arabinoxylanes et la lignine<sup>[55,110,111]</sup> (Figure 14,15). Lam et *al.* (1992) ont mis au point une méthode permettant d'estimer les acides féruliques liés à la fois aux hémicelluloses et aux lignines<sup>[112]</sup>. Ils ont ainsi montré que tous les acides féruliques éthérifiés étaient également estérifiés dans le cas de la paille de blé. Par contre, pour le pCA, il n'a pas pu être mis en évidence de tel rôle de pontage entre les hémicelluloses et les lignines<sup>[112]</sup>.

Ces diverses et nombreuses structures ester et/ou éther augmentent la réticulation des polymères pariétaux en permettant la formation des ponts entre les polyosides pariétaux et /ou entre les lignines et les polyosides. En outre, les complexes lignine-polyosides *via* l'acide férulique agiraient comme initiateur et/ou comme site de nucléation pour la lignification des parois<sup>[54,62,105,55]</sup> (Figure 14,15). Ceci suggère que la structure des polyosides et leur mode d'association avec la lignine sont des facteurs potentiellement déterminants de la structure et la formation de la paroi végétale lignifiée.



**Figure 15 :** Couplage entre la lignine et les hémicelluloses selon un « mécanisme oxydatif » via l’acide férule<sup>[105]</sup>. G: Gaïacyle ; S: Syringyle ; FA: Acide Férule ; AX: Arabinoxylane.

### IV. Modèles chimiques des parois végétales lignifiées

#### IV.1. Synthèse des DHPs (DeHydrogenative Polymers = modèle de lignine)

Devant la complexité structurale des lignines et la difficulté à isoler la lignine native à partir des parois d'une part, la diversité des interactions entre la lignine et les différents constituants de la paroi d'autre part, le recours à des modèles chimiques a permis d'identifier certaines étapes et mécanismes de la formation des lignines. L'étude de lignines de synthèse ou dehydrogenative polymers (DHPs) a été initiée par Freudenberg (1968)<sup>[59]</sup>. En utilisant une approche biomimétique, la réaction *in vitro* de l'alcool coniférylique en présence d'extrait de champignons contenant des laccases ou en présence de peroxydase et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) conduit par polymérisation, à des déhydropolymères insolubles (DHPs) dont la structure est assez proche de celle des lignines. Ces molécules ont largement été étudiées afin de comprendre à la fois la structure et la réactivité des lignines<sup>[113,114]</sup>. Cette modélisation a fourni de nombreuses informations sur l'orientation des réactions de polymérisation des lignines en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu et des conditions de polymérisation<sup>[115,116]</sup>. La polymérisation des lignines est initiée par des enzymes mais contrôlée par des paramètres purement chimiques. La connaissance du mécanisme de polymérisation permet de comprendre que la variation des conditions du milieu de polymérisation peut affecter les paramètres cinétiques et thermodynamiques de la réaction et par conséquence modifier la structure finale des lignines.

#### IV.2. Paramètres réactionnels affectant la structure des DHPs.

Sarkanen (1971) a montré que la structure des DHPs est affectée par la vitesse d'addition des précurseurs au milieu réactionnel contenant la peroxydase/ $H_2O_2$ <sup>[117]</sup>.

Ce processus de polymérisation déhydrogénative peut être envisagé selon deux modalités: dans le premier cas une addition brutale dite « à la verse » ou « Zulaufverfahren : ZL » conduit à la formation d'un polymère « bulk » lié à une « prise en masse » des monomères. Dans le second cas les réactifs sont additionnés progressivement « à la goutte » (Zutropfverfahren : ZT) dans le milieu réactionnel contenant la peroxydase. Les premiers dimères formés serviraient de sites de nucléation sur lesquels viendraient se condenser d'autres monomères. Cette polymérisation conduirait à un polymère issu de l'elongation de la chaîne selon un processus couramment appelé « end wise ». Dans le cas de la réaction « à la verse », la concentration élevée en monomères favoriserait le couplage monomère-monomère. Le polymère « bulk » obtenu est enrichi en  $\beta$ - $\beta$  et  $\beta$ -5 et contient une faible proportion de liaisons  $\beta$ -O-4. En revanche, lors de l'addition progressive des monomères « à la goutte », la concentration locale en monomère reste peu élevée, ce qui favoriserait le couplage entre radicaux oligomères et monomères avec l'apparition d'un grand nombre de liaisons  $\beta$ -O-4. Ce schéma permet de mettre en évidence l'importance des caractéristiques cinétiques de la réaction. Cette affirmation a été appuyée par l'équipe de Higuchi qui a réalisé la polymérisation de l'alcool coniférylique dans un tube de dialyse autorisant une diffusion très lente des monomères dans le milieu contenant la peroxydase<sup>[118,119]</sup>. Ces auteurs ont pu montrer l'effet de la vitesse de diffusion du monomère de lignine sur l'augmentation du taux de liaisons  $\beta$ -O-4 et la masse molaire des DHPs.

Au-delà des paramètres cinétiques, d'autres paramètres peuvent également affecter la structure des DHPs, notamment la nature du monomère<sup>[117,120]</sup>, le pH<sup>[121]</sup>, la présence des polyosides. Afin d'étudier la réactivité des trois précurseurs des lignines de graminées, Jacquet et al.(1997) ont synthétisé des DHPs à partir du précurseurs H, G et/ou S seuls ou en mélange. Ils ont montré par thioacidolyse des différences structurales importantes entre les DHPs, mais également entre les DHPs et la lignine naturelle<sup>[120]</sup>. En effet, ils ont

montré que le taux de liaisons  $\beta$ -O-4 varie en fonction du type de monomère, par exemple la présence du monomère S favoriserait l'augmentation de liaisons  $\beta$ -O-4. Fournand et *al.* (2003) ont réalisé la polymérisation des monomères de lignine à différents pH (4.5, 6 et 8) en présence du peroxydase. Ils ont révélé que le pH influence la réactivité du monomère et par conséquent la structure des produits<sup>[121]</sup>. Par exemple la formation de liaisons  $\beta$ -O-4 sera favorisée aux faibles valeurs de pH. Toutefois, le paramètre « concentration locale », c'est à dire la présence des polyosides semble avoir un effet remarquable sur l'orientation de la réaction de polymérisation et par conséquence sur la structure final de la lignine, cette particularité sera développée dans la partie suivante.

### IV.3. Modélisation des interactions lignine-polyosides

Dans la paroi végétale, la formation de liaisons covalentes peut être établie par un mécanisme d'addition nucléophile des polyosides (fonctions carboxyliques des acides uroniques ou groupements hydroxyl) sur le méthylène quinone MQ formée durant la réaction de polymérisation<sup>[59]</sup>. Cette réaction est directement en concurrence avec l'addition de l'eau. L'assemblage DHP-polyosides a fait l'objet de nombreuses études basées sur des approches modèles susceptibles d'expliquer ce mécanisme réactionnel.

Afin d'étudier cette réaction, plusieurs auteurs ont utilisés des modèles simple comme la réaction entre le MQ et des sucres (arabinose, galactose, acide glucuronique, etc...). Afin de déplacer la réaction en faveur de l'addition des sucres à la MQ, certains paramètres physico-chimiques de la réaction ont été modifiés, par exemple la durée et la température de la réaction de polymérisation<sup>[122,123]</sup>, la concentration en eau par utilisation de mélanges eau/solvants organiques<sup>[124-126]</sup>, ou le pH de la réaction<sup>[127]</sup>. Sipilä (1991) a réalisé la réaction entre la MQ et l'acide glucuronique dans un mélange dioxane/eau à pH 4 et à pH 6,

il a montré par RMN la formation des liaisons benzyl ester uniquement à pH 4<sup>[127]</sup>. Les travaux de Hemmingson et Leary (1978) ont rapporté que la formation des liaisons benzyle éther a été obtenue par l'intermédiaire des groupements hydroxyles primaires de glucose en milieu aqueux à 60°C avec un rendement de 48%<sup>[123]</sup>. De manière générale, tous ces travaux proposent que des conditions non aqueuses soient nécessaires pour l'addition nucléophile des polyosides au C $\alpha$  de la MQ.

Afin de mimer le milieu de la paroi végétale lignifiée, la concentration du milieu en polyosides a été prise en considération. A cette fin, plusieurs auteurs ont synthétisé des DHPs en présence de polyosides<sup>[118,128-136]</sup>. Toutefois, ces études modèles précisent que des liaisons covalentes entre la lignine et les polyosides peuvent être formées dans des solutions diluées de polyosides<sup>[128,132,134,135]</sup>. Par exemple, Higuchi et *al.* (1981) ont synthétisés des DHPs dans des tubes de dialyses en présence de mannanes, de pectines ou de xylanes<sup>[132]</sup>. Ils ont suggéré la formation de LCC uniquement en présence de mannanes et de pectines par une addition nucléophile, respectivement des groupement hydroxyles et carboxyles au C $\alpha$  de la MQ. Par ailleurs, Cathala et *al.*(2001) utilisant des techniques de fractionnement/dégradation, ont pu proposer que des liens covalents existent entre les pectines et les DHPs *via* l'acide galacturonique et le MQ<sup>[134,135]</sup>.

Néanmoins, le schéma de ce mécanisme réactionnel n'est pas totalement expliqué; la réactivité des espèces impliquées dépend en effet de plusieurs paramètres physico-chimiques de la réaction (concentrations locales, disponibilité des fonctions réactives, etc...) qui peuvent modifier les équilibres thermodynamiques et cinétiques et par conséquent rendre la réaction extrêmement complexe. La compréhension de la réaction de polymérisation doit prendre en compte la structure supramoléculaire et l'organisation des différents partenaires de la réaction, paramètres rarement considérés.

Dans le cas des graminées, des suspensions cellulaires de maïs ont été utilisées comme des modèles de parois primaires afin d'étudier les interactions lignine/arabinoxylanes *via* les acides phénoliques. Ces études ont mis en évidence que les arabinoxylanes interagissent avec la lignine selon deux mécanismes différents conduisant à la formation des liaisons de types éther et ester entre les deux polymères<sup>[89,105]</sup>. Le premier mécanisme est une addition nucléophile des groupements hydroxyles au C $\alpha$  de la MQ et la formation des liaisons de type  $\alpha$ -éther. Le second mécanisme est le plus favorable, c'est un couplage radicalaire qui ferait intervenir les acides phénoliques (plus de 90% des arabinoxylanes sont liés à la lignine par la voie oxydative)<sup>[55,105]</sup>. Le couplage des arabinoxylanes *via* des déhydrodimères puis leurs incorporation dans la lignine<sup>[54,55,111]</sup> conduit à la formation d'un réseau ternaire complexe et interconnecté. Ces résultats montrent que la paroi primaire des graminées devient intensivement réticulée par les monomères et les dimères d'acides férulique pendant la lignification.

Au delà de la réticulation covalente entre la lignine et les polyosides, la stabilité de ce système est potentiellement assurée par des liaisons non covalentes. La première question est la nature de ces liaisons (liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques, etc...) ainsi que leur mécanisme de formation. La deuxième question a attiré au rôle de ces liaisons dans la formation de la paroi végétale lignifiée. La mise en évidence de ces structures au sein des systèmes modèles devrait permettre de proposer des hypothèses sur leurs rôles dans la stabilité et la dynamique de ce système.

En effet, les monomères de lignine comportent plusieurs fonctions alcools et phénols susceptibles de réagir avec des polymères chargés *via* des liaisons hydrophobes, électrostatiques ou hydrogènes. Des simulations de dynamique moléculaire ont été utilisées

afin d'examiner la mobilité des composés modèles de lignine près d'une surface de cellulose<sup>[88]</sup>. Ces travaux suggèrent que les monomères et les oligomères de lignine s'adsorbent rapidement sur la surface des microfibrilles de cellulose. Ainsi, il semble fortement probable que les interactions électrostatiques soient principalement responsables de cette adsorption<sup>[88]</sup>. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de Shigematsu et al.(1994) qui suggèrent que les oses sont susceptibles de se lier aux monomères de lignine selon différentes manières et à des degrés divers. En effet, Shigematsu et al.(1994) ont montré que la solubilité des monomères de lignine augmente en présence des solutions osidiques<sup>[137]</sup>. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le nombre de groupements méthoxyles des monomères de lignine est faible. Ces résultats ont été complétés par d'autres approches permettant d'estimer une constante d'association entre les monomères de lignine et les oses<sup>[137]</sup>. Ces associations dépendent de la structure des monomères et du type des oses. Par exemple le monomère G a une plus grande d'affinité avec le xylose que le monomère S. De telles interactions peuvent affecter l'organisation spatiale de la lignine ainsi que le réseau lignine-polyosides et par conséquent l'architecture de la paroi. Dans le cas de l'association DHP-polyosides, Cathala et Monties (2001) ont synthétisé des DHP en présence de pectines<sup>[135]</sup>. Les auteurs ont montré que, la concentration en DHPs augmente dans la fraction soluble dans l'eau en fonction de la concentration de pectines. Compte tenu de l'insolubilité des DHPs en milieu aqueux, cet effet a été attribué à la solubilité des molécules de DHPs en présence de pectines. Ainsi, la solubilité de DHP et par conséquent la stabilité de l'ensemble est assurée par des liaisons non covalentes<sup>[135]</sup>.

Donc, les interactions non covalentes entre les polyosides et la lignine devraient être prises en compte afin de mieux appréhender les évènements physico-chimiques associés à la

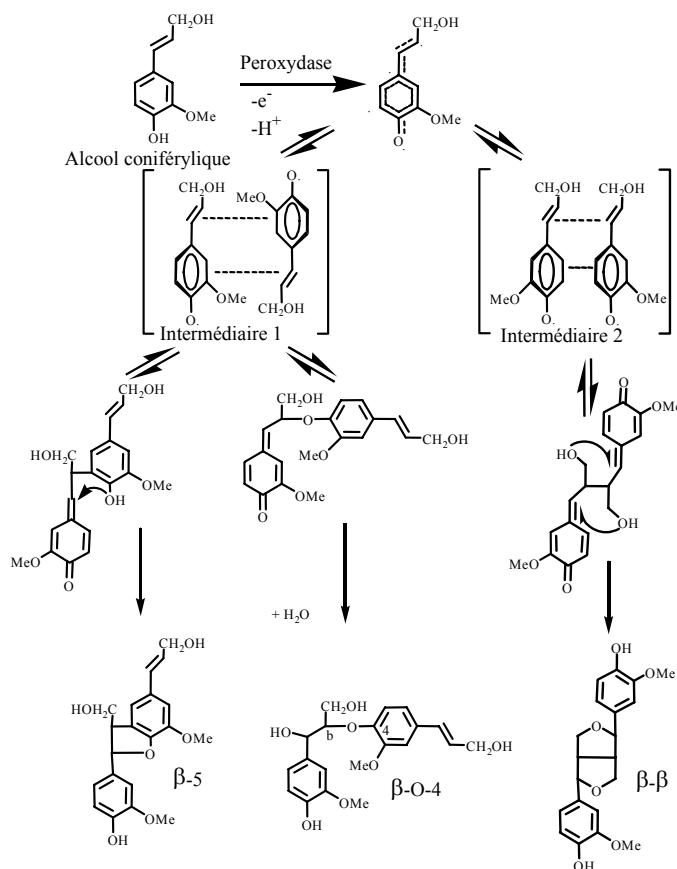
formation de la paroi végétale lignifiée. Les travaux réalisés à ce jour ont pu mettre en évidence un effet des polyosides sur la structure des DHPs qui se traduit notamment par une augmentation de la quantité des liaisons  $\beta$ -O-4 et de la masse molaire des DHPs dans de nombreux cas. Ces travaux soulignent le fait que l'état physique du milieu de polymérisation est critique pour la structure et l'ultrastructure de DHP.

### IV.3.1. Effet sur la structure chimique

Parmi les paramètres influençant la réaction de polymérisation des lignines, l'effet de différents polyosides a été étudié. Ces travaux ont montré l'évolution de liaisons  $\beta$ -O-4 en présence de polyosides dans de nombreux cas, la comparaison entre ces travaux reste néanmoins très complexe. En effet dans le cas de pectines, Terashima et *al.*(1995) ont montré que le taux de liaisons  $\beta$ -O-4 augmente en présence de pectines<sup>[129,130]</sup>, plus tard Cathala et *al.*(2001) ont démontré l'inverse<sup>[134]</sup>. De même, Higuchi et *al.*(1981) ont montré que la polymérisation de l'alcool coniférylique dans des tubes de dialyses en présence de mannanes et de pectines affecte la structure de DHP. Par contre, la présence de xylanes n'a aucun effet<sup>[132]</sup>. Ces résultats contradictoires peuvent être liés à la structure de polyosides utilisés mais également aux conditions physico-chimiques de polymérisation. L'augmentation des liaisons  $\beta$ -O-4 a été souvent attribuée à la solubilité du monomère de lignine en présence de polyosides<sup>[135,137]</sup>, qui favoriserait le couplage entre monomère et oligomères<sup>[129,130]</sup> provoquant la formation d'un polymère de type « end wise »<sup>[58]</sup>.

Un résultat similaire (augmentation de taux des liaisons  $\beta$ -O-4) a été obtenu en réalisant la polymérisation de l'alcool coniférylique dans un mélange eau/méthanol<sup>[138]</sup> ou dans le 1,4-dioxane<sup>[139]</sup>. Chioccara et *al.*(1993), ont montré une augmentation des liaisons  $\beta$ -O-4 suite à

l'augmentation de la proportion de méthanol dans le milieu réactionnel et par conséquent la diminution de la polarité<sup>[138]</sup>. Ils ont attribué ce phénomène à un mécanisme faisant intervenir des équilibres réversibles entre les complexes  $\pi$  formé par deux radicaux. Le couplage de deux radicaux dépend alors de l'énergie d'activation nécessaire pour atteindre l'état de transition (Figure 16) modifiant ainsi les proportions relatives des différents dimères



**Figure 16 :** Mécanisme de formation des dimères de l'alcool coniférylique<sup>[138]</sup>.

D'après, ces travaux, le paramètre « concentration locale », c'est à dire présence des polyosides mais également la polarité du milieu réactionnel a un effet remarquable sur l'orientation de la réaction de la polymérisation et par conséquent sur la structure finale de la lignine.

### IV.3.2. Effet sur les particularités macromoléculaires

Dans la plupart des cas, la polymérisation des monomères de lignine en présence des polyosides se traduit par une augmentation de la masse molaire comparé à un DHP synthétisé en milieu tamponné<sup>[118,134,135]</sup>. Compte tenu de l'insolubilité des lignines en milieu aqueux, cet effet a été attribué à la solubilité des molécules de DHPs en présence de polyosides<sup>[135,137]</sup>. Cet état d'organisation favoriserait les couplages entre monomères et oligomères qui conduisent à la formation d'un polymère « end wise » de haut poids moléculaire<sup>[117]</sup>. Ces travaux soulignent que la présence de polyosides dans le milieu de polymérisation est critique pour la structure des DHPs

### IV.3.3. Effets sur l'ultrastructure

Certains travaux ont démontré que la présence de polyosides affecte également l'ultrastructure des DHPs et la structure du complexe polyosides/lignine. Par exemple, les travaux de Higuchi et *al.*(1981)<sup>[132]</sup>, ont montré par des observations microscopiques (Microscopie Electronique à Balayage: MEB) que la structure des complexes DHP/mannanes et DHP/pectines apparaît sous forme de film, c'est à dire que les nodules de DHP sont dispersés dans le réseau de polyosides. Par contre, la morphologie du complexe DHP/xylanes est complètement différente et correspond à une structure granulaire<sup>[132]</sup>. Les auteurs ont suggéré que cette différence de morphologie est la confirmation de la formation de LCC uniquement en présence de mannanes et de pectines, les xylanes ne semblent pas du tout réagir avec les DHPs.

Afin de mieux prendre en compte l'organisation de la paroi végétale lignifiée, un mélange ternaire « cellulose/pectine/DHPs » a été récemment obtenu en tant que modèle des parois végétales lignifiées de réseau dense et interpénétré<sup>[136,133]</sup>. Ces travaux montrent

que la présence de pectine dans le milieu de polymérisation affecte également l'ultrastructure des DHPs. L'observation de ces mélanges par MEB a mis en évidence que les nodules de DHP sont complètement dispersés en présence de pectines. Par contre, dans le cas du mélange cellulose/DHP, les nodules ovoïdes de DHP ne semblent pas réagir avec la cellulose.

L'ensemble de ces travaux indique que la polymérisation de lignine est très sensible aux paramètres physico-chimiques du milieu de réaction. Par conséquent, non seulement la polymérisation de lignine peut être partiellement affectée par la voie biosynthétique de monolignols et le système d'oxydation enzymatique mais également la structure et l'organisation spatiale de lignine peuvent être indirectement modulées par une modification de la quantité et de la structure des polyosides sans autre variation du système de polymérisation.

La structure supramoléculaire et l'organisation des différentes partenaires de la réaction sont des paramètres rarement considérés. Toutefois, les travaux de Cathala et *al.*(2005)<sup>[136,140]</sup> ont montré récemment que la polymérisation de l'alcool coniférylique en présence des pectines conduit à la formation d'agrégats stables de pectines/DHPs. Une étude de l'organisation et la formation de ces agrégats, au moyen de sondes fluorescentes tel que le pyrène, montre l'apparition de domaines hydrophobes. L'organisation supramoléculaire de ces polymères au sein de ces agrégats a été étudiée en utilisant d'une part la diffusion de la lumière et d'autre part la diffusion des neutrons aux petits angles au moyen d'une stratégie de contraste isotopiques. Les résultats obtenus montrent que les pectines et les DHP présentent une séparation de phase à courte échelle (la dizaine de nanomètre) ; des zones riches en DHPs et des zones riches en pectines ont été mises en évidence. En revanche à plus grande échelle (10-100 nm) les pectines et les DHPs participent au même complexe. Cette conclusion est cohérente avec les observations faites en microscopie électronique sur des parois en cours de lignification qui montrent que ce processus débute de façon non homogène par la formation

## **Synthèse bibliographique**

---

de nodules nanométriques de lignine<sup>[141]</sup>. Ensuite, lorsque la concentration en DHP augmente, les agrégats se densifient conduisant à une diminution de la teneur en eau. Cette situation a pu notamment être observée dans le cas de la polymérisation des monomères de lignine à l'interface eau/air<sup>[142]</sup>. Ces résultats mettent en évidence un effet d'hydrophobicité de la paroi lors de la lignification<sup>[143]</sup>. L'ensemble des données précédentes souligne la nécessité d'appréhender les interactions et la structure supramoléculaire à l'échelle nanométrique. Ces informations seront utiles afin de bien comprendre la cohésion des parois pour favoriser leur fractionnement.

# Chapitre n° 1

# Chapitre n° 1

*Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation*

**(Publication n°1, accepté à *Planta*).**



(publication n°1: accepté à Planta)

**Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins  
formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of  
lignin carbohydrate complex formation**

Abdellatif Barakat<sup>1</sup>, Heiko Winter<sup>2</sup>, Corinne Rondeau-Mouro<sup>3</sup>, Bodo Saake<sup>2</sup>,  
Brigitte Chabbert<sup>1</sup>, Bernard Cathala<sup>1-3\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Recherche Agronomique; Unité Mixte de Recherche Fractionnement  
des AgroRessources et Emballages, Equipe Parois et Matériaux Fibreux, 2 Esp. R. Garros,  
51686 Reims Cedex 2, France

<sup>2</sup> Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Chemistry and  
Chemical Technology of Wood, Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Biopolymères Interactions et  
Assemblages, rue de la géraudière BP 71627 44316 Nantes Cedex 3, France



# Studies of xylan interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization: a model study of lignin carbohydrate complex formation

Abdellatif Barakat · Heiko Winter ·  
Corinne Rondeau-Mouro · Bodo Saake ·  
Brigitte Chabbert · Bernard Cathala

Received: 26 October 2006 / Accepted: 3 January 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** The mechanism of lignin carbohydrate complex formation by addition of polysaccharides on quinone methide (QM) generated during lignin polymerisation was investigated using a model approach. Dehydrogenation polymers (DHPs, lignin model compounds) were synthesized from coniferyl alcohol in the presence of a glucuronoarabinoxylan (GAX) extracted from oat spelts, by Zutropfverfahren (ZT) and Zulaufverfahren (ZL) methods. The methods ZT and ZL differed in their distribution of QM over the reaction period but generated roughly the same QM amount. Steric exclusion chromatography of the ZT and ZL reaction products showed that only the ZT reaction produced high molar mass compounds. Covalent linkages in the ZT reaction involving ether bonds between GAX moiety and  $\alpha$  carbon of the lignin monomer were confirmed by  $^{13}\text{C}$  NMR and xylanase-based fractionation. The underlying phenomena were further investigated by examining the interactions between GAX and DHP in sorption experiments. GAX and DHPs were shown to interact to form hydrophobic aggregates. In the ZT process,

slow addition permitted polymer reorganisation which led to dehydration around the lignin-like growing chains thereby limiting the addition of water on the quinone methide formed during polymerisation and thus favoured lignin–carbohydrate complex (LCC) formation.

**Keywords** Aggregation · Carbohydrate complex · Dehydrogenation polymers (DHP) · Glucuronoarabinoxylan · Lignin

## Abbreviations

CA	Coniferyl alcohol
CPMAS	Cross polarization magic angle spinning
DHP	Dehydrogenation polymer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
GAX	Glucuronoarabinoxylan
HPAEC	High-pressure anion exchange chromatography
LCC	Lignin–carbohydrate complex
LiBr	Lithium bromide
NMR	Nuclear magnetic resonance
QM	Quinone methide
SEC	Steric-exclusion chromatography
ZL	Zulaufverfahren
ZT	Zutropfverfahren

A. Barakat · B. Chabbert  
Unité Mixte de Recherche Fractionnement des AgroRessources et Emballages, Institut National de la Recherche Agronomique, Equipe Parois et Matériaux Fibreux, 51686 Reims Cedex 2, France

H. Winter · B. Saake  
Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Chemistry and Chemical Technology of Wood, Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany

C. Rondeau-Mouro · B. Cathala (✉)  
Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique, Rue de la géraudière, 44316, BP 71627, Nantes Cedex 3, France  
e-mail: cathala@nantes.inra.fr

## Introduction

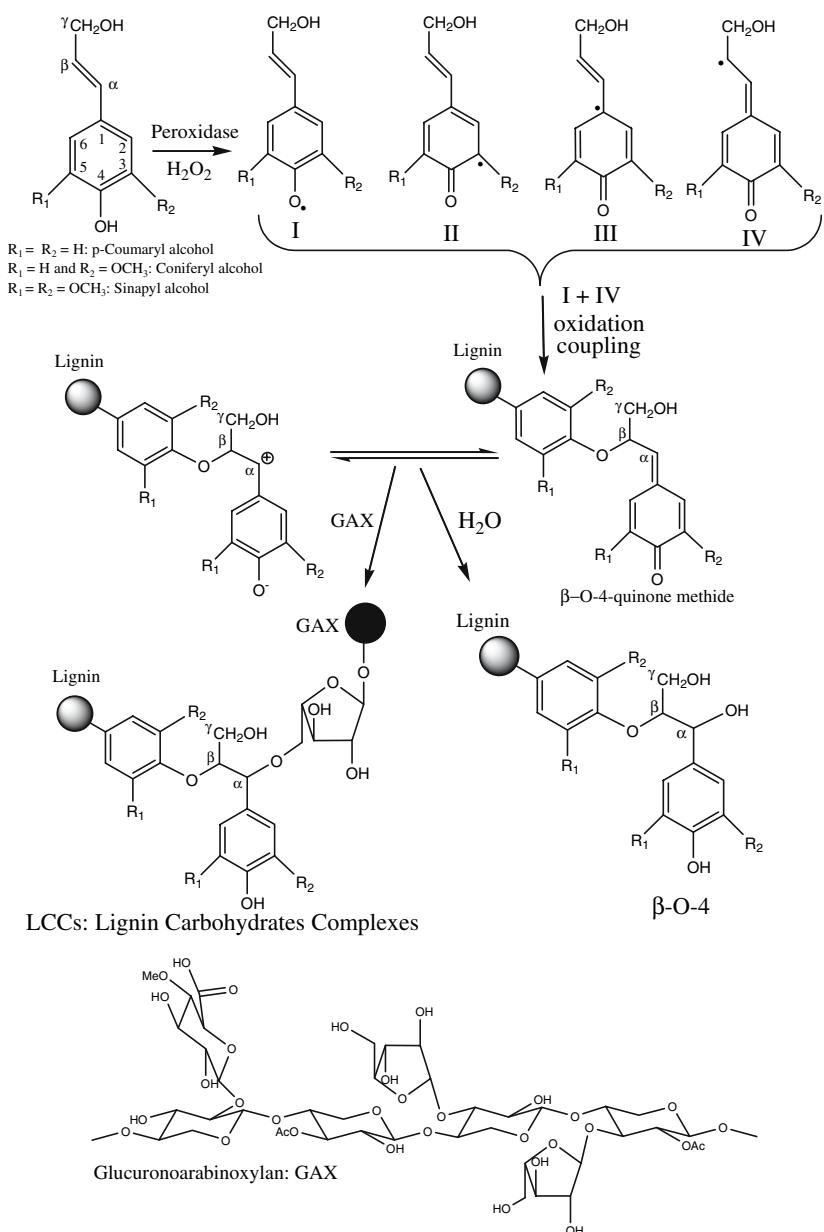
Lignified plant cell wall is formed by successive deposition of cellulose, hemicelluloses and lignins to form a composite in which component polymers are physically and chemically bound to each other. This mechanism of biogenesis is important in determining the ultrastructure of

lignified plant cell walls and thus their physical and chemical properties. Cell wall formation ended by lignin deposition according to the dehydrogenative polymerisation of monolignols (*p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols, Fig. 1; Terashima et al. 1993). Lignin polymerisation therefore occurs within a water swollen polysaccharide gel. During this process, polysaccharides and lignin are covalently linked through lignin–carbohydrate complexes, as demonstrated several decades ago by Björkman (1957). These covalent links are important in the biological roles of plant cell walls (mechanical resistance, protection against pathogens) and in the ability of the cell wall to be transformed for application purposes (production of pulp or chemicals, biodegradation, etc). Comprehension of the

interactions between lignin and polysaccharides and their formation processes may therefore be helpful in understanding cell wall architecture. Such information could also be used to improve the fractionation and transformation of cell-wall-related products.

Two main processes are involved in the mechanism of lignin–carbohydrate complex (LCC) formation. The first is based on oxidative coupling of the phenolic components of the plant cell wall (Fry 1986; Grabber et al. 2000). The polymerisation of monolignols in the presence of feruloylated polysaccharides, for example, has been described as a very efficient way of coupling polysaccharides to the lignin network (Grabber et al. 2000, 2002). These processes are restricted to herbaceous species and are thought to occur in

**Fig. 1** Addition of nucleophiles to the quinone methide intermediate generated during the dehydrogenation of coniferyl alcohol. Addition of water will form the  $\beta$ -O-4 linkages whereas addition of polysaccharide will form lignin–carbohydrate complex. Thus, LCC formation competes with  $\beta$ -O-4 formation. In hydrated media the latter process will be prominent



the early stages of lignification. The second process, ubiquitous in all lignified walls, involves the addition of nucleophilic groups on the transient quinone methide (QM) intermediate generated during the oxidative polymerisation of lignin (Takahashi and Koshijima 1988; Xi et al. 2000; Terashima 2001; Fig. 1). Studies on cell wall materials have indicated that these linkages represent a non negligible part of the lignin unit (Terashima 2001). However, the complete process of LCC formation is not fully understood since many nucleophiles (i.e. hydroxyl or carboxylic groups of hemicelluloses, phenols, water) are present in the cell wall. Due to their similar nucleophilic potentials, competition based on ratio concentration may occur between them. Some works based on model studies have demonstrated this competition and emphasized the fact that the addition of hemicellulose to quinone methide may be limited by competition of the water addition. For instance, the addition of neutral monomeric sugar to QM does not occur even in a buffered 1:3 dioxane solution containing ten equivalents (compared to QM) of methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (Sipilä 1990). Thus, to displace the reaction in favour of LCC formation, several authors increased the reaction duration and temperature (Hemmingsson and Leary 1975), or limited the water concentration either by introducing aqueous/organic solvent mixtures (Sipilä 1990) or high saccharide concentrations (Tanaka et al. 1976) which suggests that nonaqueous conditions are necessary for LCC formation. All these hypotheses show some consistency with the cell wall conditions during lignification. However, other model studies have shown that LCC can be formed in a dilute aqueous solution of hemicelluloses (Ohnishi et al. 1992; Cathala and Monties 2001). The present work develops the hypothesis that LCC formation is not only under the kinetic control of water/polysaccharide competition. Local structural heterogeneities may also affect this process such as the formation of aggregates stabilized by noncovalent interactions between hemicelluloses and lignin. These supramolecular structures change the local environment of the reaction by lowering the local water concentration and thus affect (or control) the LCC formation.

In the present study, dehydrogenation polymers (DHPs, lignin model compounds) were synthesized in the presence of a glucuronoarabinoxylan (GAX) extracted from oat spelts, since GAX is the major hemicellulose present in angiosperms. The GAX sample used in this study was free of phenolic acids and permitted focus on the QM pathway of LCC formation. DHPs were synthesised according to the Zulaufverfahren (ZL) and Zutropfverfahren (ZT) methods. The first one consists in the simultaneous adding of all reactants whereas, in the later one, reagents are slowly added. The major difference between ZL and ZT polymerisation lies in the distribution of the radical over the

reaction period. All other physicochemical parameters remain identical in both methods, notably the amounts of quinone methide generated during the reactions. This comparison can be used to evaluate the competition occurring between water and polysaccharide. Steric-exclusion chromatography (SEC) analysis of the ZL and ZT reaction mixtures revealed the formation of a high molar mass product in ZT only. The occurrence of covalent linkages in the ZT products was confirmed by NMR and xylanase-based fractionation, and indicated that LCC formation was not only under kinetic control. We also demonstrated that interactions between GAX and DHP resulted in the formation of hydrophobic micro-domains.

## Materials and methods

### Extraction and purification of oat spelt GAX

The GAX sample was produced by successive extraction and fractionation (Winter et al. 2006). The starting material was extracted from oat spelts with 5% (w/v) NaOH at 90°C and purified by washing with methanol/water (60/40 v/v), methanol and ether. The purified sample was bleached with 3% ClO<sub>2</sub> at 70°C and 25% concentration (w/w) for 3 h, dissolved in water (concentration 5% w/v; 100°C for 20 min, shaken over night at 20°C) and centrifuged (20 min, 2,800 g) to remove the insoluble fraction. The supernatant was freeze dried (Alpha 2-4 LSC, Christ, Osterode am Harz, Germany), and yielded the water-soluble fraction GAX. The physicochemical characteristics of this fraction are presented in Table 1.

### Synthesis of unlabelled and labelled coniferyl alcohol (4-hydroxy-3-methoxy cinnamyl alcohol)

Coniferyl alcohol was obtained using the procedure described by Ludley and Ralph (1996). Synthesis of  $\alpha^{13}\text{C}$

**Table 1** Physicochemical characteristics of oat spelt glucuronoarabinoxylan

Sugars composition (%)	Glucuronoarabinoxylan
Uronic acids	6.2
Ara	15.1
Xyl	64.7
Gal	5.5
Glc	4.5
Ara/Xyl	0.23
Mw (g/mol)	43000

*Ara* Arabinose, *Xy* xylose, *Ga* galactose, *Glc* glucose, *Ara/Xyl* molar ratio of L-arabinose to D-xylose, *Mw* weight average molar mass equivalent to pullulan standards

coniferyl alcohol was achieved according the previously published synthesis (Terashima 1996). Spectra of labelled and nonlabelled product were identical.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz), 6.89 (m, 3H), 6.53 (d, 1H), 6.21 (d, 1H), 4.18 (d, 2H), 3.85 (s, 3H).

#### Polymerisation of coniferyl alcohol in glucuronoarabinoxylan solution

In both ZT and ZL, the DHPs were prepared with and without (control) GAX. Control DHPs were used for the sorption experiment and physical mixture. Three solutions were prepared for the polymerisation experiments. Solution A 100 mg of GAX dissolved in 100 ml of phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0). Solution B 100 mg of coniferyl alcohol labelled or unlabelled (0.56 mmol) in 3 ml of dioxane and 22 ml of GAX (1 g/l) in phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0). Solution C 0.1 ml (2 eq compared to coniferyl alcohol) of hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35% wt in water) in 25 ml of GAX (1 g/l) in phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0). For the end-wise polymerisation, ZT method, solutions B and C were gradually added to 50 ml of solution A, containing 5 mg of peroxidase (EC 1 11.1.7, 250–330 unit/mg, purchased from Sigma), for 4 h at 25°C. For the ZL method, all reagents were added simultaneously to 50 ml of solution A containing 5 mg of peroxidase. The reaction mixture was stirred for 4 h at 25°C. DHP controls without GAX were prepared in phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0).

The concentrations of all the reagents in the ZL and ZT experiments are reported in Table 2. The total concentrations of QM able to react with water or GAX were estimated from the  $\beta$ -O-4 contents of ZL and ZT products synthesized under similar conditions (Cathala et al. 1998).

#### Monosaccharide composition determination

The neutral and acidic carbohydrates were identified and quantified by high-pressure anion exchange chromatography (HPAEC). Samples were hydrolysed with 12 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  acid for 2 h at room temperature, then diluted at 1.5 M and

allowed to react for 2 h at 100°C. All samples were then filtered (0.45 µm) before injection onto a CarboPac PA-1 anion exchange column (4 × 250 mm, Dionex, Voisins les bretonneux, France). Monosaccharide composition was analysed and quantified using L-fucose as the internal standard and standard solutions of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-galactose) and uronic acids (D-galacturonic and D-glucuronic acids).

#### NMR spectroscopy

Solid-state NMR experiments were performed on a Bruker DRX 400 spectrometer (100.62 MHz for carbons; Wissembourg, France). The CPMAS (cross polarization magic angle spinning) experiments were performed using a double resonance H/X CP-MAS 4 mm probe at a spinning rate of 10,000 Hz. The pulse sequence operated with a 3.75 µs 90° proton pulse, a 1 ms contact time at 62.5 kHz, a 3 s recycle time for an acquisition time of 34 ms during which dipolar decoupling (TPPM) was applied at 67 kHz. 1,024 scans were acquired at ambient temperature (294 ± 1 K) and no line broadening was applied in order to perform the spectral decomposition. Chemical shifts were calibrated with external glycine, (carbonyl carbon at 176.03 ppm). The software used to decompose each spectrum was based on the SIMPLEX method (Lorentzian/Gaussian 50/50 line type).

Liquid-state NMR spectra were recorded on a Bruker ARX 400 spectrometer operating at a carbon frequency of 100.62 MHz. The NMR experiments were realized in  $\text{DMSO-d}_6$  using a single pulse detection of carbon with power-gated  $^1\text{H}$  decoupling. The 90° carbon pulse was set to 11.25 µs and a proton decoupling (WALTZ16) of 3 kHz was applied during acquisition (1.25 s) but also during the recycle delay (5 s) in order to gain signal by nuclear-overhauser enhancement (NOE; Kuhlmann and Grant 1968). Each NMR experiment was realized at 313 K with 22 K scans and calibration of the carbon chemical shifts were realised using the carbon signal of DMSO as an internal reference.

**Table 2** Total concentration of CA, QM and arabinose and concentration ratio of the reactants calculated at the maximum of their concentration in the GAX-DHP ZL and GAX—DHP ZT reaction

	GAX-DHP ZL reaction	GAX-DHP ZT reaction
Total coniferyl alcohol concentration (mM)	2.77	2.77
Total QM concentration (mM) (based on $\beta$ -O-4 content ZL 12%; ZT 15% determined by thioacidolysis (Cathala et al. 1998))	3.3	0.416
Xylose + arabinose monomers concentration (mM)	0.312	0.312
[GAX]/[QM] at the maximum concentration of QM (i.e. at $t = 0$ for ZL and after 3 min for ZT)	9.45	182
$[\text{H}_2\text{O}]^{\text{a}}/[\text{QM}]$	$16.6 \times 10^3$	$3.179 \times 10^6$

<sup>a</sup>  $[\text{H}_2\text{O}] = 55 \text{ M}$

## Size exclusion chromatography in dimethyl sulfoxide (DMSO)/water (9/1 v/v) containing 50 mM of LiBr

Analysis was performed using a multi-detection system consisting of a UV-Detector (LC 1200 UV/VIS-detector, Polymer Laboratories, Marseille, France), and a RI-detector (Shodex RI-71, Sopares, Gentilly, France). A set of GRAM columns from Polymer Standard Service (Mainz, Germany) was used (3, 100, 300 nm, each 8 × 300 mm). The eluent was a mixture of DMSO/water (9/1 v/v) containing LiBr 50 mM. The flow rate was 0.4 ml/min at 60°C. Samples were dissolved in the eluent at a concentration of 4 mg/ml for 1 h at 95°C, followed by 23 h at 40°C (Saake et al. 2001). Samples were filtered through regenerated cellulose membranes (0.45 µm). The percentage recovery after filtration, based on UV absorbance, was better than 75% in all cases. The molar masses were determined using a calibration with pullulan standards. Collection and calculation of the data was performed using WINGPC 4.6 software of Polymer Standard Service.

## Enzymatic degradation and fractionation of GAX–DHP ZT polymerisation

Solutions of GAX ZT polymerisation were incubated with endo- $\beta$ -1,4-xylanase solution (*Ecopulp TX 200C*; Röhm Enzym, Rajamäki Finland, SHARE 1031 7143). Enzyme was added at 200 nkat/g of GAX at 55°C for 1 h, under stirring. After treatment, the enzyme was inactivated by boiling at 100°C for 5 min. A reference solution of GAX/DHP (without enzyme) was treated under the same conditions. A precipitate was formed only with the xylanase treated sample and was collected by centrifugation. The supernatant was concentrated under reduced pressure to obtain the water-soluble fraction ( $W_{\text{SOL}}$ ). The precipitate was poured into 95% aqueous dioxane and the supernatant and residue separated by centrifugation to obtain a dioxane-soluble fraction ( $D_{\text{SOL}}$ ) and a residue, the dioxane-insoluble fraction ( $D_{\text{INS}}$ ). All fractions were freeze-dried.

## Sorption experiments of GAX to DHP

Sorption assays were performed in phosphate buffer (1/30 N; pH 5). GAX solutions were diluted to give a range of concentrations (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mg/ml) from a stock solution of GAX prepared at 1 mg/ml. An aliquot of 1.5 ml was added to DHP samples (7.5 mg). GAX solutions and GAX DHP blends were incubated for 4 h at 25°C. After incubation, the samples were centrifuged at 7,700 g for 20 min. Unbound GAX present in the supernatant was quantified by HPAEC. The adsorbed GAX amounts were calculated from the difference between the GAX concentrations in the supernatant before and after

adsorption. The DHP concentrations in the supernatant were determined from their absorbance at 280 nm. The supernatant solutions were then studied by fluorescence probe with pyrene.

## Detection of hydrophobic microdomains by fluorescent probe

All spectra were recorded on a SPEX Fluoromax spectrophotometer (Edison, NJ, USA) equipped with thermostatic controlled cell at 25°C. A fixed amount of pyrene ( $1.6 \times 10^{-6}$  M in the final solution) was added to the supernatant from the sorption experiments and samples, which were allowed to equilibrate overnight prior to fluorescence measurement. The samples were excited at 341 nm and emission spectra were recorded between 350 and 500 nm with a slit width of 1 mm for the excitation slit and 5 mm for emission. The relative intensity of peaks 1 ( $\lambda = 372$  nm) and 3 ( $\lambda = 382$  nm) was used to determine the local polarity of the medium surrounding the pyrene molecules.

## Results

### Dehydrogenative polymerisation of coniferyl alcohol in GAX solution by ZL and ZT methods

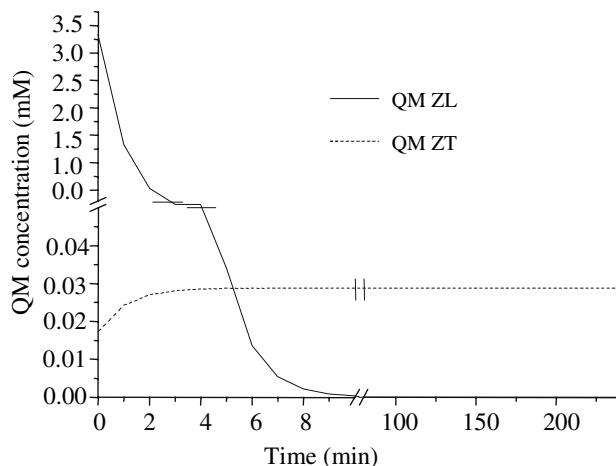
The polymerisations by ZT and ZL methods differed in the speed of reagent addition. In the ZL process all reactants were added simultaneously whereas in the ZT method they were added gradually (dropwise). The two methods therefore differed mainly in their distribution of radicals (and thus the associated QM) over the reaction time. Assuming the immediate oxidation of CA in the medium, the minute-by-minute distribution of QM throughout the reaction period was calculated for ZT and ZL according to the following equations:

$$[\text{QM}]_{\text{ZL}t} = [\text{QM}]_{\text{tot}} e^{-kt}$$

$$[\text{QM}]_{\text{ZT}t} = [\text{QM}]_{\text{tot}} / 14400 - [\text{QM}]_{t-1} e^{-kt}$$

where  $k$  is the observed rate constant of QM in water measured previously by Hemmingson and Leary ( $1.18 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ ; Hemmingson and Leary 1975) and 14,400 s is the reaction time (Fig. 2).

Both reactions produced a colloidal suspension in the presence of GAX, in contrast to the reference polymerisation performed in phosphate buffer without GAX. This suggests an interaction between GAX and DHP. An effect of polysaccharide on DHP solubility had already been noted in the presence of pectin (Cathala and Monties

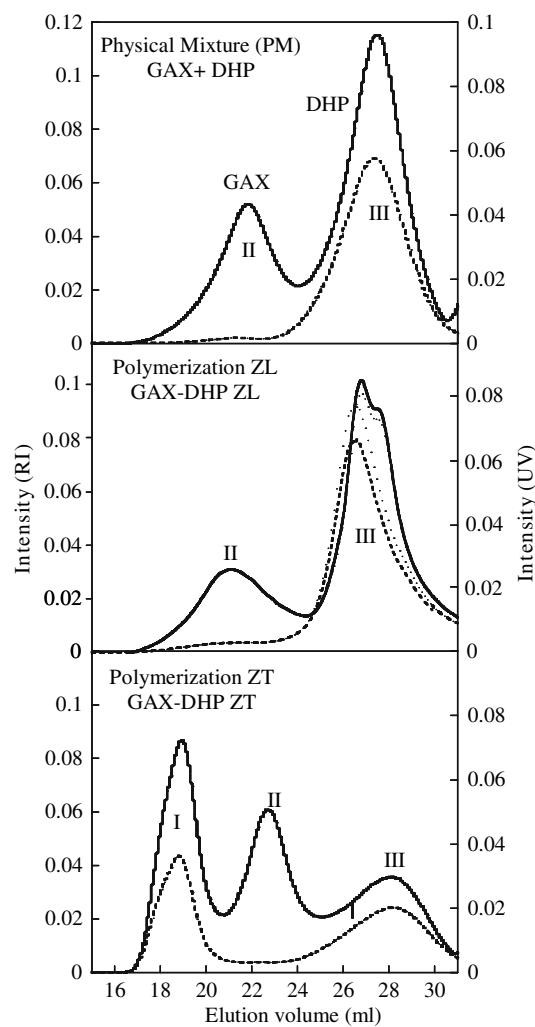


**Fig. 2** Evolution of QM concentration during the ZL and ZT reactions. In the ZL reaction all the QM has reacted during the first minutes whereas in the ZT the level of QM remains low but constant all over the reaction. QM concentration is expressed as instantaneous concentration (i.e. concentration is calculated every minute)

2001). The possible formation of LCC in both syntheses was evaluated by SEC and NMR spectroscopy.

Size-exclusion chromatography (SEC) in dimethyl sulfoxide DMSO/water/lithium bromide in the ZT and ZL GAX reaction mixtures

DMSO containing 50 mM of LiBr at 60°C was used as solvent, since this mixture can solubilize both lignin and GAX and also dissociates most of the noncovalent interactions because of solvent polarity and the chaotropic effects of the lithium bromide combined with elution at high temperature. The SEC device was equipped with a differential refractive index (DRI) and ultraviolet (UV) detectors. The DRI is a universal detector which is sensitive to any kind of molecule dissolved in the solvent—in this case, polysaccharides and lignin—, whereas the UV system is specific to UV-absorbing materials, here DHPs. We confirmed that the noncovalent interactions between GAX and DHP were dissociated in our chromatographic system by first analysing a physical mixture (PM; mixture of GAX and ZL DHPs) obtained by suspending DHP in an aqueous GAX solution (Fig. 3a). After stirring, the suspension was freeze-dried, dissolved in DMSO/LiBr and injected into the SEC system. Two peaks were clearly distinguishable, the first (eluted around 22 ml) displayed a strong RI signal and hardly any UV absorption whereas the second (eluted around 28 ml) presented both UV and RI signals. Comparisons with pure standards confirmed that the peak at 22 ml corresponded to GAX and the other to the DHP fraction (data not shown). The evaluation of molar mass indicated an absence of significant variation in comparison with the starting materials and thus confirmed the ability of



**Fig. 3** **a–c** Elution profiles in DMSO of physical mixture (PM GAX + DHP **a**), GAX-DHP ZL product (polymerization ZL **b**) and GAX-DHP ZT (polymerization ZT **c**) (filled line), refractive index (RI signal); (filled dot line), absorbance at 280 nm (UV signal). The peak I (19 ml) occurs only in the ZT polymerization

our chromatographic system to limit DHP–GAX interactions. Two peaks, corresponding to GAX and DHPs, were again detected in the ZL experiments (Fig. 3b). However, careful examination of the molar mass revealed that the peak eluted around 22 ml presented a higher molar mass than pure GAX (Table 3) suggesting that some limited coupling may have occurred. This hypothesis was supported by the associated UV signal which also seemed to be more intense than in the PM profile. Three distinct populations were clearly visible in the case of GAX ZT (Fig. 3c). Peak I presented both UV and RI signals suggesting the presence of GAX and DHPs. The low elution volume (19 ml) indicated the presence of species with very large molar mass (Table 3) which could be attributed to covalent complexes between GAX and DHPs. This peak was absent from the PM and GAX–ZL profiles thus

**Table 3** Molar mass values of GAX-DHP ZT, GAX-DHP ZL and physical mixture (PM)

Product	GAX + DHP Physical mixture (PM)		GAX–DHP ZL Polymerization		GAX–DHP ZT Polymerization		
	II	III	II	III	I	II	III
Peaks							
Content (%)	49	51	48	52	36	37	27
Mw (g/mol) $\times 10^{-3}$	43	1.7	132	1.9	904	36	0.96

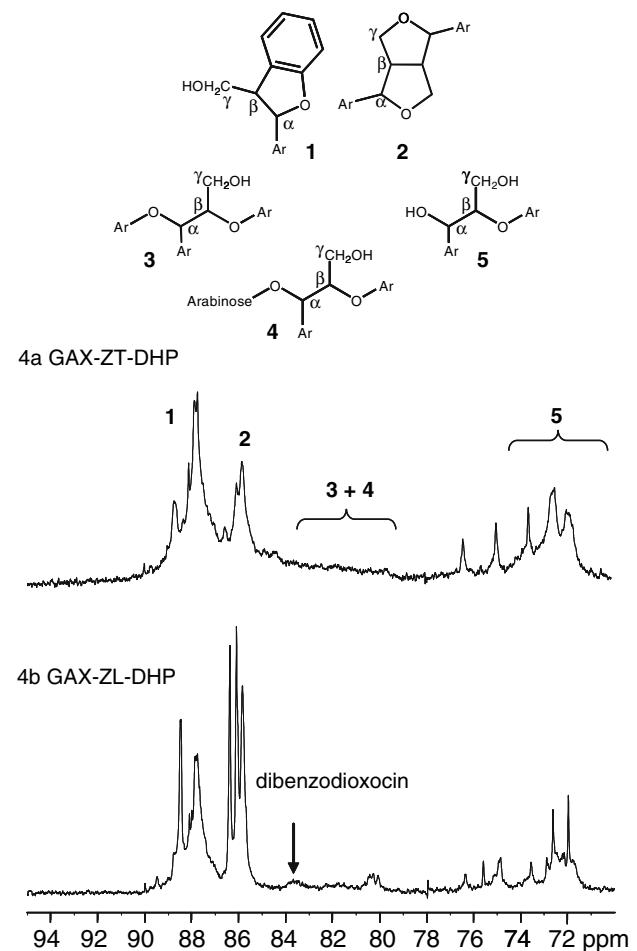
Mw Weight average molar mass equivalent to pullulan standards

hypothesis of covalent complex occurring in this reaction can be proposed. This assumption is supported by the determination of the ratio between the RI and UV signals. The ratio measured for the peak eluted at 19 ml of the GAX–ZT reaction profiles is higher (2.45) compared to those measured in the peaks eluted around 28 ml in the physical mixture (1.66), the GAX–DHP ZL reaction (1.52) and the GAX–ZT reaction (1.7). This indicates the presence of nonabsorbing materials, i.e. xylans in the peak eluted at 19 ml. The second peak of the ZT elution curve was similar to that observed in the PM profile and corresponded to the GAX fraction. This hypothesis was supported by the low intensity of the UV signal, compared to the RI signal. Peak III had a larger elution volume (28 ml) and consisted of smaller molecular weight species that, according to their UV signal, could be attributed to DHP. It was concluded from this set of experiments that peak I observed in the ZT experiment could be attributed to a covalent complex that was not formed in the ZL experiment.

#### NMR analyses of ZT and ZL GAX–DHP

Solution-state  $^{13}\text{C}$  NMR is a powerful method for revealing the structure of soluble lignin fragments. However, the presence of carbohydrates in the same spectra together with the low abundance of some linkages such as LCC, obscure the signals. Thus, one strategy usually reported in literature, consist in the use of  $^{13}\text{C}$  labelled lignin monomers to increase the sensitivity of the analysis. This was used both in the case of synthetic (Parkas et al. 2001) and natural lignin (Terashima et al. 2002) and also applied to the investigation of LCC (Xi et al. 2000). Solution state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the ZL and ZT GAX–DHPs reaction obtained from  $\alpha$  labelled coniferyl alcohol are reported in Fig. 4a and b. The peaks that can be discerned in the ZL–GAX  $^{13}\text{C}$ -enriched DHPs were assigned according to Parkas et al. (2001; Fig. 4a; Table 4). Signals around 73 ppm (peaks noted 5) can be assigned to the C $\alpha$  in the arylglycerol- $\beta$ -aryl ether structures. C $\alpha$  in  $\beta$ - $\beta$  structures can be attributed to the signals occurring around 86 ppm (peak noted 2) and close to the  $\beta$ -5 linkages (88 ppm, peak 1). Another signal arises at 83.5 ppm which can be assigned to the dibenzodioxocin linkages. C $\alpha$  in  $\beta$ -O-4/ $\alpha$ -

O–R (R can be a polysaccharide or a phenol) structures are expected to have an intermediate chemical shift around 80–82 ppm (peaks 3 + 4). Only a minor peak can be seen in this region for the ZL spectra. The general pattern of the ZT spectra is similar to the ZL one. However, all the signals are broader displaying a lower resolution. The other main modification concerns the region between 80 and 84 ppm that displays a very broad and irresolute signal while the peaks at 81 and 83.5 observed in the ZL spectra are not anymore visible. Broadening of the signal likely reflects the higher molar mass of the ZT sample compared



**Fig. 4** Liquid  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of GAX–ZL–DHPs (a) and GAX–ZT–DHPs (b) obtained from  $\alpha^{13}\text{C}$  labelled coniferyl alcohol

**Table 4** Chemical shifts and relative bond frequencies for  $\alpha$  carbon (expressed as relative percentages) of GAX-ZL-DHPs and GAX-ZT-DHPs synthesized with  $\alpha^{13}\text{C}$  coniferyl alcohol

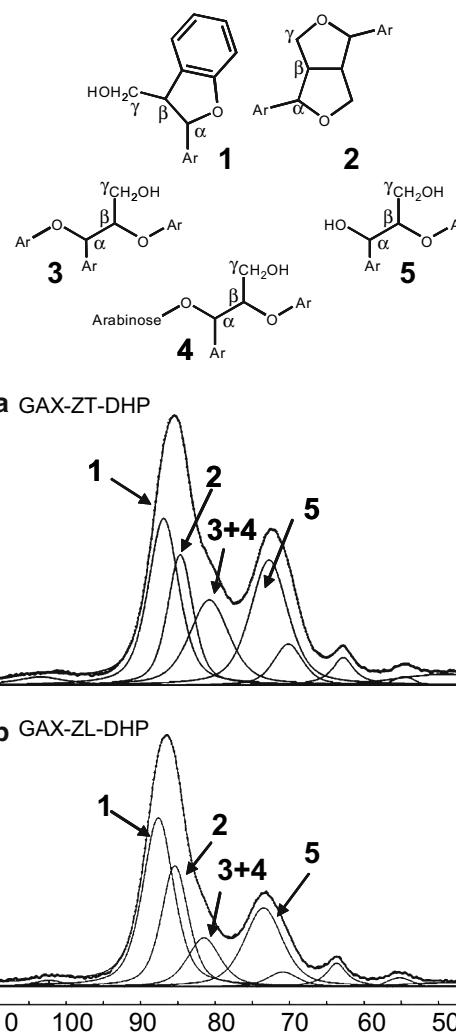
Chemical shifts (ppm)	Structural units	GAX-ZT-DHPs (%)	GAX-ZL-DHPs (%)	DHPs control <sup>a</sup> (%)
71–73 ( <b>5</b> )	C $\alpha$ in $\beta$ -O-4 bonds + C $\alpha$ esterified to carbohydrates	26.5	19.2	16
81 ( <b>3 + 4</b> )	C $\alpha$ etherified (carbohydrates or DHPs)	15.25	8.9	9
85 ( <b>2</b> )	C $\alpha$ in $\beta$ - $\beta$ bonds	14.9	18.2	25
87–88 ( <b>1</b> )	C $\alpha$ in $\beta$ -5 bonds	23.15	29.15	30
130	C $\alpha$ in coniferyl alcohol end groups	20.2	24.6	21

For spectral identification from 1 to 5, see Fig. 5

<sup>a</sup> Values obtained for control DHPs from reference Cathala et al. (2005)

to the ZL one. However, even without a high resolution, a signal in this range obviously occurs in the ZT spectra in contrast to the ZL spectra, thus suggesting the presence of peaks in the range of etherified C $\alpha$  carbon with carbohydrate and phenol groups. A definitive attribution of this signal was attempted using a long-range correlation (HMQC; Ralph et al. 1999) between the H5 of arabinose and the 81–82 ppm signal region. Due to the large broadening of the signal, no correlation was detected. This extreme broadening can be explained by a very low mobility of the molecules that is consistent with the entrapment of the LCC linkages within a covalent network. This assumption is supported by the poor solubility of the ZT samples in the solvent (DMSO) at the NMR concentration range (i.e. 10–50 mg/0.5 ml). Indeed a gel like structure was formed in the tube even after acetylation. In order to deeper investigate the high-molar fraction that is almost insoluble under the NMR experimental conditions, samples were analysed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR analysis. Spectra of the ZL and ZT GAX mixture are presented in the Fig. 5a and b. The general pattern of the peaks was similar to that assigned in liquid-state except for the 81 ppm region (peak noted **3 + 4**) that displays a higher signal. Linkage frequencies and their relative contribution were obtained by the decomposition of the complex ZT and ZL spectra, followed by the estimation of their relative frequency (see Fig. 5 for the decomposition and Table 4 for the relative areas). The relative area of the peak at 81 ppm is roughly two times higher in the ZT (15.25%) than in the ZL experiment (8.9%; Table 4). As few changes of its half-width were observed, this increase was related to a higher proportion of linkages resonating at 81 ppm. Occurrence of a peak at 81 ppm in the ZL samples can be explained by the addition of some polysaccharides to the QM as suspected in SEC and also by the addition of phenol groups of DHPs. Indeed, the ZL methods is known to produce higher free phenol groups that are thought to react at acidic pH with quinone methide (Sipilä and Brunow 1991). The relative area measured in the ZL reaction mixture is in good agreement with previous studies done on bacterial

cellulose/DHPs (9%) and bacterial cellulose/pectin/DHPs (6%) composites (Cathala et al. 2005) where it was concluded that bacterial cellulose based composites were almost free of LCC. Thus the increased on the intensity of the peak at 81 ppm in the ZT reaction mixture has to be



**Fig. 5** Solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of GAX-ZL-DHPs (a) and GAX-ZT-DHPs (b) obtained from  $\alpha^{13}\text{C}$  labelled coniferyl alcohol

related to the formation of benzyl ether groups on the  $\alpha$  carbon of DHPs. It has also to be noted that the proportion of the other type of linkages supports the idea of the modification of the monomer reactivity in the ZT reaction (Table 4). The amount of  $\beta$ -O-4 linkages (noted 5 in Fig. 5) increases while the condensed linkages ( $\beta$ - $\beta$ , noted 2 and  $\beta$ -5, noted 1) decrease together with residual coniferyl end groups. Accordingly, the structure of the GAX-ZT-DHPs is closer to those of natural lignin than GAX-ZL-DHPs.

#### Isolation of the LCC fraction by xylanase treatment and fractionation from the GAX-ZT reaction

Many techniques, involving chemical or enzymatic and/or organosolvent treatments have been used to isolate LCC (Koshijima et al. 1972; Takahashi and Koshijima 1987; Koshijima and Takahashi 1988). Avoiding a harsh procedure, the GAX ZT reaction was digested by an endoxylanase. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase randomly cleaves the xylan main chain and generates various substituted xylooligosaccharides. The GAX-ZT reaction product gave rise to a precipitate during the enzyme treatment, which was not observed in the absence of xylanase. The xylanase-treated sample was centrifuged and the supernatant freeze dried to give a water soluble fraction ( $W_{\text{sol}}$ ). The precipitate was treated with a dioxan/water mixture to separate the dioxan/water soluble fraction ( $D_{\text{sol}}$ ) from the dioxan/water insoluble fraction ( $D_{\text{ins}}$ ). When these  $W_{\text{sol}}$  and  $D_{\text{sol}}$  fractions were analysed by  $^{13}\text{C}$  NMR and SEC in DMSO/water LiBr, they mostly consisted of polysaccharides and DHP, respectively, (data not shown).  $D_{\text{ins}}$  could not be subjected to DMSO/water SEC- and NMR analyses due to its complete insolubility. However, the carbohydrate and lignin compositions of all fractions were determined. The results are reported in Table 5. Carbohydrate content decreased gradually between  $W_{\text{sol}}$  and the  $D_{\text{ins}}$  fraction, whereas a reverse relationship was observed for lignin content. The main variation concerned the molar ratios of arabinose and xylose. The  $D_{\text{ins}}$  fraction

had a significantly higher arabinose content than the other fractions (Table 5), which indicated an enrichment of polysaccharides with high arabinose substitution in this fraction. These results are consistent with the  $^{13}\text{C}$  NMR analysis and with previous works that demonstrated a covalent bond between the hydroxyl group of the C5 arabinose substituent and the  $\alpha$ -position of the lignin monomer. No substantial differences in neutral or acid sugars could be detected in any fractions, in agreement with NMR data and despite previously reported results (Sipilä and Brunow 1991).

#### Sorption of GAX to ZL and ZT DHPs

Noncovalent interactions between GAX and DHPs were evaluated by testing the binding capacity of GAX on DHPs. Since DHPs are mostly insoluble in aqueous solutions, GAX solutions at various concentrations were incubated in the presence of a fixed quantity of DHP (Fig. 6). The amounts of GAX in the supernatant after centrifugation (Fig. 7) were determined by HPAEC after acid hydrolysis. The quantities of adsorbed materials (Fig. 7) were obtained from the difference between the amounts determined in binding assays and the starting solutions. ZT and ZL DHP presented very similar behavior for all the parameters investigated. Evolution of the arabinose/xylose ratio of the adsorbed materials was also monitored and any significant variation detected. All the ratios were similar to those of the total samples (roughly equal to 0.23). Thus there is no specific interaction with rich arabinose fraction of GAX.

Some DHPs were solubilized during the sorption experiment as evidenced by the increased UV absorbance measured in the supernatant after centrifugation. This “cosolvent effect” is reminiscent of the fact that ZL and ZT DHPs do not precipitate during synthesis. However, the amounts of soluble DHPs in the sorption experiment remained low (less than 1.5% of the total DHP) compared with the ZT and ZL experiments where all the DHPs were dispersed in the reaction medium.

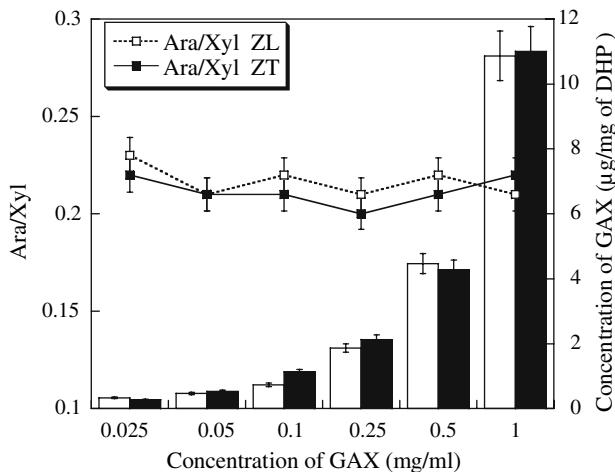
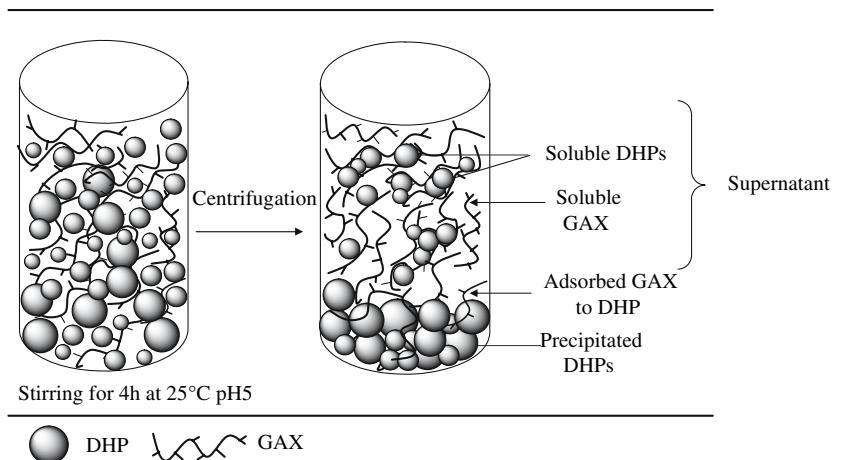
**Table 5** Carbohydrates and DHP content in fractions extracted after the xylanase treatment of GAX-DHP ZT product

Product	GAX-DHP ZT Polymerization	$W_{\text{SOL}}$	$D_{\text{SOL}}$	$D_{\text{INS}}$
Carbohydrates content (%)	50 (100) <sup>a</sup>	97.9 (82) <sup>a</sup>	24 (11) <sup>a</sup>	11 (7) <sup>a</sup>
Neutral sugars (%)	94.1 $\pm$ 0.4	93.7 $\pm$ 1.4	96.3 $\pm$ 0.7	95.5 $\pm$ 0.1
Acid sugars (%)	5.9 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 1.1	3.7 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.5
Ara/Xyl	0.23 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.02
Lignin content (%)	50 (100) <sup>b</sup>	2.1 (2) <sup>b</sup>	76 (34) <sup>b</sup>	89 (46) <sup>b</sup>

$W_{\text{SOL}}$  Water soluble fraction,  $D_{\text{SOL}}$  dioxane soluble fraction,  $D_{\text{INS}}$  dioxane insoluble fraction, Ara/Xyl molar ratio of L-arabinose to D-xylose

<sup>a</sup> and <sup>b</sup>, % yields of carbohydrates and lignin, respectively on the basis of original GAX-DHP ZT product

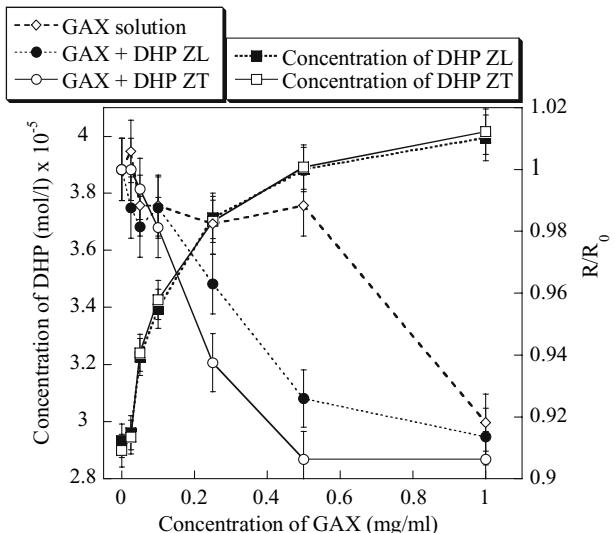
**Fig. 6** Principle of sorption of GAX to DHPs. Insoluble DHPs are mixed with GAX after 4 h stirring, the mixture is centrifuged. Amounts of DHPs solubilized and polysaccharides sorbed were determined



**Fig. 7** Adsorption isotherms from GAX to DHPs. Experiments were performed with 7.5 mg of DHP and different GAX concentrations at 25°C, pH 5.0 for 4 h

#### Formation of hydrophobic microdomains in the supernatant of sorption experiment solutions

Fluorescence properties of many molecules depend on the physicochemical characteristics of their environment. Pyrene is a hydrophobic molecule that has a fine fluorescence spectrum. The relative intensities of bands 1 (372 nm) and 3 (382 nm) are sensitive to the local polarity of the medium ( $I_1/I_3 = 1.7$  in water and  $I_1/I_3 = 0.60$  in hexane; Kalyanasundaram and Thomas 1997). This ( $I_1/I_3$ ) ratio decreases as the polarity of the pyrene environment decreases (Winnik and Regismond 1996). Pyrene, due to its hydrophobic character, will be preferentially located in hydrophobic microdomains when they occur, so the curve of  $I_1/I_3$  versus polymer concentration can be used to determine the formation of such domains. Another method consists of plotting the  $R/R_0$  values versus GAX concentration for the GAX solution and supernatant from the sorption experi-



**Fig. 8** Concentration of soluble DHPs (mol/l) and evolution of  $R/R_0$  ratio in the supernatants of sorption experiments as a function of the total GAX concentration used for the sorption experiments

ment where  $R_0$  corresponds to the  $I_1/I_3$  ratio at  $[GAX] = 0 \text{ mg/ml}$  and  $R$  to the  $I_1/I_3$  ratio at 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/ml of GAX. When  $R/R_0$  is equal to 1 there is no formation of hydrophobic domains, whereas a decrease in the  $R/R_0$  value indicates their formation. Dilute GAX solutions display a constant value of 1 (Fig. 8) whereas aggregation occurs at a high concentration (1 g/l). Thus it is likely that the GAX molecules exist as mostly nonassociated chains below this value. This pattern of aggregation, in polysaccharides forming hydrophobic domains, has already been reported for hemicellulose (Shigematsu et al. 1994a). The  $R/R_0$  ratio, in the supernatant from the DHPs sorption experiments, was almost constant at very low concentrations and decreased to less than 0.1 g/l of GAX which was significantly lower than the aggregation limit of the pure GAX solution. No striking variation was noted between ZT and ZL DHPs. These results show

that DHPs and GAX are associated in a hydrophobic complex resulting in a decrease in local polarity and an increase in the soluble DHPs fraction. This pattern is reminiscent of previous studies that demonstrated the occurrence of condensed aggregates formed between DHPs and polysaccharides (Lairez et al. 2005).

## Discussion

### Formation of LCC in ZL and ZT polymerisation

The precise chemical mechanism responsible for LCC formation can be described as the nucleophilic addition of functional groups of polyosides to the transient quinone methide generated during dehydrogenative coupling of monolignols. The rates of addition of nucleophiles to quinone methides are reported to be pH dependent and linked to the dissociation constant of the hydroxyl compounds (Sipilä 1990). In the present study, the pH values in the ZL and ZT procedures were identical and the concentrations of hydroxyl compounds (GAX and water) were kept constant throughout the reaction time. Thus it can be assumed that the rate constants of addition of hydroxyl compounds to the QM were identical under both ZT and ZL conditions. The ZL and ZT methods generated roughly the same amount of QM. The amount of QM could in fact be estimated from the  $\beta$ -O-4 content of the final product, that is 15% of the total linkages for the ZT reaction and 12% for the ZL procedure (Cathala et al. 1998). The main difference between the two methods was the distribution of QM over the reaction time (Fig. 2). In the ZL process, all the CA was added at the beginning of the reaction. Assuming that peroxidase was not limiting, the amount of peroxidase (5 mg of 250–330 unit/mg) used in both experiments was able to oxidize 25 mM of CA per second whereas the total amount of CA added was 0.55 mM. Thus all the CA was immediately oxidized and produced a peak concentration of QM ( $[QM]_{max} = 3.3$  mM). Based on the rate constant of water addition determined by Leary (1972), it was calculated that almost all the QM reacted within 8 min (Fig. 2). In the ZT process CA was added throughout the reaction and the QM concentration attained a steady state of  $2.9 \times 10^{-5}$  M after roughly 3 min which lasted until the end of the reaction time. In both cases, the water concentration (55 M) predominated over the GAX concentration ( $3.12 \times 10^{-2}$  M equivalent of monosaccharide).

The rate of LCC formation is a function of the concentration of the reactive species (i.e. GAX and QM) and the rate constant of addition and can theoretically be described by the following equation:

$$[LCC] = k_{GAX}[GAX][QM] - k_{H_2O}[H_2O][QM]$$

where  $k_{GAX}$  and  $k_{H_2O}$  are the rate constants of GAX and H<sub>2</sub>O addition, respectively.

It is obvious from this equation that LCC formation is disfavoured in dilute aqueous solutions as high water concentrations can limit the reaction. If LCC formation occurs, it can be attributed either to a higher reactivity of the polysaccharides (i.e. high rate constant of addition) or to a modification of the local reaction conditions that then reduce the local water concentration and thus enhance polysaccharide addition. This situation can be summarized as follows:

- (1) The rate constant of xylan addition is far higher than the rate constant of water addition. LCC formation will occur with both ZT and ZL methods.
- (2) The rate constant of xylan addition is in the same order of magnitude as the rate constant of water addition and the local organization of the polymer has no impact on reactivity. Water addition will predominate and LCC will not be formed under ZL or ZT conditions.
- (3) The rate constants of water and GAX addition are similar and the local organization of the polymer may favour the addition of polysaccharides. The longer addition time and gradual polymerisation of DHP will provide more opportunities for the polymers to reorganize and interact. LCC will be formed mainly during the ZT process.

Thus, independently of the rate constants of addition, comparison of the ZT and ZL reaction products provides a means of evaluating the competition between water and a polysaccharide and investigating the potential relevance of non covalent interactions in LCC formation.

### Characterization of LCC in the ZL and ZT reactions

The characterization of LCC is not an easy task, since these low frequency linkages are diluted in highly complex lignin/polysaccharide structures. In order to demonstrate the difference existing between ZT and ZL, without any ambiguity, we characterized both the polymeric effects (i.e. formation of high molar mass complexes by SEC) and the molecular attributes of the LCC formation (i.e. identification of the covalent bonding by NMR).

Size exclusion chromatography (SEC) is a powerful technique for studying the macromolecular properties and characteristics of polymers. However, artefacts are usual and aggregation, for example, can be a source of considerable misinterpretation as already emphasized in previous studies (Porsch and Sundelöf 1994; Saake et al. 2001; Cathala et al. 2003). For these reasons, we used DMSO/water containing 50 mM of LiBr at 60°C, a system suitable for the analysis of both polysaccharides and lignin or DHP. The set of SEC experiments demonstrated that the ZT method had a marked impact on LCC formation since high

molar mass complexes were exclusively observed in this process although some limited coupling could occur in the ZL reaction (increase of peak II molar mass in Fig. 3 and Table 3). The SEC investigation of physical mixtures of DHP and GAX proved that even after drying of the physical mixtures the aggregation observed in aqueous system (Fig. 7) could be fully re-dissolved in the DMSO/water eluent (Fig. 3a). This strongly supports the conclusion, that the high molar mass products found in the ZT synthesis are really covalently bound LCC.

These conclusions were confirmed by NMR studies which demonstrated covalent linkages between GAX and ZT–DHP involving the arabinose moiety of GAX. This was further confirmed by analysing the  $D_{ins}$  fraction that was enriched in arabinose compared to the starting samples. The role of arabinose in LCC formation has already been evidenced both in model and cell wall materials (Takahashi et al. 1982; Ohnishi et al. 1992; Toikka et al. 1998). More surprising was the absence of glucuronic acid enrichment in the  $D_{ins}$  fraction and the lack of proof in the NMR data of the occurrence of an ester linkage between glucuronic acid and the  $\alpha$  carbon of the lignin monomer. Indeed this addition was suggested to be prevalent at neutral pH in previous work by Sipilä (1990). However, the addition of carboxylic acid was carried out in mixed organic/water solutions with monomeric models (Sipilä and Brunow 1991). This difference in experimental conditions may have resulted in the different reactivities of the active groups. However, another point linked to our experimental conditions might be responsible for these different findings. Indeed, as discussed above, the formation of covalent bonds is linked to the occurrence of hydrophobic clusters. Such clusters might reject polar glucuronic acid groups thereby limiting their reactivity. Further investigations under a range of experimental conditions are needed to discuss this point in detail.

It can be concluded that the formation of covalent linkages occurs between GAX and DHP by addition of the C<sub>5</sub> hydroxyl groups of the arabinose of the quinone methide generated during the ZT dehydrogenating process. This does not happen in the ZL reaction although all the reaction parameters are identical except for the QM concentration over the reaction time. To get an in-depth understanding of the process, the interactions between GAX and DHPs were then evaluated by physico-chemical means.

#### Evidence for noncovalent interaction between DHPs and GAX

Sorption experiments provide a simple but efficient means of demonstrating noncovalent interactions between soluble and insoluble components. In the present study, interactions between DHPs and GAX were evidenced and compared to similar values obtained in studies of

hemicellulose/cellulose interaction. The degree of GAX bonding, with both DHPs, attained roughly 10 µg/g and was thus in the same range as observed between cellulose and polysaccharides in similar conditions. Indeed, the amounts of xyloglucans adsorbed to cellulose were about 14 µg/mg, whereas values of 2.5 and 4 µg/mg were measured for arabinan and galactan-rich pectins, respectively (Vincken et al. 1995; Zykwinska et al. 2005). The main difference between the present results and these earlier ones is related to the fact that the DHP/GAX isotherm did not attain a plateau, at least in the range of concentrations studied here. In previous studies, the plateau of adsorption isotherms has been attributed to full coverage of the accessible surfaces of the cellulose molecules. This is supported by the fact that the plateau values vary according to the type of cellulose (Hayashi et al. 1987). In the present study, the absence of a plateau together with the shape of the isotherm (exponential evolution) may indicate that the accessible surfaces became more and more abundant with the increase in GAX concentration suggesting that the GAX molecules were able to disrupt insoluble DHP aggregates and thus increase the accessible surfaces. This assumption is consistent with the increase in DHPs concentration observed in the supernatants after centrifugation (Fig. 8). In the case of a [GAX]/[DHP] ratio of 1/7.5 (mg/mg), for example, the DHP concentration was about 1.5-fold higher in the presence of GAX compared to the water blank (Fig. 8). This indicates the existence of an attractive interaction between GAX and DHP. Such a finding has been previously reported and evidenced for other kinds of polysaccharides (Higuchi et al. 1971; Shigematsu et al. 1994b; Cathala and Monties 2001). The pattern of interaction did not vary significantly between ZL and ZT DHPs. However, it should be remembered that the ZT and ZL DHPs only presented small structural differences (Cathala et al. 1998). Indeed they exhibited rather similar  $\beta$ -O-4 and hydroxyl group contents, and small differences in molar mass. This is an advantage when comparing the addition rate constants for the two methods as explained below. However, it is not the most favourable system for detecting the specificity of noncovalent interactions between GAX and different lignin types. Closer analysis of this specificity would necessitate the presence of large structural differences and accordingly a variety of different lignins and lignin models. This will require further investigation in the future. Our main conclusion is that both DHPs interact with GAX.

Noncovalent interactions and end-wise process promote the formation of covalent coupling

The present works demonstrate the occurrence noncovalent interactions between DHP and GAX molecules. However,

interactions occurred with both types of DHPs whereas LCC were mainly formed during the ZT reaction. The absence of LCC formation in the ZL reaction can be explained by the fact that CA reacts almost immediately and simultaneously to the colloid formation. Since ZL DHPs and xyloans can interact, aggregates are likely formed explaining the formation colloidal suspension that limit the precipitation of the ZL DHPs. Since all the CA molecules react rapidly the reaction is stopped before any process of rearrangement (aggregates fusion, DHPs diffusion, etc). In the case of the ZT process, formation of aggregates also occurs at the early times of the reaction. Since CA and DHPs are rather hydrophobic molecules (Shigematsu et al. 1994b), during the addition process, they will be likely located and polymerized within aggregates formed earlier in the reaction process. This will increases the local DHPs concentration as previously evidenced (Lairez et al. 2005) inducing dehydration process by self aggregation. Elimination of water molecules will promote the addition of GAX. Noncovalent interactions together with the slow addition process result in the building up of supramolecular structures that induced a change in reactivity. However it is clear that without one of these two parameters, LCC will not be efficiently formed. *In planta*, the dehydration process has already been observed during lignification (Inomata et al. 1992) whereas formation of xylan-lignin network was also suggested by Salmen and Olsson (1998). Similar behaviour to that described here can occur and affect the reactivity of lignin-like molecules, as it will favour addition of the hydroxyl group of polysaccharides to quinone methide by lowering the local water concentration within the complexes. Thus in complement to the previ-

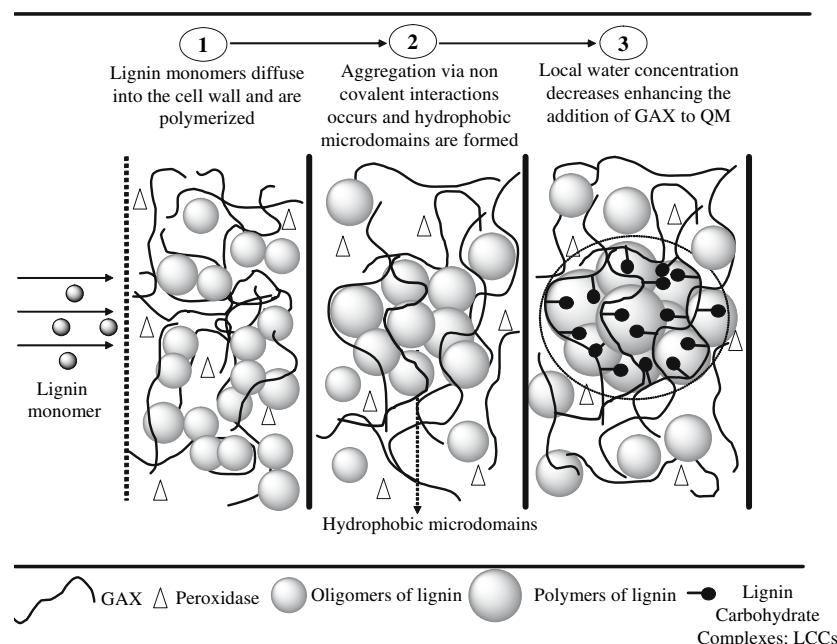
ously described hypotheses (high polysaccharide concentration, long reaction time), we propose a general scheme of LCC formation based on the formation of aggregates by noncovalent interaction. This favours the nucleophilic addition of hemicellulose to QM by increasing the polysaccharide and/or lowering the local water concentrations, and thus limits water competition (Fig. 9).

## Conclusion

Based on the results of model experiments some new features in the process of LCC formation are proposed. Lignin-like products were shown to interact with GAX to form hydrophobic complexes. As summarized in Fig. 9, this led to dehydration of the local environment around the lignin-like growing chains, thereby limiting the addition of water to the quinone methide formed during polymerisation. In the present study, arabinose was found to provide the most reactive nucleophile whereas no such evidence was found with glucuronic acid addition.

We therefore propose that local noncovalent interactions influence and control the formation of covalent linkages between lignin and carbohydrate networks by forming supramolecular assemblies. To understand how this control proceeds, the specific relationships and interactions between different lignin and xylan types needs to be investigated. However, the model proposed in Fig. 9 can be generally applied to cell wall formation. It implies that LCC formation increases throughout the lignification process together with the lignin content. This suggests that LCC formation is maximal at the end of lignification and

**Fig. 9** Schematic representation of the formation of LCC during the lignification process



that this process can be understood as the final step in cell wall construction by blockage of the interpenetrating networks. This process can thus be considered as a regulation mechanism in addition to the oxidative pathway that dominates at the earlier stages of cell wall construction.

**Acknowledgments** Access to the NMR facilities of the BIBS platform (Biopolymers, Interactions, Structural Biology) of INRA-Nantes was greatly appreciated by the authors.

## References

- Björkman A (1957) Studies on finely divided wood. Part 3. Extraction of lignin–carbohydrate complexes with neutral solvents. *Svensk Papperstidning* 60:158–159
- Cathala B, Monties B (2001) Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). *Int J Biol Macromol* 29:45–51
- Cathala B, Saake B, Faix O, Monties B (1998) Evaluation of the reproducibility of the synthesis of dehydrogenation polymer models of lignin. *Pol Deg Stab* 59:65–69
- Cathala B, Saake B, Faix O, Monties B (2003) Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *J Chrom A* 1020:229–239
- Cathala B, Rondeau-Mourot C, Lairez D, Bedos-Belval B, Durand H, Gorrion L, Touzel JP, Chabbert B, Monties B (2005) Models systems for the understanding of lignified plant cell wall formation. *Plant Biosyst* 139:93–97
- Fry SC (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol* 37:165–186
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD (2000) Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J Agric Food Chem* 48:6106–6113
- Grabber J, Ralph J, Hatfield RD (2002) Model studies of ferulate-coniferyl-alcohol cross-product formation in primary maize walls: implications for lignification in grasses. *J Agric Food Chem* 50:6008–6016
- Hayashi K, Madsen M, Delmar D (1987) Pea xyloglucan and cellulose: xyloglucan–cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol* 83:384–389
- Hemmingson J, Leary G (1975) The chemistry of reactive lignin intermediates. Part II. Addition reactions of vinyl-substituted quinone methides in aqueous solution. *J Chem Soc Perkin II*:1584–1587
- Higuchi T, Ogino K, Tanahashi M (1971) Effect of polysaccharides on dehydropolymerization of coniferyl alcohol. *Wood Res* 51:1–11
- Inomata F, Takabe K, Saiki H (1992) Cell wall formation of conifer tracheid as revealed by rapid-freeze and substitution method. *J Electron Microsc* 41:369–374
- Kalyanasundaram K, Thomas JK (1997) Environmental effects on vibronic band intensities in pyren monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J Am Chem Soc* 99:2039–2044
- Koshijima T, Taniguchi T, Tanaka R (1972) Lignin carbohydrate complex. *Holzforschung* 26:211–218
- Kuhlmann KF, Grant DM (1968) The nuclear overhauser enhancement of the carbon-13 magnetic resonance spectrum of formic acid. *J Am Chem Soc* 90:7355–7357
- Koshijima T, Takahashi N (1988) Molecular properties of lignin–carbohydrate complexes from beech (*Fagus crenata*) and pine (*Pinus densiflora*) woods. *Wood Sci Technol* 22:177–189
- Lairez D, Cathala B, Monties B, Bedos-Belval F, Duran D, Gorrion L (2005) On the first steps of lignification: aggregation during coniferyl alcohol polymerisation in pectin solution. *Biomacromolecules* 6:763–774
- Leary G (1972) The chemistry of reactive lignin intermediates. Part I. Transients in coniferyl alcohol photolysis. *J Chem Soc Perkin II* 5:640–642
- Ludley FH, Ralph J (1996) Improved preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. *J Agric Food Chem* 44:2942–2943
- Ohnishi J, Watanabe N, Koshijima T (1992) Synthesis of dehydrogenation polymer–polyoside complexes by peroxidase. *Phytochemistry* 31:1185–1190
- Parkas J, Paulsson M, Westermark U, Terashima N (2001) Solid state NMR analysis of  $\beta$ -<sup>13</sup>C-enriched lignocellulosic material during light-induced yellowing. *Holzforschung* 55:276–282
- Porsch B, Sundelöf L (1994) Size exclusion chromatography and dynamic light scattering of dextrans in water: explanation of ion-exclusion behaviour. *J Chrom A* 669:21–30
- Ralph J, Marita JM, Ralph SA, Hatfield RD, Lu F, Ede R, Peng J, Quideau S, Helm RF, Grabber JH, Kim H, Jimenez-Monteon G, Zhang Y, Jung H-JG, Landucci L, MacKay JJ, Sederoff RR, Chapple C, Boudet AM (1999) Solution-state NMR of lignins. In: Argyropoulos DS, Rials T (eds) *Advances in lignocellulosics characterization*. TAPPI, Atlanta, pp 55–108
- Saake B, Kruse T, Puls J (2001) Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Biores Technol* 80:195–204
- Salmen L, Olsson AM (1998) Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: structure-property relationships. *J Pulp Pap Sci* 24:99–103
- Shigematsu M, Goto A, Yoshida S, Tanahashi M, Shinoda Y (1994a) Hydrophobic regions of hemicellulose estimated by fluorescent probe method. *Mokuzai Gakkaishi* 11:1214–1218
- Shigematsu M, Goto A, Yoshida S, Tanahashi M, Shinoda Y (1994b) Affinities of monolignols and saccharides determined by the solubility method. *Mokuzai Gakkaishi* 40:321–327
- Sipilä J (1990) On the reactions of quinone methide intermediates during lignin biosynthesis: a study with models compounds. Ph.D thesis, Department of chemistry, University of Helsinki
- Sipilä J, Brunow G (1991) On the mechanism of formation of non-cyclic benzyl ether during lignin biosynthesis. Part 4. The reactions of a  $\beta$ -O-4 type quinone methide with carboxylic acids in the presence of phenol. The formation and stability of benzyl esters between lignin and carbohydrate. *Holzforschung* 45:9–14
- Takahashi N, Koshijima T (1987) Properties of enzyme-unhydrolyzable residue of lignin–carbohydrate complexes isolated from Beech Wood. *Wood Res* 74:1–11
- Takahashi N, Koshijima T (1988) Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin–carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Sci Technol* 22:231–241
- Takahashi N, Azuma J, Koshijima T (1982) Fractionation of lignin–carbohydrate complexes by hydrophobic-interaction chromatography. *Carbohydr Res* 107:161–168
- Tanaka K, Nakatsubo F, Higuchi T (1976) Reactions of guaiacyl-glycerol- $\beta$ -guaiacyl ether with several sugars I. Reactions of quinone methide with D-glucuronic acid. *Mokuzai Gakkaishi* 22:589–590
- Terashima N (2001) Possible approaches for studying three dimensional structure of lignin. In: Moroshi N, Komamine A (eds) *Molecular breeding of woody plants*. Elsevier, Amsterdam, pp 257–261
- Terashima N, Fukushima K, He L-F, Takabe K (1993) Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J (eds) *Forage cell wall structure and digestibility*. Amer Soc Agronomy, Madison, pp 247–270

- Terashima N, Ralph SA, Landucci LL (1996) New facile syntheses of monolignols glucosides; *p*-glucocoumaryl alcohol coniferin and syringin. *Holzforschung* 50:151–155
- Terashima N, Hafren J, Westermark U, Vanderhart DL (2002) Non destructive analysis of lignin by NMR spectroscopy of specifically  $^{13}\text{C}$ -enriched lignins. *Holzforschung* 56:43–50
- Toikka M, Sipila J, Teleman A, Brunow G (1998) Lignin–carbohydrate model compounds. Formation of lignin methyl arabinoside and lignin methyl galactoside benzyl ethers via quinone methide intermediates. *J Chem Soc Perkin Trans 1*:3813–3818
- Vincken JP, Keizer A, Beldman G, Voragen G (1995) Fractionation of xyloglucans fragments and their interactions with cellulose. *Plant Physiol* 108:1579–1585
- Winnik F, Regismond ST (1996) Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants polymers. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 118:1–39
- Winter H, Barakat A, Cathala B, Saake B (2006) Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation. In: Fisher K, Heinze T (eds) *Makromolecular symposium series: hemicelluloses*. Wiley, Weinheim, pp 85–92
- Xi Y, Yasuda S, Wu H, Liu H (2000) Analysis of the structure of lignin–carbohydrate complexes by the specific  $^{13}\text{C}$  tracer method. *J Wood Sci* 46:130–136
- Zykwinska AW, Ralet MCJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2005) Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol* 139:397–407



# Chapitre n° 2

*Impact of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds*

(*Publication n°2, accepté à Phytochemistry*).



(publication n°2: accepté à Phytochemistry)

## **Impact of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds**

Abdellatif Barakat <sup>a</sup>, Brigitte Chabbert <sup>a</sup>, Bernard Cathala <sup>a,b \*</sup>

a : Institut National de la Recherche Agronomique; Unité Mixte de Recherche Fractionnement  
des AgroRessources, 51686 Reims Cedex 2, France

b : Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Biopolymères interactions et  
assemblages, rue de la géraudière BP 71627 44316 Nantes Cedex 3, France



## **Abstract**

In plant cell walls, lignin polymerization occurs in concentrated polysaccharide gel. The effect of high polysaccharide concentrations on the structure of lignin model compounds (DHPs = Dehydrogenation polymers), were investigated by running lignification-like polymerisation under three reaction conditions in which the concentrations of all reactants (xylan/coniferyl alcohol (CA)/oxidising system) were gradually increased. Control experiments were also run in similar conditions but without polysaccharides. DHPs showed increased solubility with increased concentrations of reactants in the presence of xyloans but were mostly insoluble in buffer control experiments. The structures of DHPs were characterized by thioacidolysis and size exclusion chromatography (SEC). Results indicated that the frequency of  $\beta$ -alkyl aryl ether bonds and DHP molecular weight increased with increasing concentration of the reaction mixture in the presence of xyloans whereas those of control DHPs decreased slightly under the same conditions. This emphasizes the role of the pre-existing polysaccharide gel and high concentrations existing the cell wall during construction of the lignin polymer.

**Keywords:** Arabinoxylan; Aggregation; Dehydrogenation Polymers;  $\beta$ -O-4 linkages; Lignification; Molar mass.

## **Abbreviations**

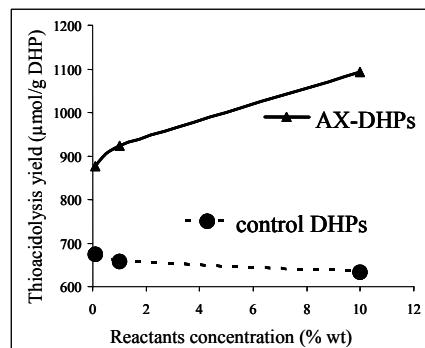
CA: coniferyl alcohol, AX: arabinoxylan., DHPs: Dehydrogenation polymers, SEC : Size exclusion chromatography, CAC: critical aggregation concentration,  $M_w$ : weight average molecular weight,  $M_n$ : number average molecular weight, THF: tetrahydrofuran.

## Graphical abstract

### Impact of reaction media concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds.

Abdellatif Barakat, Brigitte Chabbert, Bernard Cathala \*

In order to investigate the impact of the concentration reaction medium on the structure of lignin model compounds (DHPs = Dehydrogenation polymers), we synthesized lignin model compounds with and without xylans at various concentrations. Results indicate that the frequency of  $\beta$ -alkyl aryl ether bonds, molecular weight and solubility of DHP increase with the concentration of the reaction medium in presence of xylans.



## 1. Introduction

Lignified cell walls are composite materials resulting from the assembly of different biopolymers. Cell wall formation is a complex process in which polymers are deposited in a successive and highly controlled manner. The initial deposits are of polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) whereas lignin polymerization occurs at the end of the process in the pre-existing polysaccharide environment. Lignin is formed through the dehydrogenative polymerization of three aromatic monomers (*p*-coumaryl, coniferyl -CA- and sinapyl alcohol). Polymerization occurs by an enzyme-initiated but chemically controlled process that is influenced by the physicochemical characteristics of the environment. Information on the relationship between the reaction environment and the chemical structures of lignin has been obtained by model approaches. The dehydrogenation process can be reproduced *in vitro* by the synthesis of Dehydrogenation Polymers (DHPs) generated by oxidative polymerization of monolignols using either peroxidase or laccase (Freudenberg and Neish, 1968). This versatile system has allowed a wide range of modifications of polymerization conditions to be studied. Thus the effect of many physicochemical parameters, such as addition mode of the reactants (Sarkanen, 1971), type of monomer (Sarkanen, 1971), oxidizing enzyme (Wallace and Fry, 1999), pH (Terashima et al., 1995; 1996; Fournand et al., 2003), presence of polysaccharide (Higuchi et al., 1971) and many others have been investigated. Despite all these efforts, the synthesis of DHPs structurally similar to lignin has never been achieved implying that the laws governing lignin polymerization are far from being fully understood.

Among all the various parameters previously studied, the concentrations of the reactants have received little attention. Indeed, model experiments were mostly run in dilute solutions whereas the cell wall environment contains high concentrations of polysaccharides. A few attempts have been made to investigate this effect. In the early eighties, Higuchi's team

prepared DHP by diffusion of coniferyl alcohol through a dialysis tube containing the oxidizing system and 2% polysaccharide solutions (pectin, mannan and xylan) (Tanahashi et al., 1981). The molecular weights of the DHPs were found to increase in the presence of mannan and pectin but remained unchanged in the case of xylyns, compared to reference DHPs obtained by classic dropwise addition of the reactants. Later on, Terashima et al prepared DHPs in the presence of pectin solution. The structures of the resulting DHPs were more condensed than that of the control (Terashima and Seguchi, 1988). The reverse was found when DHPs were synthesized in the presence of concentrated pectin solutions (Terashima et al., 1995; 1996). Indeed, dioxane-water extracted DHPs from a pectin reaction mixture were found to be structurally closer to lignin than DHPs prepared in dilute solution (Terashima et al., 1995; 1996). Similar trends were also reported by our group using bacterial cellulose/pectin composites as polymerization medium (Touzel et al., 2003) whereas the Fukushima's group reports recently that polymerization of coniferyl alcohol in the presence of cyclodextrin led to the same conclusion (Nakamura et al., 2006). However these structural variations cannot be unambiguously attributed to the high concentration of polysaccharide. In Terashima's work (Terashima et al., 1995; 1996), DHPs were obtained by dioxane-water extraction and represented only a minor proportion of the total DHPs. Thus, an effect of DHP fractionation cannot be ruled out. In the case of a diffusion cell (Touzel et al., 2003) or dialysis tube (Tanahashi et al., 1981), very slow addition rates of the monomer may also be partly responsible for the observed structural modifications.

Our aim in this study was to investigate the effect of increasing the concentration of the polymerization medium during DHPs synthesis in order to mimic cell polymerization conditions. Since xylyns are the most abundant hemicelluloses present in cell wall architecture, we chose to focus on the effect of arabinoxylans (AX) that are typical xylyns of grass cell walls. Thus, we polymerized coniferyl alcohol (CA) in the presence of

arabinoxylans while increasing the concentrations of the reactants (Fig 1). The concentrations of all the reactants (CA, peroxidase and hydrogen peroxide) were calculated to keep the ratios between them identical for all three concentration values studied (0.1%, 0.5% and 1%). These concentrations were higher than the critical concentration for xylan aggregation, determined by fluorescent probe, to ensure that reactions did not occur in a dilute solution system. The solubility and chemical structure of the AX-DHPs (DHPs prepared in presence of AX) and control DHPs (DHPs prepared without AX) were evaluated.

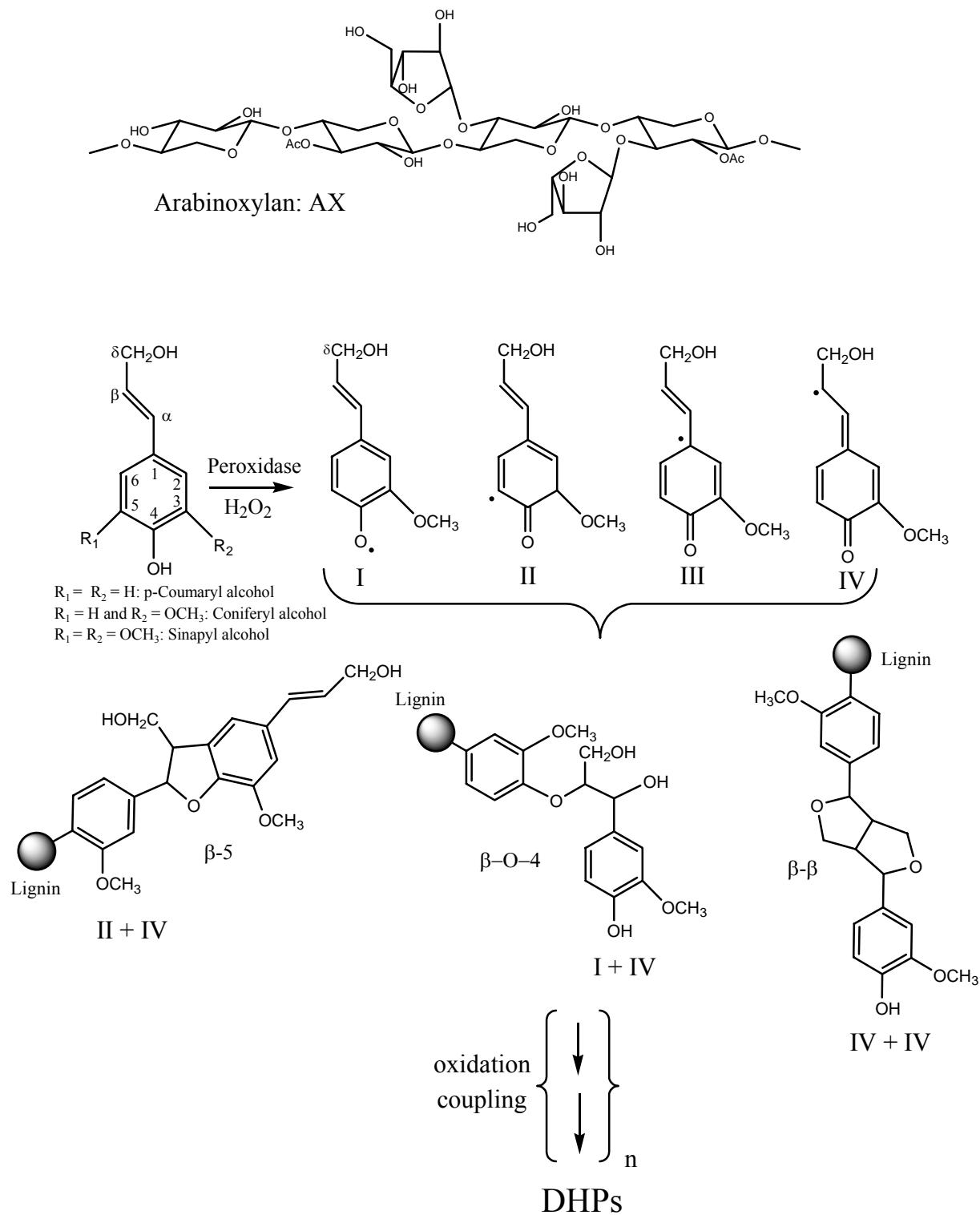


Figure 1: Structure of arabinoxylan (AX) and mechanism of polymerization of coniferyl alcohol.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Characterisation of AX aggregations

At high concentrations, polymer chains can form inter-chain aggregates (Winnik and Regismond, 1996). Aggregation induces the formation of hydrophobic domains that can be detected by fluorescence probe studies using, for example, pyrene as probe molecule. Pyrene is a hydrophobic molecule and would thus be located predominantly in the hydrophobic region. The fluorescence spectrum of pyrene is highly sensitive to the polarity of the medium. The emission spectrum of pyrene exhibits several fine vibronic peaks. The relative intensity of peaks 1 (372 nm,  $I_1$ ) and 3 (382 nm,  $I_3$ ) (Fig 2) is sensitive to solvent polarity and is usually considered indicative of the polarity of the microenvironment surrounding the pyrene moiety (Kalyanasundaram and Thomas 1997). For example,  $I_1/I_3$  is equal to 0.6 in hexane and to 1.7 in water. Hence, the  $I_1/I_3$  value can be used to probe the micelle or aggregate formation.

In aqueous solution, depending on the concentration range and ramification levels, the arabinoxylan chains can be associated, leading to the formation of aggregates or gel networks (Roubroeks et al., 2000; Dervilly-Pinel et al., 2004; Warrand et al., 2005). In figure 2 the intensities of peaks 1 and 3 of the fluorescence spectra of pyrene in 0.25 and 0.5% AX solution are different. This clearly indicates the formation of hydrophobic domains in the 0.5% solution that can be related to aggregation phenomena. The  $I_1/I_3$  ratio was plotted as a function of the AX concentrations (Fig 3). The curve shows a sigmoidal decrease as the AX concentration increases. In the low AX concentration range, the  $I_1/I_3$  ratio is constant and roughly equal to 1.65, indicating that pyrene acts in a polar environment. The  $I_1/I_3$  value then shows a sharp decrease that evidences the formation of AX aggregates. The CAC value

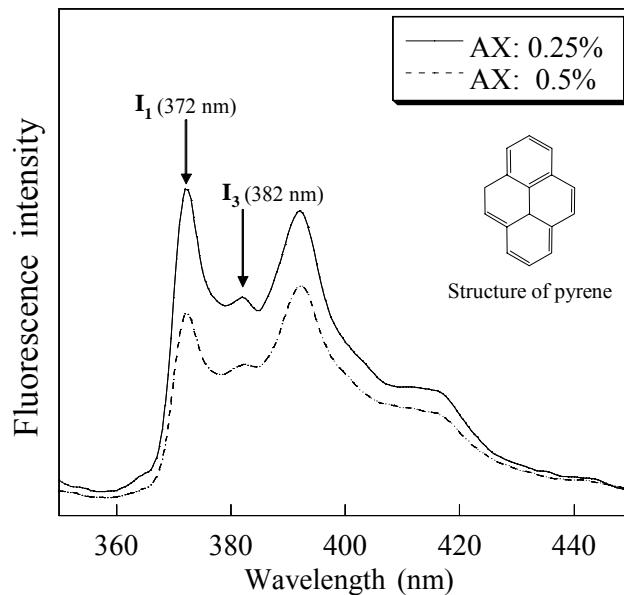


Figure 2: Fluorescence spectra of pyrene ( $5 \times 10^{-7}$  M) in the presence of an increasing concentration of AX: continued line 0.25 % and dashed line 0.5 % of AX.

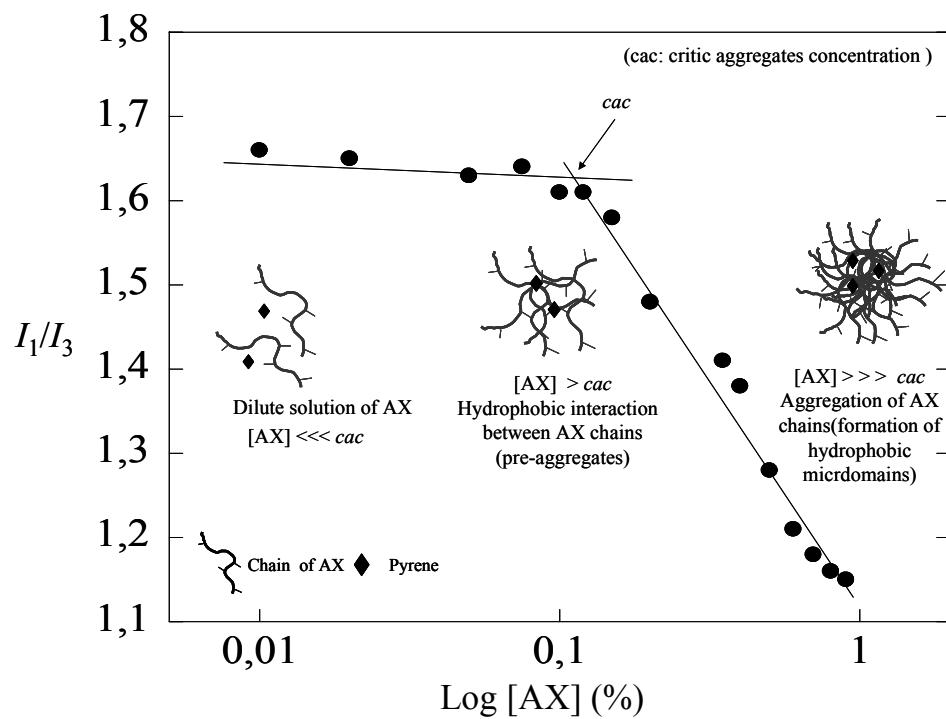


Figure 3: CAC determined by fluorescence probe study: Change in the  $I_1/I_3$  ratio of vibronic band intensities of pyrene ( $5 \times 10^{-7}$  M) with AX concentration and scheme of the aggregation pattern of AX chain

(critical aggregation concentration) is determined from the point of intersection between linear extensions of the rapidly decreasing part and the horizontal part of the curve (Aguilar et al., 2003) (see Fig 3). The estimated CAC value is 0.1% (v/w). These results suggest the formation of inter-chain aggregates by hydrophobic interaction in agreement with previous results (Shigematsu et al., 1994a). This clearly indicates that xylans do not exist as free soluble individual chains at concentrations higher than 0.1% w/v but in an associated form. The polymerizations were therefore carried out at the same or higher CAC concentrations, namely 0.1, 0.5 and 1.0% w/v.

## 2.2. Polymerization of coniferyl alcohol and DHPs solubility in buffer and in AX solutions

Table 1. Parameters of coniferyl alcohol polymerization with and without AX.

Samples	[AX] (%) (SolnA)	wt CA (%) (SolnB)	V <sub>H2O2</sub> (ml) (SolnC)	Unit of peroxidase <sup>a</sup>	[DHP]/[AX] ratio
DHP0.1	0	0.1	0.1	625-750	-
DHP0.5	0	0.5	0.5	3125-3750	-
DHP1	0	1	1	6250-7500	-
AX-DHP0.1	0.1	0.1	0.1	625-750	1
AX-DHP0.5	0.5	0.5	0.5	3125-3750	1
AX-DHP1	1	1	1	6250-7500	1

V: volume; wt: weight; CA: coniferyl alcohol; AX: arabinoxylan.

a: one unit will form 1.0 mg purpurogallin from pyrogallol in 20 s at pH 6.0 at 20 °C

The end-wise polymerization (Zutropfverfahren; ZT) mode was used to prepare DHPs without AX and in AX solutions (AX-DHP). The AX/CA ratio was kept equal to 1 while the amounts of added peroxidase and hydrogen peroxide were adapted to be similar between the three conditions (Table 1). The main difference between all polymerisations is the final concentration in AX-DHP. However the only parameter that differed here was the rate of

addition of monomers. Addition time was also kept constant (240 min) in order to have an equal ratio between radicals and polysaccharides in all experiments. However, this has the disadvantage of increasing the addition rate with increasing xylylans concentration so that the experiment with 1% w/v exhibits more pronounced bulk polymerization (Zulaufverfahren; ZL, all reactants added simultaneously) than that with 0.1% w/v.

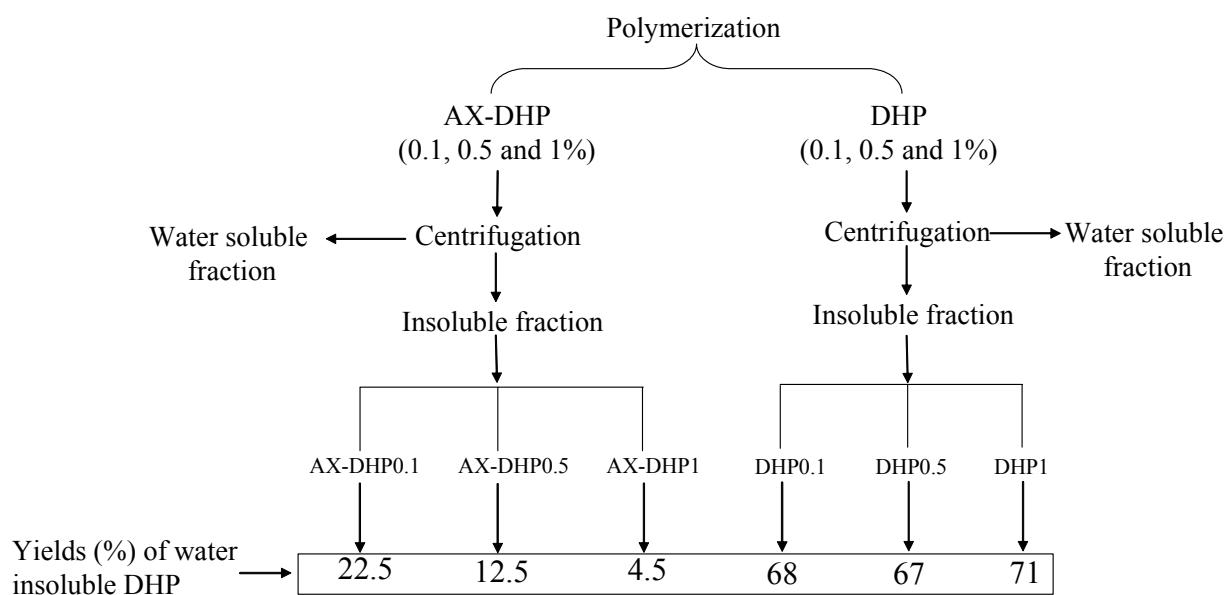


Figure 4: Fractionation pathway of AX-DHPs and reference DHPs (without AX) resulting from polymerization of AX and CA at various concentrations. Water-insoluble fractions are collected after centrifugation.

Since DHPs are mostly insoluble in aqueous solutions, they are usually collected by centrifugation. All the reaction mixtures (DHP synthesized with and without AX) were subjected to centrifugation. The solid residue was washed with ultra pure water and then freeze dried to obtain the water insoluble fraction (Fig 4). The yields of DHPs prepared without AX were between 67-71% (based on starting coniferyl alcohol) in agreement with previous works (Terashima et al., 1995; Cathala and Monties 2001), whereas those of water-

insoluble DHP prepared in AX solutions decreased drastically from 5% to 22% (Fig 4). We concluded from these results that the majority of DHP molecules remain in the aqueous supernatant. A similar effect had already been noted when DHPs were synthesized in the presence of pectin (Cathala and Monties, 2001). Polysaccharides improve the solubility of DHPs, either by the formation of colloidal aggregates as demonstrated previously (Lairez et al., 2005) (Barakat et al., 2007a) or by the formation of covalent bond (Barakat et al., 2007b) and even more so when the two are combined. This effect is notably more efficient at higher polysaccharide concentrations despite the increase in DHP concentration which emphasizes the role of density of the medium.

### *2.3. Characterization of the structure of the dioxane water soluble DHP fraction*

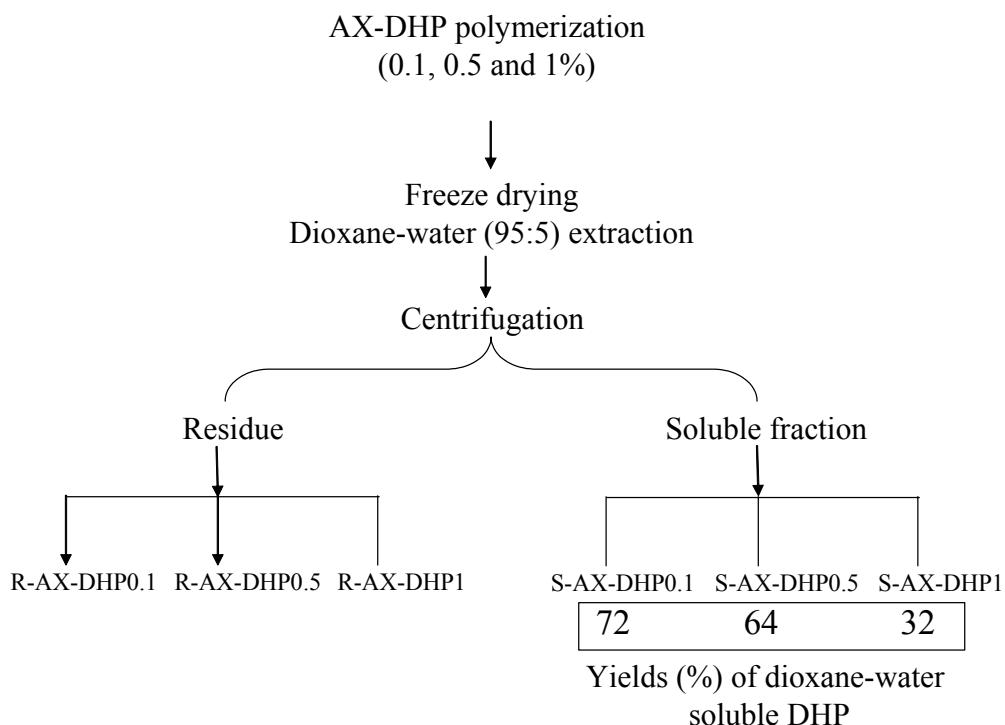


Figure 5: Fractionation pathway of dioxane-water-soluble and -insoluble DHP recovered from AX-DHP resulting from polymerization of AX and CA at various concentrations.

The yields of DHPs precipitated out of the AX solution were rather low compared to the starting CA, so analyses of this fraction would not be representative of the total DHPs formed. We therefore decided to treat the freeze-dried samples with dioxane-water (95:5), which is a specific solvent of DHPs, in order to extract a greater proportion of DHPs (Fig 5). The yields of dioxane-water soluble DHPs (S-AX-DHP) were 72% for the 0.1% w/v, 64% for the 0.5% v/w and 32 % for the 1% v/w synthesis (based on starting CA, Fig 5). Carbohydrate analyses indicate that dioxane-water soluble DHPs do not contain any polysaccharide contamination whereas the insoluble DHP fraction (R-AX-DHP) contained both arabinoxylans and DHP. The AX recovery yields exceeded 90-95% of the starting AX materials indicating that no significant solubilisation of xylans had occurred during dioxane/water extraction. The carbohydrate contents gradually became lower with the increase in polymerization media, to attain 84% (R-AX-DHP0.1), 76% (R-AX-DHP0.5) and 58% (R-AX-DHP1) since that more and more important amount of the DHPs remains trapped. From this results, one can suppose, that the S-AX-DHP fractions are constituted of free DHPs whereas the insoluble fraction may contain some covalent bonded DHPs-AX complexes.

### *2.3.1. Size exclusion chromatography (SEC) of acetylated dioxane-water soluble DHPs in THF*

The control DHP and S-AX-DHP were subjected to acetylation and their molecular weights determined by size exclusion chromatography (SEC) in THF. THF-SEC analysis was not possible in the case of acetylated R-AX-DHPs, due to their very poor solubility in THF even after acetylation. This is likely due to the presence of polysaccharide in the samples that may limit DHP solubility either by the formation of non covalent aggregates and/or the formation of covalently bonded complexes. The weight average molecular weight ( $M_w$ ) and number

average molecular weight ( $M_n$ ) were determined using the relative calibration method based on the elution of 10 polystyrene standards in THF (Faix et al., 1981; Cathala et al., 2003). As shown in Table 2, the molar masses of DHP prepared in the absence of arabinoxylan remain roughly stable or show a slight decrease close to the standard deviation of the measurement. Indeed the values range from 2.6 KDa to 2.3 KDa for 0.1% and 1% v/w polymerization respectively. This can be attributed to the increased rate of addition of reactant that moves the reaction type nearer to the ZL process that is known to produce DHPs of lower molar mass than the ZT process (Cathala et al., 1998). On the other hand the molar masses of DHPs prepared in the presence of AX (S-AX-DHP) increased with concentration of the medium. Moreover, the latter values were in all cases higher than those prepared in the absence of AX (Fig 6).

Table 2. SEC-THF analysis of a series of DHPs synthesised in buffer (without AX) and in AX (AX-DHP) at different concentrations (0.1, 0.5, 1%).

Samples	$M_w$ (g/mol)	$P$
DHP0.1	2660	1.38
DHP0.5	2480	1.66
DHP1	2322	1.63
<hr/>		
S-AX-DHP0.1	3020	2.21
S-AX-DHP0.5	3440	2.54
S-AX-DHP1	4020	1.99

$P = M_w / M_n$ : Polydispersity;  $M_w$ : weight average molecular weight (g/mol);  $M_n$ : number average molecular weight (g/mol)

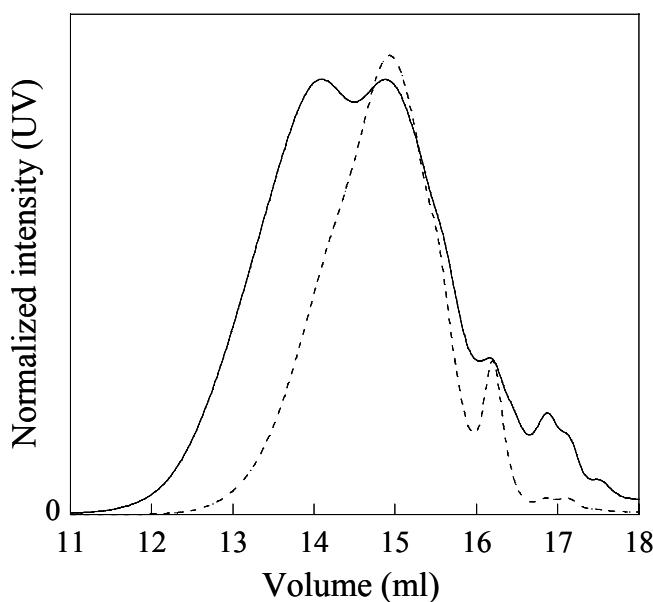


Figure 6: Elution profile in THF (absorbance at 280 nm) of S-AX-DHP1 (continuous line) and control DHP1 synthesised without AX (dashed line).

An increased molar mass in the presence of polysaccharide was previously observed with increasing pectin concentrations (Tanahashi and Higuchi, 1981; Cathala and Monties, 2001). As demonstrated above, the presence of polysaccharide induces aggregates formation and avoids the precipitation that otherwise occurs in their absence. As a consequence the DHPs present within the AX-DHPs aggregates can be coupled either with other oligomers or with newly added monomer. Both reaction leads to an increase in molar mass. In the absence of polysaccharide, the DHPs are precipitated as the molar mass increases and are thus no longer reactive. The coupling process is therefore restricted to newly-added monomer and soluble oligomers of lower molar mass yielding lower molar mass compounds.

### 2.3.2. Evaluation of $\beta$ -O-4 linkages by thioacidolysis

The contents of  $\beta$ -O-4 linkages (alkyl-aryl-ether, the most abundant structure in native lignin) in the control DHPs experiment (without AX), the S-AX-DHP and R-AX-DHP samples were determined by thioacidolysis. Thioacidolysis is a highly specific method which cleaves the alkyl aryl ether bonds ( $\beta$ -O-4). The results for the degradation products of DHP, S-AX-DHP and R-AX-DHP samples at different concentrations reported in table 3 indicate that the relative content of the  $\beta$ -O-4 structure is substantially lower in DHP synthesised without AX than in DHP synthesized in AX solution (AX-DHP), in agreement with previous works (Higuchi et al., 1971; Terashima et al., 1995; 1996). Moreover the  $\beta$ -O-4 content increases with the AX concentration whereas in DHP synthesised without AX it remains stable or shows a slight decrease. Table 3 shows that the thioacidolysis yield of DHP (1092  $\mu\text{mol/g}$ ) synthesised in concentrated AX solution (1%) is very similar to that obtained from pine lignin (Lapierre, 1993). This finding is also in agreement with the results of Terashima et al. (1995; 1996), when DHPs were synthesized in concentrated pectin solution .

Table 3. Percentage of  $\beta$ -O-4 ( $\mu\text{mol/g}$  of DHP) linkage recovered from thioacidolysis from DHPs synthesized with and without AX at different concentrations.

Samples	$\beta$ -O-4 ( $\mu\text{mol/g}$ of DHP) (Thioacidolysis)
DHP0.1	674
DHP0.5	657
DHP1	633
S-AX-DHP0.1	877
S-AX-DHP0.5	924
S-AX-DHP1	1092
R-AX-DHP0.1	755
R-AX-DHP0.5	830
R-AX-DHP1	935

As previously discussed by Sarkanen (Sarkanen, 1971a), the slow diffusion of the monomer radical in the Zutropfverfahren (ZT) reaction type would favour the formation of an “end-wise” polymer containing more  $\beta$ -O-4 linkages. On the other hand, a high concentration of the radical in the reaction mixture would result in the formation of a “bulk” polymer containing fewer  $\beta$ -O-4 linkages. Concordantly, decreasing proportions of  $\beta$ -O-4 linked-structures were recovered with increased concentrations of CA in the case of DHP synthesized without AX. In contrast, polymerizations in the presence of increasing AX concentrations resulted in a higher frequency of  $\beta$ -O-4 linkages in the DHPs. This effect can be attributed to the solubility of lignin monomer in polysaccharides solution (Shigematsu et al., 1994b ; Cathala and Monties, 2001), which favors the reaction between monomer and oligomer radicals leading to an “end wise” polymer with an enriched  $\beta$ -O-4 content (Sarkanen, 1971). We have also recently shown that DHPs and xylans can interact by non covalent interactions into aggregates in dilute solution (Barakat et al., 2007b) and this association would likely explain the formation of colloidal suspensions of AX-DHP complex. Such a trend would be enhanced by the densification of the AX-DHP system afforded to the increased concentrations of AX and CA. Therefore, preferential location of DHP in these hydrophobic aggregates would permit continuous water removal during the polymerization (Lairez et al., 2005). Hence, increased hydrophobicity of the AX-DHP matrix may promote frequent reactions between the phenoxy radical (Fig1, I) and the  $\beta$ -radical (Fig1, IV) resulting in an increase of  $\beta$ -O-4 linkages. The occurrence of  $\beta$ -O-4 rich structures were thus reported in DHP synthesized in aqueous solution containing 1, 4-dioxane (Tanahashi , 1990). Similarly, Chioccaro (1993) reported that the formation of  $\beta$ -O-4 dimer was enhanced with increasing methanol content in a (water-methanol) solvent mixture and Nakamura demonstrated that cyclodextrin could also enhance the  $\beta$ -O-4 content of DHPs by forming an inclusion complex with the coniferyl alcohol (Nakamura et al., 2006). In addition, local removal of water will favour the formation

of a covalent linkage between arabinoxylan and DHP (Barakat et al., 2007a). Besides the impact of the local environment on coniferyl alcohol reactivity, covalent and non covalent associations between DHP and AX would prevent the precipitation of DHP and oligomers, which could then further react giving rise to high molecular weight DHP intimately associated with AX.

Based on these results, we suggest that the structure of DHPs prepared from coniferyl alcohol in a concentrated AX-DHP system would approximate native lignin more closely than that of DHP prepared in buffer and a dilute solution of polysaccharides. The increases in  $\beta$ -O-4 linkages and molecular weight in the presence of highly concentrated polymerization media emphasize the fact that the local density of the polysaccharides-lignin system is critical to the pattern of lignin construction and organisation. This information provides new insights into the assembly of lignified cell-wall during lignin deposition.

### **3. Experimental**

#### *3.1. Fluorescence probe study of AX aggregation*

AX solutions (0.01%-1%) were mixed with pyrene ( $5 \times 10^{-7}$  M final concentration). Absorption spectra were recorded on a Perkins Elmer (lambda 5) UV/vis spectrophotometer. Following excitation at 335 nm wavelength, the emission spectra of pyrene showed vibronic peaks at 372 nm (intensity  $I_1$ ) and 382 nm (intensity  $I_3$ ) the relative intensity ( $I_1/I_3$ ) being sensitive to solvent polarity.

### *3.2. Synthesis of DHPs in buffer and in AX solution*

We synthesize Dehydrogenation Polymers (DHPs) of coniferyl alcohol (CA). In this study, DHPs were also synthesized in the presence of arabinoxylan (AX) (Fig. 1) which is the major hetero-polysaccharide present in angiosperms. The AX, purchased from Megazyme had a molar mass of 75 KDa and an arabinose/xylose ratio of 0.35. They contain less than 1% of glucuronic acid (monosaccharide composition was determined by the method described in point 3.5) and thus can be considered as an arabinoxylans (AX). CA was obtained according to the procedure described by Ludley and Ralph ( 1996).

Three solutions were prepared for the polymerization experiments.

- Soln A: Solutions of AX at 0.1, 0.5 and 1% were prepared in phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0).
- Soln B: Each weight (100, 500 and 1000 mg) of coniferyl alcohol was dissolved in 3 ml of dioxane and 22 ml of each concentration (0.1, 0.5 and 1%), respectively of SolnA.
- Soln C: 25 ml of SolnA containing hydrogen peroxide  $H_2O_2$  (2 eq compared to coniferyl alcohol) (see Table 1).

End-wise polymerization (Zutropfverfahren method, ZT) was achieved as follows: Soln B and Soln C were pumped over a period of 4 h at 25 °C into 50 ml of each concentration of Soln A containing appropriate amounts of the horseradish peroxidase (E 1.11.1.7 purchased from Sigma, 250-300 u/mg. One unit will form 1.0 mg of purpurogallin from pyrogallol after 20 s at pH 6.0 at 20 °C). After 4 h of magnetic stirring, three complexes were formed by the reaction: AX-DHP0.1, AX-DHP0.5 and AX-DHP1, corresponding to AX and CA concentrations of 0.1, 0.5 and 1% respectively. Control DHPs (without AX) were prepared in the same conditions at 0.1, 0.5 and 1% of CA in phosphate buffer (1/30 N; pH 5.0). The control DHPs occurred as precipitates that were collected by centrifugation (10000 rpm, 10

min), washed with distilled water three times and freeze dried to obtain DHP0.1, DHP0.5 and DHP1 fractions. DHP polymerization in the presence of AX leads to a colloidal suspension with no clear-cut formation of precipitates. The solubilities of the DHPs in AX solutions were further estimated from the concentration of DHPs in the supernatant obtained after centrifugation (10000 rpm, 10 min) of the reaction mixture. The water-soluble and -insoluble DHPs were separated. The amount of water-soluble DHPs was determined by recording the supernatant absorbance at 280 nm. The proportion of insoluble DHP was calculated from the difference between the calculated amounts of DHP in the reaction mixture based on the starting CA and the amount of soluble DHP after centrifugation.

### *3.3. Preparation of insoluble and soluble dioxane-water DHPs*

After freeze drying, the set of AX-DHP complexes (AX-DHP1, AX-DHP0.5 and AX-DHP0.1) was dissolved in dioxane-water (95:5). Subsequent centrifugation produced two fractions: a dioxane-water soluble fraction (S-AX-DHP) as supernatant and the dioxane-water insoluble fraction (R-AX-DHP) as residue. The S-AX-DHP fractions were filtered through a 0.45 µm filter. After freeze drying, both S-AX-DHP and R-AX-DHP fractions were washed three times with distilled water and again freeze dried.

### *3.4. Size-exclusion chromatography of acetylated samples in THF*

Prior to chromatography, the S-AX-DHP samples (dioxane-water soluble) were subjected to acetylation in an acetic anhydride/pyridine mixture (1:1) for 24 h at 40 °C. The reaction products were then poured into ice water and extracted with dichloromethane. The organic layers were washed with dilute hydrochloric acid, saturated sodium bicarbonate solutions and

finally water. The organic fractions were dried over magnesium sulphate and concentrated under reduced pressure to give the acetylated S-AX-DHP. The SEC analyses were performed using a multi-detection system consisting of a pump (model 510, Waters), autosampler (U6K injector, Waters), two Polymer Laboratories (PLgel Mixed D, 5 $\mu$ ) column and UV-detector (model 920, Waters). Separation in THF was performed by injecting 100  $\mu$ l of 0.1% of the acetylated samples into thermostatically controlled PLgel columns (40 °C). The flow rate was 1 ml/min. Molar mass evaluation was based on the elution of polystyrene standards

### *3.5. Polysaccharide analysis*

The quantification of carbohydrate was carried out using HPAEC. 5-10 mg of each sample was hydrolysed by sulphuric acid ( $H_2SO_4$ ) 12 M for 2 h at room temperature, then diluted to 1 M for 2 h at 100 °C. All samples were filtered (PTFE, 0.45  $\mu$ m) and 50-100  $\mu$ l solutions were injected onto a CarboPac PA-1 anion exchange column (4 x 250 mm, Dionex). The monosaccharides were quantified using L-fucose as internal standard.

### *3.6. Thioacidolysis*

AX0-DHPs (DHPs synthesised without AX), S-AX-DHPs (dioxane-water soluble) and R-AX-DHPs (dioxane-water insoluble) were degraded by thioacidolysis to determine the content of  $\beta$ -O-4 linked structures according to Lapierre's procedure (Lapierre et al., 1986). The main degradation products were analysed by GC as TMSi derivatives using a J&W Scientific column (DB 1, 30 m 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m film). Detection was by FID using tetracosane as internal standard.

**References**

- Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J.A., Carnero Ruiz, C. 2003. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Coll. Int. Sci.* 258, 116-122.
- Barakat, A., Puteaux, J.L., Saulnier, L., C., Chabbert, B., Cathala, B., 2007a. Characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers = lignin model compounds) nanoparticles, *Biomacromolecules accepted*
- Barakat, A., Winter, H., Rondeau-Mouro, C., Saake, B., Chabbert, B., Cathala, B. 2007b. Studies on interactions and cross-linking to synthetic lignins formed by bulk and end-wise polymerization : a model study of lignin carbohydrate complex formation. *Planta accepted.*
- Cathala, B., Saake, B., Faix, O., Monties, B. 1998. Evaluation of the Reproductibility of the Synthesis of Dehydrogenation Polymer Models of Lignin. *Pol. Deg. Stab.* 59, 65-69.
- Cathala, B., Monties, B. 2001. Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). *Int. J. Biol. Mac.* 29, 45-51.
- Cathala, B., Saake, B., Faix, O., Monties, B., 2003. Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *J. of Chrom. A* 1020, 229-239.
- Chioccaro, F., Poli, S., Rindone, B., Pilati, T., Brunow, G., Pietikäinen, P., Setälä, H. 1993. Regio- and Diastereo-Selective Synthesis of Dimeric Lignans Using Oxidative Coupling. *Acta Chem. Scand.* 47, 610-616.
- Dervilly-Pinel, G., Tran, V., Saulnier, L., Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. *Carbohydr. Pol.* 55, 171-177.
- Faix, O., Lange, W., Besold, G. 2004. Molecular Weight Determinations of DHP's From Mixtures of Precursors by Steric Exclusion Chromatography. *1981 Holzforschung* 35, 137-140.
- Fournand, D., Cathala, B., Lapierre, C., 2003. Initial steps of the peroxidase-catalysed polymerisation of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: capillary zone electrophoresis study of pH effect. *Phytochemistry* 62, 139-146.
- Freudenberg, K., Neish, A. (1968). Biosynthesis of Lignin. Berlin.
- Higuchi, T., Ogino, K., Tanahashi, M. 1971. Effect of Polysaccharides on Dehydropolymerization of Coniferyl Alcohol. *Wood Res.* 51, 1-11.

- Kalyanasundaram, K., Thomas, J.K. 1997. Environmental effects on vibronic band intensities in pyren monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J Am. Chem. Soc.* 99, 2039-2044.
- Lairez, D., Cathala, B., Monties, B., Bedos-Belval, F., Duran, D., Gorrlichon, L. 2005. On the first steps of lignification: aggregation during coniferyl alcohol polymerisation in pectin solution. *Biomacromolecules* 763-774.
- Lapierre, C., 1993. Application of New Methods for the Investigation of Lignin Structure. In: Jung, H.G., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, American Society of Agronomy, Madison, pp. 133-163.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., 1986. Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterisation of guaiacyl-syringyl lignins fractions. *Holzforschung* 40, 113-118.
- Ludley, F.H., Ralph, J. 1996. Improved preparation of Coniferyl and Sinapyl Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2942-2943.
- Nakamura, R., Matsuchita, Y., Umemoto, K., Usuki, A., Fukushima, K., 2006. Enzymatic polymerization of coniferyl alcohol in the presence of cyclodextrins, *Biomacromolecules*, 7. 1929-1934.
- Roubroeks, J.P., Andersson, R., Aman, P. 2000. Structural features of (1→3),(1→4)- $\beta$ -D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. *Carbohydrate Pol.* 42, 3-11.
- Sarkanen, K. V., 1971. Precursors and their polymerization. In: Sarkanen K.V., Ludwig G.H. (Eds.), *Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reaction*, New-York, pp. 95-155.
- Shigematsu, M., Goto, A., Yoshida, S., Tanahashi, M., Shinoda, Y. 1994a. hydrophobic regions of hemicellulose estimated by fluorescent probe method. *Mokuzai gakkaishi* 11, 1214-1218.
- Shigematsu, M., Goto, A., Yoshida, S., Tanashi, M., Shinoda, Y. 1994b. Affinities of monolignols and saccharides determined by the solubility method. *Mokuzai gakkaishi* 40, 321-327.
- Tanahashi, M., Aoki, T., Higuchi, T. 1981. Dehydrogenative polymerization by peroxidase of monolignol by peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dialysis tube III. Formation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs). *Mokuzai Gakkaishi* 27, 116-124.
- Tanahashi, M., Higuchi, T. 1981. Dehydrogenative Polymerization of Monolignols by peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dialysis Tube I. Preparation of Highly polymerized DHPs. *Wood Res.* 67, 29-42.
- Tanahashi, M., Higuchi, T. 1990. Effect of Hydrophobic Regions of Hemicelluloses in Dehydrogenative Polymerization of Sinapyl Alcohol. *Mokuzai Gakkaishi* 36, 424-428.

- Terashima, N., Seguchi, Y., 1988. Heterogeneity in formation of lignin IX. Factors affecting the formation of condensed structures in lignin. *Cellulose Chem. Technol.*, 22, 147-154.
- Terashima, N., Atalla, R.H., Ralph, S.A., Landucci, L.L., Lapierre, C., Monties, B., New Preparations of lignin Polymer Models under conditions that approximate Cell wall Lignification. Part 1 Synthesis of novel lignin polymer models and their structural characterization by <sup>13</sup>C NMR. *Holzforschung* 49, 521-527.
- Terashima, N., Atalla, R. H., Ralph, S.A., Landucci, L.L., Lapierre, C., Monties, B. 1996. New Preparations of lignin Polymer Models under conditions that approximate Cell wall Lignification part 2. Structural characterisation of the models by thioacidolysis. *Holzforschung* 50, 9-14.
- Touzel, J.P., Chabbert, B., Monties, B., Debeire, P., Cathala, B., Synthesis and characterization of dehydrogenation polymers in *Glucunoacetobacter xylinus* cellulose and cellulose/pectin composite. 2003 *J. of Agric. Food Chem.* 51, 981-986.
- Wallace, G., Fry, S. C. 1999. Action of diverse peroxidases and laccases on six wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* 52, 769-773.
- Warrand, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., Courtois, J. 2005. Contributions of intermolecular interactions between constitutive arabinoxylans to the flaxseeds mucilage properties. *Biomacromolecules* 6, 1871-1876.
- Winnik, F., Regismond, S.T. 1996 . Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants polymers. *Coll and surf A: physicochemical and Engineering Aspects* 118, 1-39.



# Chapitre n° 3

*Characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers  
= synthetic lignin polymers) nanoparticles.*

*(Publication n°3, accepté à Biomacromolecules).*



(publication n°3: accepté à Biomacromolecules)

## **Characterization of arabinoxylan-DHP (dehydrogenation polymers = synthetic lignin polymers) nanoparticles.**

Abdellatif Barakat<sup>a</sup>, Jean-Luc Putaux<sup>b</sup>, Luc Saulnier<sup>c</sup>, Brigitte Chabbert<sup>a</sup>, Bernard Cathala<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> INRA UMR Fractionnement des agroressources et emballages, CREA, 2 Esplanade R.  
Garros, 51686 Reims Cedex, France.

<sup>b</sup> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, ICMG-CNRS, BP 53, F-38041  
Grenoble Cedex 9, France, affiliated with the Joseph Fourier University of Grenoble

<sup>c</sup> INRA, Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages, Rue de la Géraudière, BP 71627,  
F-44316 Nantes Cedex, France



# Characterization of Arabinoxylan–Dehydrogenation Polymer (Synthetic Lignin Polymer) Nanoparticles

Abdellatif Barakat,<sup>†</sup> Jean-Luc Putaux,<sup>‡</sup> Luc Saulnier,<sup>§</sup> Brigitte Chabbert,<sup>†</sup> and Bernard Cathala<sup>\*,§</sup>

*UMR Fractionnement des Agroressources et Emballages, Centre de Recherche en Environnement et Agronomie, Institut National de la Recherche Agronomique, 2 Esplanade R. Garros, 51686 Reims Cedex, France, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, affiliated with Université Joseph Fourier and member of the Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9, France, and Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44316 Nantes Cedex, France*

*Received September 18, 2006; Revised Manuscript Received November 29, 2006*

Coniferyl alcohol (G monomer) and a mixture of coniferyl alcohol/sinapyl alcohol (GS monomers, 1/1 ratio) were polymerized to dehydrogenation polymers (DHPs) in presence of two structurally related heteroxylans (HX) differing only in their phenolic substitution patterns. One (HX-40) was enriched in ferulate (FA) while the other (HX-90) was almost devoid of FA. The morphology of the resulting nanoparticles was studied by transmission electron microscopy whereas formation of particles was followed by size exclusion chromatography with online multiangle laser light scattering. HX-40–DHP-G- and HX-40–DHP-GS-derived particles display complex morphological patterns whereas HX-90–DHP-G and HX-90–DHP-GS present rather spherical shapes. The determination of particle sizes and molar masses showed that HX-90 samples formed denser particles than HX-40 ones. These differences are discussed in relation to the ferulate substitution level.

## Introduction

Plants have developed a wide range of highly organized and hierarchical composite materials (cell walls, protein bodies, cutin, microtubules, starch granules, etc.) to achieve the multiple functions required for their development. These supramolecular assemblies provide diverse chemical structures selected throughout the evolutionary process together within an inexhaustible source of models of organization that can be an inspiration to design new materials. For instance, in secondary plant cell walls, hydrophilic polysaccharides are embedded with hydrophobic phenolic polymers during lignification to form effective composites exhibiting remarkable properties and organization.<sup>1,2</sup> To control these properties, it is necessary to understand the organization of the lignin–polysaccharide matrix that is closely related to the chemical composition of the elementary polymers constituting the intricate networks. Thus, it will be useful to understand the relation between chemical composition and supramolecular organization either to optimize the use of plant-based products or build bio-inspired composite materials based on biopolymers extracted from renewable resources.

Heteroxylans (HXs) are a major class of polysaccharides in cell walls. In the case of graminaceous species, HXs consist of a backbone of  $\beta$ -(1-4)-linked D-xylose residues substituted on O-2 or/and O-3 by short side chains mainly composed of a single arabinose residue.<sup>3</sup> Some of the arabinose residues are ester-linked on O-5 to ferulic acid (FA) that can react under oxidative

conditions with either other FA molecules or lignin.<sup>4,5</sup> In the first case, covalent linkages (dehydrodimer, trimer, or tetramer)<sup>6–8</sup> are formed between HX chains,<sup>9,10,11</sup> inducing interchain connections whereas in the second case, covalent linkages between lignins and polysaccharide networks are created via ferulate.<sup>5,12</sup> Both events are thought to have a significant impact on the lignification process and the final properties of cell walls. Indeed, lignification, the final step of the secondary cell wall formation, is an enzymatically initiated but chemically driven reaction and thus intimately depends on the structure of the preexisting polymerization medium (i.e., polysaccharide gel).<sup>13,14</sup> Previous studies have already pointed out the chemical importance of FA and more generally of phenolic acids in the organization of unlignified cell walls and their influence on lignin polymerization.<sup>5,15–18</sup> The chemical implication of FA in cell wall construction is now established. However the relation between the fine chemical structure and the supramolecular architecture of cell walls is not yet fully understood.

Our objective was to study how the FA substitution of HX influences the formation and the morphology of HX–DHP complexes (analogues of cell wall components). We polymerized coniferyl alcohol and a mixture of coniferyl alcohol and sinapyl alcohol in the presence of two structurally similar HXs that differed only in their phenolic substitution patterns. The morphology of the resulting nanoparticles was characterized by transmission electron microscopy (TEM) whereas the formation of particles was followed by size exclusion chromatography with online multiangle laser light scattering (SEC-MALLS) analysis. The combination of these approaches provided complementary information on both the final ultrastructure of the complexes and the evolution of the size, mass distribution of polymers, and internal density during the synthesis and in the final particles. Both approaches highlighted the importance of the

\* Corresponding author. Phone: +33 240675068. Fax: +33 240675025. E-mail: cathala@nantes.inra.fr.

<sup>†</sup> Centre de Recherche en Environnement et Agronomie, Institut National de la Recherche Agronomique.

<sup>‡</sup> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales.

<sup>§</sup> Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique.

ferulate moiety on the building up of the supramolecular organization of the particles.

## Materials and Methods

**HX Extraction and Characterization.** HX fractions were isolated from maize bran under mild or severe alkaline conditions using 1.5 M KOH at 40 °C for 2.5 h (HX-40) or 1% Ca(OH)<sub>2</sub> at 90 °C for 2.5 h (HX-90).<sup>19</sup> The maize bran was suspended in an alkaline solution (10 g/100 mL). The residue was separated by centrifugation and was rinsed with water (3 times). The extract was acidified to pH 3.5, concentrated, and dialyzed against distilled water. The pH was adjusted to 3.5, and HX samples were isolated by EtOH precipitation (3 vol, overnight at 4 °C). Recovery yields of 8.1% and 40% (wt %) were observed for extraction with KOH and Ca(OH)<sub>2</sub>, respectively. HX fractions were further purified by ion exchange chromatography on a DEAE Sepharose CL-6B column as previously described.<sup>20</sup> HXs were loaded onto the column, and the gel was washed with 2.5 column volumes of 0.05 M NaOAc buffer, pH 4.5. The bound material was eluted with 2.5 column volumes of 0.05 M NaOAc buffer, pH 4.5. The bound fractions eluted with 0.05 M buffer were pooled, concentrated, extensively dialyzed against distilled water, and freeze-dried to give purified HX fractions (HX-40 and HX-90). Chromatographic yields were approximately 90% for both fractions.

The identification and quantification of neutral and acidic carbohydrates was carried out using high-performance anion exchange chromatography. The various samples were hydrolyzed using 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acids for 2 h at 100 °C. All samples were then filtered (PTFE, 0.45 μm) before injection onto a CarboPac PA-1 anion exchange column (4 × 250 mm, Dionex). Monosaccharide composition was analyzed and quantified using both L-fucose as the internal standard and standard solutions of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-glucose, D-xylose, and D-galactose) and uronic acids (D-galacturonic and D-glucuronic acids).

Ferulic, diferulic, and *p*-coumaric acids were released by incubating 30–40 mg samples with NaOH (10 mL, 2 M) for 2 h at 35 °C with constant stirring under nitrogen. After 2 h, the reaction was stopped by adjusting the pH to 1 with 6 M HCl prior to addition of 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid as an internal standard. Phenolic acids were extracted with ether (30 mL, 3 times). Ether fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure. The dried extract was dissolved in 1.5 mL of methanol–water (1:1, v/v) and filtered (0.45 μm) prior to injection on a Spherisorb S5 ODS2 (Waters, RP-18, 250 mm × 2.6 mm) column. Phenolic acids were detected using a Waters photodiode array UV detector and quantified at 302 nm.

**Coniferyl and Syringyl Alcohol Synthesis.** Coniferyl alcohol (4-hydroxy-3-methoxy-4-hydroxy-3,5-methoxy cinnamyl alcohols (G and S) was obtained according to the procedure described by Ludley and Ralph.<sup>21</sup> Coniferaldehyde and sinapaldehyde (4 g) was dissolved in ethyl acetate (250 mL) and then reduced by sodium borohydride (1.67 g, 44 mmol, 2 equiv). After overnight stirring, the yellow precipitate was poured into water (250 mL). This mixture was stirred for 1 h and then extracted by ethyl acetate (3 times). Combined organic fractions were dried over magnesium sulfate. Solvent was removed, and the solid residue was recrystallized in a dichloromethane/hexane mixture, giving a 75% yield pure coniferyl alcohol. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): 6.89 (m, 3H), 6.53 (d, 1H), 6.21 (d, 1H), 4.18 (d, 2H), 3.85 (s, 3H).

**Synthesis of HX–DHP Complexes.** Three solutions were prepared for the polymerization experiments. Solution A consisted of 100 mg of HX dissolved in 100 mL of phosphate buffer (30 mM, pH 5.0); solution B consisted of 100 mg of coniferyl alcohol and coniferyl/sinapyl alcohols 1/1 mixture (w/w) in 3 mL of dioxane and 22 mL of HX (1 g/L) in phosphate buffer (30 mM, pH 5.0); solution C consisted of 0.1 mL (2 equiv compared to coniferyl alcohol) of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 wt % in water) in 25 mL of HX (1 g/L) in phosphate buffer (30 mM, pH 5.0). Polymerization was run according the Zutropfverfahren method (ZT). Solutions B and C were gradually added during

240 min to 50 mL of solution A, containing 5 mg of peroxidase (EC 1.11.1.7 purchased from Sigma 250–330 unit/mg) for 4 h at 25 °C. For the TEM observations, only the final samples were used whereas the SEC studies were done on samples taken out of the solution at 10, 30, and 60 min and at the end of the reaction.

**Transmission Electron Microscopy.** Drops of particle suspensions were deposited onto glow-discharged carbon-coated microscopy grids. Prior to complete drying, they were negatively stained with 2% uranyl acetate. In addition, specimens for cryo-TEM were prepared by quench-freezing thin films of the suspensions in liquid ethane.<sup>22</sup> They were mounted in a Gatan 626 cryo-holder and maintained at low temperature in the microscope (~180 °C). All samples were observed using a Philips CM200 “cryo” microscope operating at 80 kV. Images were recorded on Kodak SO163 films. The negatives were digitized off-line with a Kodak Megaplus CCD camera, and the particle diameter was measured using the ImageJ software.

**Multidetected Size Exclusion Chromatography.** Size exclusion chromatography is the most common technique to obtain information about the molar mass of polymers. It is especially adapted in the case of polydisperse samples, and the use of an online molar mass-sensitive detection method such as multiangle laser light scattering allows absolute molar mass and size determination for each slice across the sample peak. Thus it offers the possibility to fully describe the molecular distribution of the samples.

Measurements were performed on a multidetection system consisting of a UV detector (Waters 486), a refractive index detector (Waters 410), and a multiangle laser light scattering detector (Dawn MALLS, 632.8 nm, Wyatt Corporation). The MALLS detector worked simultaneously at 18 angles. Therefore, the apparatus was equipped with nine interference filters (on odd-numbered detectors) with a bandwidth of 1 nm to avoid any overestimation of measurement induced by DHP's fluorescence. The ASTRA software (Wyatt) was used for light scattering data collection during SEC runs. Typically, 100–200 μL sample solutions were injected at a concentration of 0.05–2%. Samples were filtered on a 0.45 μm PTFE filter, and percentage recoveries are reported in Table 3. Separation was performed on thermostatically controlled Shodex OH pack 802, 803, and 805 columns (each 4.6 mm × 300 mm) at 60 °C with a flow rate of 1 mL/min using NaNO<sub>3</sub> solution (50 mM) containing 0.02% of NaN<sub>3</sub>. We do not detect any significant changes in the molar masses and size distributions according to the flow rate variation, volume of injection, and injected concentrations (data not shown), suggesting that no aggregation occurs or at least that, if they exist, aggregates form stable structures within the range of the physicochemical conditions used in this study.

The responses of the MALLS detectors were normalized to the 90° detector signal. The normalization of the apparatus detector was performed with two low molecular weight monodisperse pullulan standards (20 000 and 11 000 g/mol). The molar mass of the particles and the root-mean-square radius were obtained using the Berry plot procedure with a first-order fit furnished by the Astra software. Those are independent of any calibration or reference standards, but the sample concentration for each slice of the peak needs to be known. It is usually recalculated from refractive index elution profiles using the refractive index increment ( $dn/dc$ ) that is a specific value related to the polymer structure and solvent. The  $dn/dc$  value of the DHP/HX mixtures changed for each reaction time since DHP and HX have different individual  $dn/dc$  and DHP/HX ratios increasing during the reaction course. However,  $dn/dc$  for each DHP/HX ratio (equivalent to reaction time) can be calculated by using a mixing law. The  $dn/dc$  values of the HX/DHP mixtures were estimated from the following calculation  $(dn/dc)_{HX-DHP} = x_{HX}(dn/dc)_{HX} + x_{DHP}(dn/dc)_{DHP}$ , where  $x_i$  is the weight fraction of compound  $i$  and  $(dn/dc)_i$  is its refractive index increment in water. For all calculations only the odd-numbered detectors equipped with fluorescence filters were used. For HX, a  $dn/dc$  value equal to 0.146 was used in agreement with previous studies.<sup>23</sup> For DHPs, since they are insoluble in water, the refractive index increment was calculated from  $(dn/dc)_{DHP} = [(\rho_{DHP} - \rho_{DMF})(dn/dc)_{DHP/DMF} - (\Delta n_{DMF-water})]/$

**Table 1.** Physicochemical Characteristics of HX Extracted from Maize Bran by Alkaline Extraction<sup>a</sup>

	HX-40	HX-90
carbohydrates content (%)		
neutral sugar	93.4	92.5
Ara	33.7	33.4
Xyl	51.3	51.1
Gal	8.4	8.2
uronic acids	6.6	7.5
Ara/Xyl	0.66	0.65
phenolics acid content ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	4.85	0.29
$M_w^b \times 10^{-5}$	2.52	2.68
polydispersity ( $M_w/M_n$ )	1.36	1.18

<sup>a</sup> HX-40 was extracted at 40 °C with 1.5 M KOH, and HX-90 was extracted at 90 °C with 1% Ca(OH)<sub>2</sub>. <sup>b</sup>  $M_w$  = average molar mass.

( $\rho_{\text{DHP}} - \rho_{\text{water}}$ ), where  $\rho_I$  is the density of compound  $I$ ,  $(dn/dc)_{\text{DHP/DMF}}$  is the refractive index increment of the DHP in the DMF, that has been measured to be equal to 0.147,<sup>24</sup> and  $\Delta n_{\text{DMF-water}}$  is the difference between the refractive indices of the two solvents. Thus the  $(dn/dc)$  values used here lie between 0.146 and 0.278 depending on the DHP content of the complexes.

A major difficulty arose when the mixture injected on the SEC was not homogeneous along the elution peak. This was the case for the HX–DHP mixture since we detected that UV elution profiles that represent DHPs (the only UV-absorbing materials) cannot be superimposed to the refractive index elution profiles (total material). DHPs were eluted rather at low elution volumes (high molar mass). Thus the absolute determination of molecular weight would require the calculation of the  $dn/dc$  value for each slice studied. This would imply a considerable time-consuming procedure. We ran several simulations using different  $dn/dc$  values representing different DHP/HX ratios around the average value calculated for each reaction time. We found that these variations did not drastically change the absolute molecular mass and the molecular mass distribution. Thus, we assumed that the  $dn/dc$  values remained constant all over the peak, and we used the values calculated for each DHP/HX ratio. This determination did not interfere with the determination of the root-mean-square (rms) gyration radius ( $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ ), the second parameter obtained with MALLS, since this parameter was calculated from the angular dependence of the scattering intensity independently of the concentration determination.<sup>25</sup>

## Results

**Extraction and Characterization of HX and Synthesis of HX–DHP Complexes.** HXs were extracted from maize bran using alkaline extraction at 40 °C with 1.5 M KOH (HX-40) and under more severe conditions at 90 °C with 1% Ca(OH)<sub>2</sub> (HX-90).<sup>19</sup> The choice of maize bran instead of other HX sources was guided by two main reasons. The first one is that the maize bran is almost devoid of the lignin<sup>20</sup> that usually

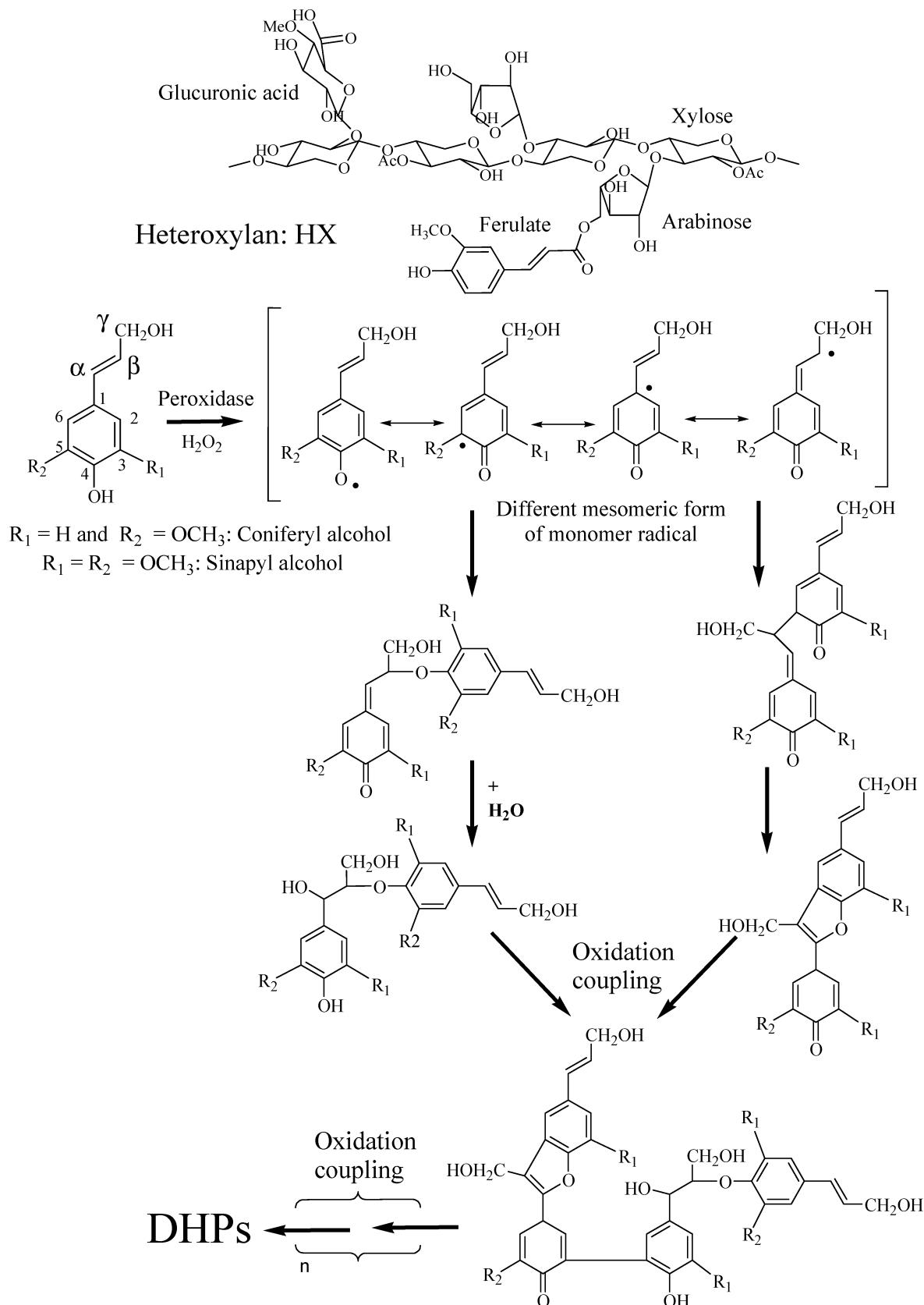
contaminates HX samples extracted from lignified samples. The presence of lignin contamination would have introduced artifacts since residual lignin profoundly affects the associative behavior of polysaccharides.<sup>26,27</sup> The second reason is that the maize bran extraction temperature especially modifies the FA content of the samples while other structural parameters such as molar mass, arabinose/xylose ratio, or glucuronic acid content that may influence the studied patterns remain nearly constant (Table 1). Indeed, an increase in temperature leads to the complete deesterification of the FA–arabinose ester linkage whereas at lower temperatures some of the FA moieties are preserved. Thus, with this sample set, we focused our study on a single parameter, which is the FA effect on the supramolecular organization on HX–DHP complexes. FA moieties are sensitive to oxidation and can be coupled to form dehydromers, trimers, or tetramers.<sup>6–8</sup> Such polysaccharides cross-coupling results in gel formation when a sufficient HX concentration is used, namely, 0.2–0.4% for wheat or rye flour water-extractable HX<sup>3,28</sup> and 1% for HX-40.<sup>29</sup> In the present study, the HX concentration (0.1%) is rather low compared to those usually used to form gels. However, it is obvious that the first action of the peroxidase used for monolignol polymerization is the oxidation of FA, resulting in the formation of interchain linkages (di-FA or tri-FA). This assumption is supported by the concomitant decrease in the releasable FA monomer content and the increase in dehydromers content measured in arabinoxylans after peroxidase treatment (Table 2). Thus, the local formation of a gel or a microgel cannot be ruled out in the case of HX-40 polymerization, and at least local cross-links between HX chains are obvious.

HX–DHP assemblies were obtained through the polymerization of the mono- and dimethoxyaled lignin monomers (coniferyl, G, and sinapyl alcohols, S; Scheme 1) in the HX solution. G and S units are the major monomers of the graminaceous lignin. Thus the reaction mixtures were composed by homo dehydrogenation polymer (DHP-G) from solely gaiacyl monomers or via a 1:1 ratio of coniferyl and sinapyl alcohols (DHP-GS). Polymerization proceeded according the Zutropfverfahren (ZT) method in which the monomers and hydrogen peroxide (enzyme cofactor) are continuously added to a solution of polysaccharides containing the oxidative enzyme. Monolignols are oxidized into radicals that can react either with other monolignols, with the growing DHP polymers, or with feruloylated HX. Indeed, besides the formation of di-FA and tri-FA, ferulate structure can be cross-linked with DHP during the dehydrogenative process.<sup>30</sup> Such a feature is supported by previous works that demonstrated that, during lignification, ferulate structures are incorporated into lignins.<sup>5,30</sup> In our experiments, only 7.0% and 10.5% of the starting FA were identified as monomeric FA or dimers in the HX-40–DHP-G and HX-40–DHP-GS samples. Polymerizations yielded trans-

**Table 2.** Ferulic Acid, p-Coumaric Acid, and Dehydroferulate Release from Heteroxylans (HXs) Following Saponification before and after Monolignol Polymerization<sup>a</sup>

phenol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	HX-40	HX-40–DHP-G	HX-40–DHP-GS	HX-90	HX-90–DHP-G	HX-90–DHP-GS
p-coumaric acid	0.55	0.17	0.089	0.14	0.035	0.017
ferulic acid	3.5	0.704	0.051	0.15	0.072	0.031
5–5'	0.620	0.025	0.044	0	0.0026	0.022
$\beta$ -0–4	0.180	0.042	0.146	0	0.039	0.049
5–8'	0	0.01	0.17	0	0.08	0.104
total phenol	4.8	0.29	0.5	0.29	0.156	0.223

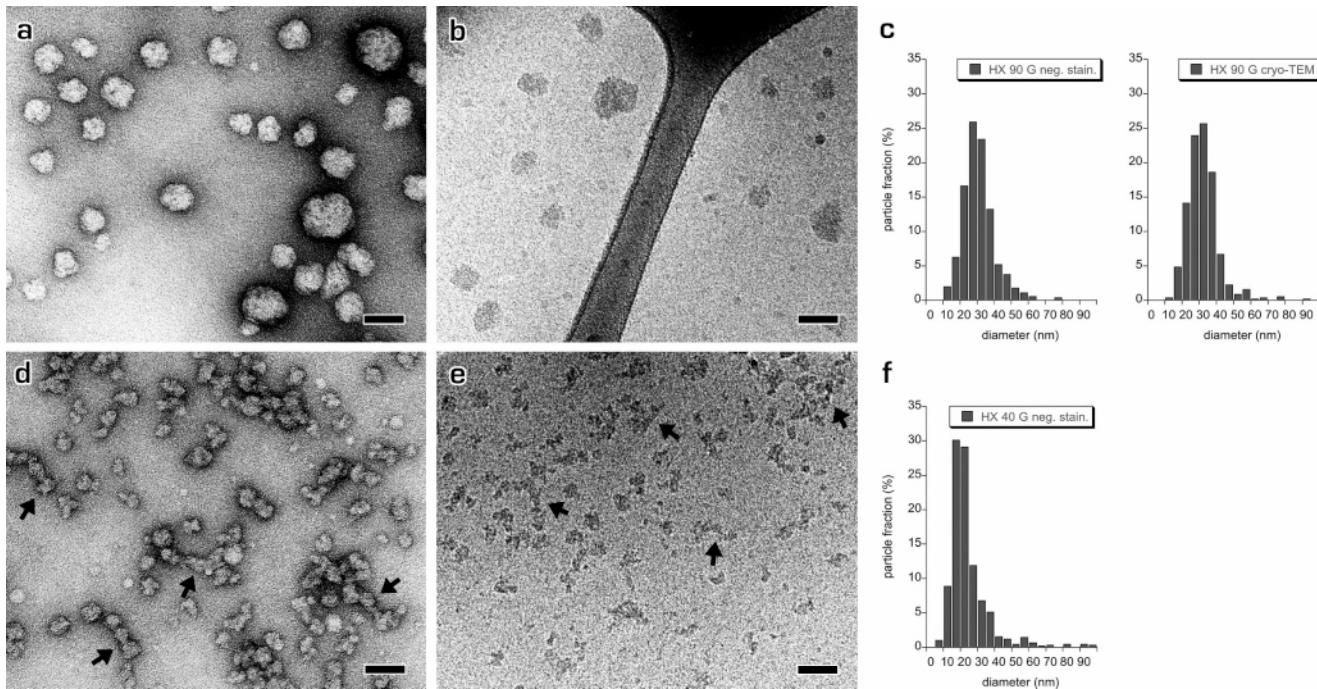
<sup>a</sup> 5–5', 8–0–4, and 5–8' are the three major dehydromers of ferulate released from HX extracted from maize bran by alkaline extraction. HX-40 was extracted at 40 °C with 1.5 M KOH, and HX-90 was extracted at 90 °C with 1% Ca(OH)<sub>2</sub>.

**Scheme 1.** Heteroxylans Structure and Monolignol Polymerization

parent colloidal suspensions of HX–DHP in all of the reactions. Suspensions were stable over periods of months.

**Morphology and Size Distribution of Particles.** A typical image of a negatively stained HX-90–DHP-G preparation is

shown in Figure 1a. The particles appear as fairly well individualized spheroidal objects although aggregation is sometimes observed. Images were also recorded from unstained cryo-TEM specimens. As seen in Figure 1b, the shape and size of



**Figure 1.** TEM images of (a) negatively stained and (b) ice-embedded HX-90–DHP-G particles (bars, 50 nm); (c) corresponding size-distribution histograms. TEM images of (d) negatively stained and (e) ice-embedded HX-40–DHP-G particles (bars, 50 nm). Arrows in part d indicate spheroidal units associated into stringlike objects. Arrows in part e point to similar elongated objects. (f) Size-distribution histogram determined from the negatively stained preparation.

HX-90–DHP-G particles embedded in vitreous ice are rather similar to those of dry particles (Figure 1a). No aggregation was detected. Size distribution histograms were determined by measuring the diameters of particles from TEM and cryo-TEM images. The outline of each particle was fitted to an equivalent ellipse. The diameter was calculated as the average between the largest and the lowest diameters of the ellipse. Number and weight average diameters ( $\overline{D}_n$  and  $\overline{D}_w$ , respectively) as well as a polydispersity index  $P_d$  were calculated using the expressions presented in ref 31

$$\overline{D}_n = \frac{\sum_i N_i D_i}{\sum_i N_i} \quad (1)$$

$$\overline{D}_w = \frac{\sum_i N_i D_i^4}{\sum_i N_i D_i^3} \quad (2)$$

$$P_d = \frac{\overline{D}_w}{\overline{D}_n} \quad (3)$$

where  $D_i$  is the diameter and  $N_i$  is the number of particles in the  $i$ th class.

The size-distribution histograms corresponding to negatively stained and fast-frozen preparations are shown in Figure 1c. They are asymmetric and extend toward the larger diameters. We calculated  $\overline{D}_n = 30.8$  nm (standard deviation (std) = 9.0 nm),  $\overline{D}_w = 39.4$  nm, and  $P_d = 1.3$  for dry particles and found  $\overline{D}_n = 25.6$  nm (std = 9.1 nm),  $\overline{D}_w = 40.0$  nm, and  $P_d = 1.5$  for

**Table 3.** Mean Number and Weight Diameters ( $\overline{D}_n$  and  $\overline{D}_w$ , Respectively), Standard Deviation (std, in Brackets), Polydispersity and Connectivity Indices ( $P_d$  and  $C$ , Respectively) Determined from TEM Images of Negatively Stained and Ice-Embedded Particles (HX-90–DHP-G Only)<sup>a</sup>

sample	$\overline{D}_n$ [std] (nm)	$\overline{D}_w$ (nm)	$P_d$	$C$ (%)
HX-90–DHP-G (NS)	30.8 [9.0]	39.4	1.3	11.9
HX-90–DHP-G (cryo)	25.6 [9.1]	40.0	1.5	n.d.
HX-90–DHP-GS (NS)	32.0 [15.2]	71.0	2.2	19.3
HX-40–DHP-G (NS)	24.6 [12.2]	55.2	2.2	84.2
HX-40–DHP-GS (NS)	18.4 [16.2]	25.7	1.4	45.5

<sup>a</sup> NS, negative staining; cryo, cryo-TEM; n.d., not determined.

ice-embedded particles (Table 3). The slight difference in  $\overline{D}_n$ , approximately 5 nm, can be explained by considering that hydrated and soft HX-90–DHP-G particles could flatten to some extent when they dried on the supporting carbon film, resulting in an increase of the apparent particle diameter. However, the difference remains below the standard deviation value (approximately 9 nm).

The objects observed in the HX-40–DHP-G suspension have more complex shapes. Although individual particles can be recognized in images of negatively stained specimens (Figure 1d), they often seem to constitute the basic units of longer stringlike objects. The images of ice-embedded particles show that these elongated objects exist in suspension (Figure 1e) although the shapes of the constituting units cannot be defined with precision. This suggests that this complex feature is not the result of aggregation occurring during the drying process of the negative staining procedure. It is difficult to properly evaluate the sizes of such irregular objects. Using images of negatively stained samples, we measured the diameters of particles as either isolated or elementary units forming the longer strings (see arrows in Figure 1d-e). In addition, we defined a

connectivity index  $C$  as the percentage of bound objects with respect to the total number of particles measured

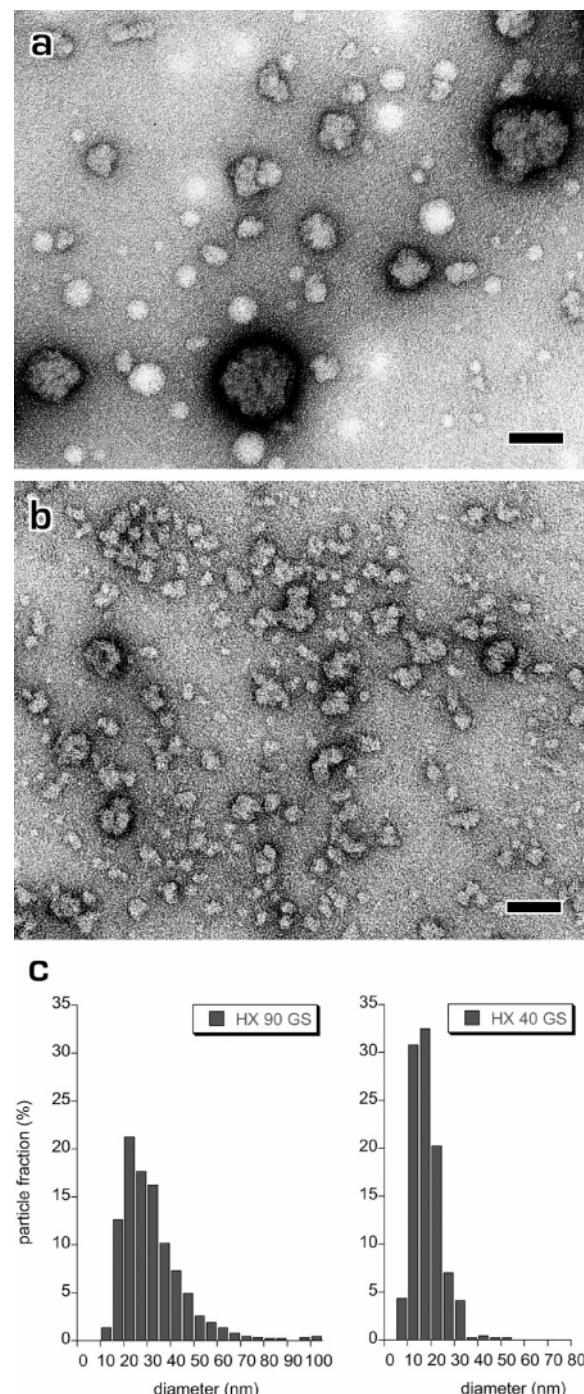
$$C = \frac{\sum_i C_i}{\sum_i N_i} \times 100 \quad (4)$$

where  $C_i$  is the connectivity coefficient of particle  $i$  and  $N_i$  is the number of particles in the  $i$ th class.  $C_i$  equals 1 if the particle is in contact with one or more neighbor and 0 if it is isolated. The size-distribution histogram of negatively stained HX-40–DHP-G particles is shown in Figure 1f. It is asymmetric toward the larger particles. Number and weight average diameters as well as polydispersity and connectivity indices are summarized in Table 3:  $\bar{D}_n = 24.6$  nm (std = 12.2 nm),  $\bar{D}_w = 55.2$  nm,  $P_d = 2.2$ , and  $C = 84.2\%$ . HX-40–DHP-G elementary particles are thus smaller than those in HX-90–DHP-G and more polydisperse. However, while HX-90–DHP-G particles are mostly individual, those in HX-40–DHP-G seem to be associated into elongated objects.

As seen from images of negatively stained preparations, HX-90–DHP-GS particles also have a spheroidal shape (Figure 2a). The mean diameters and polydispersity index are  $\bar{D}_n = 32.0$  nm (std = 15.2 nm),  $\bar{D}_w = 71.0$  nm, and  $P_d = 2.2$ . A significant difference between the size distributions of HX-90–DHP-G and HX-90–DHP-GS was observed. The size distribution of HX-90–DHP-GS is wider than that of HX-90–DHP-G particles, and the polydispersity is higher (Figure 2b). Cryo-TEM images of ice-embedded HX-90–DHP-GS particles were not available for comparison.

The images of negatively stained HX-40–DHP-GS (Figure 2b) particles are rather similar to those from HX-40–DHP-G preparations (Figures 1d and 1e). Some associations of elementary spheroidal objects can be seen, but the number of stringlike aggregates seems lower than that for HX-40–DHP-G, which is confirmed by the lower connectivity index  $C = 45.5\%$ . We measured  $\bar{D}_n = 18.4$  nm (std = 16.2 nm),  $\bar{D}_w = 25.7$  nm, and  $P_d = 1.4$ . Basic elements are thus smaller and less polydisperse than in the case of HX-40–DHP-G.

**Size Exclusion Chromatography with Online Multiangle Laser Light Scattering.** Besides the morphological characterization obtained from TEM images, we used size exclusion chromatography with online multiangle laser light scattering to obtain information on the organization of the particles and their evolution during polymerization. Samples were analyzed at different reaction times (0, 10, 30, 60, and 240 min). The particles analyzed by TEM correspond to the sample taken at 240 min. For all injections, we estimated the amount of products analyzed by calculating the recovery percentage (Table 3). This parameter estimates an estimation of the loss of products due to sample filtration before elution and also adsorption phenomena that may occur during elution. In almost all cases, the percentage recovery represents a significant part of the amount injected, thus demonstrating the significance of the results. Light scattering enables the determination of the average number and weight molar masses ( $M_n$  and  $M_w$ , respectively) and the root-mean-square gyration radius ( $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ ). These parameters are independent of any calibration or reference standards. The first one requires the polymer concentration during the elution whereas the second one is calculated from the angular dependence of the scattering intensity.<sup>25</sup> In the case of polydisperse samples, the relationship between the polymer dimensions and

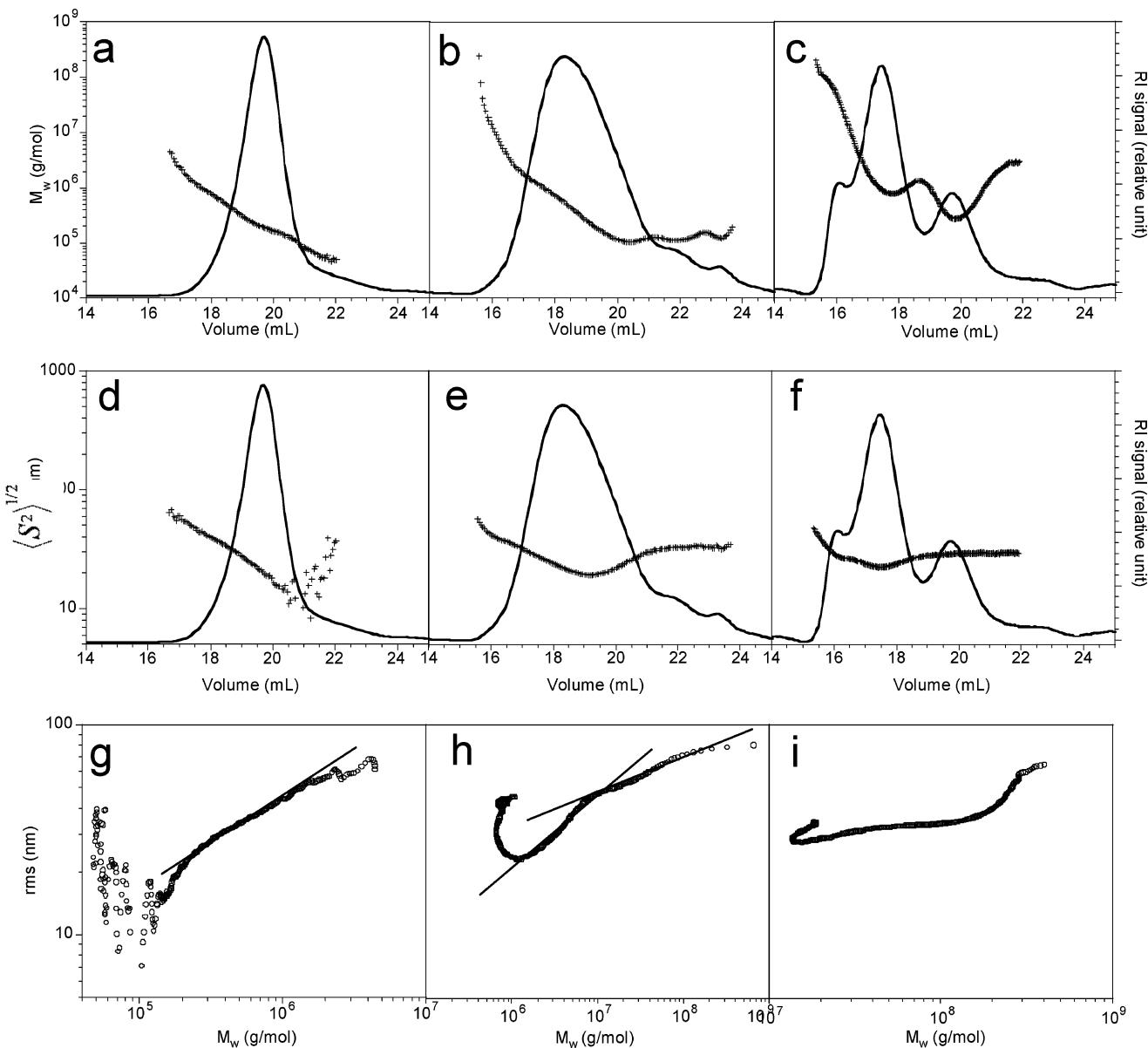


**Figure 2.** TEM images of (a) HX-90–DHP-GS and (b) HX-40–DHP-GS particles negatively stained with uranyl acetate (bars, 50 nm); (c) corresponding size-distribution histograms.

the molecular weight ( $M$ ) can be obtained. This relation is usually described as a scaling law of the form

$$\langle S^2 \rangle^{1/2} = QM^q \quad (5)$$

The power law exponent  $q$  is related to the shape of the chain and gives information about the polymer–solvent interactions and macromolecular conformations of the polymer. Values ranging from 0.5 to 0.6 are predicted for random-coil polymers in rather good solvent conditions. Rigid rod polymers present  $q$  values as high as 1 whereas spherical particles have a  $q$  value equal to 0.3. Values below 0.3 indicate a complex conformation



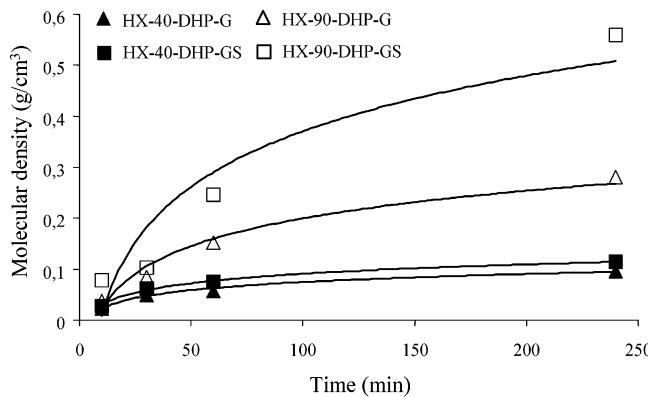
**Figure 3.** (a, b, c) and (d, e, f) distributions and scaling law (g, h, i) (log-log plot versus) for HX-40-DHP-G at reaction time  $t = 0$  (a, d, g), 30 (b, e, h), and 240 min (c, f, i). Average molecular mass in weight (g/mol) root mean square radius of gyration (nm).

and highly polydisperse samples that may reflect more complex patterns such as aggregated particles.<sup>25</sup>

Before the reaction starts, HX-40 presents a unique eluted peak that displays a regular evolution of both  $\overline{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  over the elution curve. The log–log plot of  $\overline{M}_w$  versus  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  is nearly fully linear except for the lowest molar mass values since the  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  value measured is very close to the lowest limit of detection of the system (10 nm), resulting in a noisy signal. The fit of the linear part of the scaling law plot has a slope value ( $q$ ) roughly equal to 0.5 indicating that HX is in rather good solvent conditions in the chromatographic solvent in good agreement with previous measurements.<sup>23</sup>

Figures 3d–3f display  $\overline{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  distributions at a reaction time of 30 min. Both parameters show an unusual distribution. In the first part of the elution curve (before 19 min),  $\overline{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  decrease with the elution in agreement with the SEC process, while after 19 min those parameters increase contrary to classical SEC profiles (Figures 3d and 3e). This effect induces a curvature of the scaling law plots at the low molar values (Figure 3f). Such an anomalous elution behavior

has already been observed for polyphosphagene,<sup>32,33</sup> dendrimers,<sup>34</sup> and biopolymer microgels.<sup>25</sup> In these previous works, this phenomenon was attributed to the occurrence of an extremely high molar mass fraction, such as a microgel or highly branched molecules, trapped in the column material and eluted at volumes higher than expected by the pure SEC process. This high molar mass fraction coelutes with smaller size molecules that follow the separation mechanism based on normal size exclusion increasing the polydispersity of each slice. According to the proportion of high and low mass fractions,  $\overline{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  increase or remain stable resulting in the upturn observed in the scaling law plots. Such behavior has been demonstrated in all HX–DHP samples suggesting the formation of gel structures. Such a hypothesis is consistent with the chemical structure of HX-40 since feruloylated HX is able to form a gel in the presence of an oxidative enzyme.<sup>28</sup> However, gel formation cannot be so easily deduced in the case of HX-90 samples since they are devoid of FA; it has to be assumed that the formation of large branched structures may occur during the polymerization of monolignols.



**Figure 4.** Variation with reaction time of the molecular density ( $(\rho = \bar{M}_w/N_A(\langle S^2 \rangle^{1/2})^3)$ ) for HX-40-DHP-G (triangles), HX-40-DHP-GS (squares), HX-90-DHP-G (open triangles), and HX-90-DHP-GS (open squares):  $\bar{M}_w$ , average molecular mass in weight;  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ , root-mean-square radius of gyration (nm). Lines are guides for the eyes.

Besides this anomalous behavior, at lower elution volumes, molar mass and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  behave as expected in classical SEC elution profiles (Figures 4d and 4e). Thus scaling law exponents can be calculated since two linear zones can be identified and fitted. In the first one (intermediate molar mass range), a  $q$  value of 0.48 is obtained, indicating that a part of the polymer is still in good solvent conditions (Table 3). In the highest molar mass zone, the  $q$  value is nearly equal to 0.3 (Table 4), indicating the formation of dense spheres. Since this part presents the highest concentrations of DHPs as demonstrated by the UV elution profiles (data not shown), the formation of denser structures can be related to the polymerization of monolignols. Indeed such a collapse was already demonstrated during coniferyl alcohol polymerization in the presence of pectin using light and neutron scattering.<sup>35</sup>

At the longest reaction time, the elution pattern becomes more complex (Figures 3g–3i). Increases of  $\bar{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  at low elution volumes are still visible, inducing the upturn of the scaling law process. At higher molar masses, all of the zones of the scaling law plots display  $q$  values lower than 0.3. The feature can be interpreted as the collapse of the HX–DHP structures in dense particles with complex shapes and organization.

Table 4 summarizes all of the values measured for four samples at different reaction times. Both  $\bar{M}_w$  and  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  increase during the reaction. All along the reaction, the highest values were measured for the HX-40 samples at the opposites of the results obtained by TEM. SEC-MALLS data yield also other information on the formation of HX–DHP nanoparticles. Indeed the decrease of the  $q$  exponent of the scaling law from a value of 0.5 to 0.3 then finally less than 0.3 indicates that particles collapse during the polymerization and undergo a significant densification. This is also demonstrated by the increase of the molecular density  $\rho = \bar{M}_w/(\langle S^2 \rangle^{1/2})^3$  all along the reaction that is an indication of the densification of the particles (amounts of matter by unit of volume) (Figure 4). A similar trend was already demonstrated by model approaches in the case of pectin–DHP complexes.<sup>35</sup> Values reported here are in good agreement with those calculated for pectin–DHP complexes ( $\rho = 0.21 \text{ g}/\text{cm}^3$ ) with a 1:1 pectin/DHP complex<sup>35</sup> but also for natural polymers such as glycogen ( $\rho = 0.19 \text{ g}/\text{cm}^3$ ).<sup>36</sup> Such a collapse was suggested by in vivo study.<sup>37</sup> However, evolutions of the HX–DHP densities are not identical for all of the complexes, and again HX-40 and HX-90 samples behave differently. The non-feruloylated samples reach density values higher than that of HX-40 (Figure 4).

## Discussion

The particle sizes obtained by TEM and MALLS at the end of the reaction (240 min) are significantly different. Indeed, SEC-MALLS values are 3–5 times larger than the TEM ones, whereas it has been shown in the case of phytoglycogen particles that a good agreement could be found between the results of these two techniques.<sup>31</sup> Moreover rank order is also changed. Indeed the HX-40 samples have larger  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  values than the HX-90 ones, contrary to the results found in the TEM measurements. These differences can be explained by a combination of two reasons:

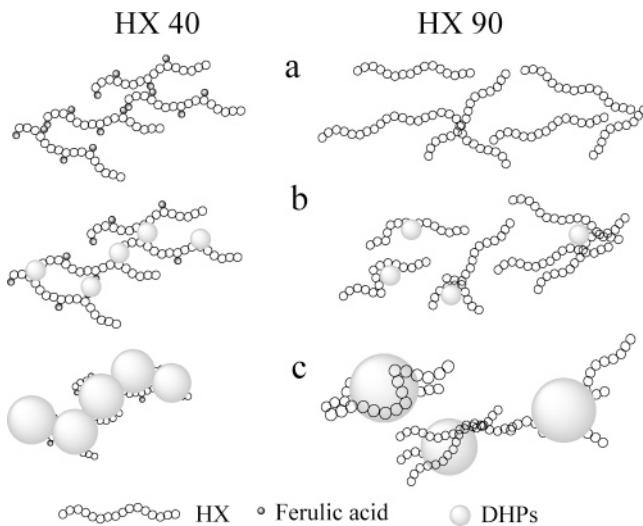
The first one is related to the calculation method chosen in the TEM approach. Since complex HX-40 sample shapes could not be properly evaluated, we measured the size of circular subunits. This measurement neglected the real sizes of the elongated objects or larger aggregates. Cryo-TEM images showed that stringlike objects existed in suspension and did not systematically result from a drying artifact. Moreover HX-90

**Table 4.** SEC MALLS Data Calculated for HX–DHP Samples during the Polymerization Reaction

time (min)	HX-40-DHP-G	HX-40-DHP-GS	HX-90-DHP-G	HX-90-DHP-GS
0	$\bar{M}_w$ (g/mol); $P$ ; $R$ (%) rms (nm) $q^b$	$2.52 \times 10^5$ ; 1.36; 86 19 0.5		$2.68 \times 10^5$ ; 1.18; 95 24 0.48
10	$\bar{M}_w$ (g/mol); $P$ ; $R$ (%) rms (nm) $q^b$	$6.36 \times 10^5$ ; 3.5; 82 37.8 0.42	$8.5 \times 10^5$ ; 2.7; 73 37 0.32	$1.12 \times 10^6$ ; 2.96; 70 37 0.3/ $<0.3$
30	$\bar{M}_w$ (g/mol); $P$ ; $R$ (%) rms (nm) $q^b$	$2.01 \times 10^6$ ; 2.15; 62 40.8 0.48/ $<0.3$	$3.04 \times 10^6$ ; 1.92; 53 43 0.35/ $<0.3$	$1.13 \times 10^6$ ; 3.2; 77 27 0.35/0.3
60	$\bar{M}_w$ (g/mol); $P$ ; $R$ (%) rms (nm) $q^b$	$2.96 \times 10^6$ ; 1.75; 60 43.5 0.42/ $<0.3$	$7.45 \times 10^6$ ; 1.83; 49 47.5 0.37/ $<0.3$	$2.07 \times 10^6$ ; 2.16; 60 28 $<0.3$
240	$\bar{M}_w$ (g/mol); $P$ ; $R$ (%) rms (nm) $q^b$	$1.43 \times 10^7$ ; 1.38; 55 63 $<0.3$	$9.09 \times 10^6$ ; 1.92; 53 52 $<0.3$	$1.33 \times 10^7$ ; 1.4; 61 39 $<0.3$

<sup>a</sup>  $\bar{M}_w$ , average molar mass;  $P$ , polydispersity ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ );  $R$ , percentage of recovery (amounts of eluted product calculated from the  $dn/dC$  divided by the amount of injected product); rms, root-mean-square radius of gyration;  $q$ , power law exponent. <sup>b</sup> When several conformations exist,  $q$  is calculated for each conformation starting from low to high molecular mass.

**Scheme 2.** Formation of HX-90–DHP and HX-40–DHP Nanoparticles<sup>a</sup>



<sup>a</sup> In step a, the ferulic acid substituents of HX-40 are cross-linked via ferulic bridges while HX-90 behaves as free chains. In step b, DHP nodules are formed and can be connected to the ferulate structure of HX-40. DHPs induce the aggregation of HX-40 and HX-90. In step c, the polymerization is complete. HX-40–DHPs form stringlike objects while HX-90–DHPs behave as more individual particles. Objects are also larger and denser since particles can coalesce and polymers can be more easily reorganized.

samples that have a very close chemical structure did not form such an association. Thus, the subunits measured in TEM are certainly not dissociated in SEC, leading to larger sizes and explaining the inversion of the size rank order. In depth analysis of size and shape of such heterogeneous and complex objects has to be considered in future work, in particular by observing TEM preparations from highly dilute samples, thus preventing any aggregation artifacts. This point supports the conclusion that elongated objects may result from covalent linkages between the elementary objects observed by TEM. Thus, this feature must be related to the feruloylation level that is the main structural difference between the two samples.

The second reason that may explain the divergence of the TEM and SEC-MALLS results is related to the occurrence of microgels or highly branched structure. Indeed, such products may also contribute to the significant increase in size measured by SEC. These structures that are demonstrated by the anomalous elution profile previously discussed may have a very low density and thus may be hardly detectable by TEM. However, they can induce higher  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$  values. This local gel formation is likely favored in the case of HX-40 samples since they contain the highest FA content.

These results clearly demonstrated the effect of the chemical structure of the preexisting polysaccharide network on the buildup of supramolecular architecture of lignin-like/polysaccharide complexes. Indeed, FA substitution that is equal to 0.29 for HX-90 and 4.85  $\mu\text{g}/\text{mg}$  for HX-40, corresponding roughly to 0.3 and 5 FA residues per 1000 xylose residues, respectively, induces important differences in the morphology and supramolecular characteristics of HX–DHP nanoparticles. As observed by TEM, the morphology of particles obtained from the highly FA-substituted HX display more complex organizations. The main pattern observed is the formation of stringlike objects composed of spheroidal elementary units whereas less feruloylated HX behaves more as individual particles. The latter particles were found to be denser than the first one. Such differences must be related to the FA reactivity. Previous works

have demonstrated that during lignification, the cell wall becomes cross-linked by dehydrogenation of ferulate monomers and by incorporation of ferulate monomers and dehydrodimers into lignins.<sup>5</sup> This result implies that FAs either cross-link the HX chains and/or act as nucleation points for lignin monomers in agreement with previous results.<sup>38</sup> Assuming that a similar behavior took place in our model experiments would mean that DHPs are anchored to HX in the HX-40 sample. The exact mechanism has to be determined since it could be attributed either to cross-coupling between DHPs and ferulates or to the formation of a preexisting network with FA dimer formation creating hydrophobic domains where DHPs polymerization may be favored. Whatever the mechanism, the growth of DHP molecules/aggregates is favored and promoted by FA, resulting in cross-linking of DHP particles on HX chains. As a consequence, DHP particles can be interlinked by HX chains, since two different FA moieties of a single HX chain may react with two different DHP particles. Thus, when growth and densification of DHP particles occur, they connect to each other and form the stringlike structures. Such intra- and interparticle connections may induce steric hindrance due to entanglement of chains limiting their ability to reorganize. Such processes may limit the densification phenomena. The lack of FA may allow particle densification.

Beside the of FA effect, syringyl monomers also seem to have a certain impact on particle densification since GS particles reach a higher condensation level in both feruloylated and non-feruloylated samples (Figure 4). This result is supported by the decrease of the  $q$  exponent observed at early reaction times in the case of the polymerization of a GS mixture (Table 3). This finding may indicate that syringyl monomers present a higher affinity for the HX than the G ones. This point will require a future in depth investigation.

The results show the role of the phenolic substitution on the construction of the supramolecular organization of HX–lignin-like composites. In vivo, such a parameter may be crucial to control of the ultrastructural organization of lignin. Indeed, the HX–FA network may act as a scaffold and a template for the lignin polymer growth. Thus besides the chemical importance of FA, the control of the distribution and the amount of the FA substitution can be proposed as a means for genetic machinery to control the buildup of cell wall elements and the resulting properties of this composites. These results also emphasize the highly efficient interactions occurring between xylans and lignins, as already suggested for wood samples.<sup>39</sup> These findings support the hypothesis that xylans are intimately linked with the lignin network.

## References and Notes

- (1) Boudet, A. M. In *The Plant Cell Wall*; Rose, J. K. C., Eds., Blackwell Publishing: Oxford, U. K., 2003; pp 155–178.
- (2) Fratzl, P.; Burgert, I.; Gupta, H. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 5575.
- (3) Izidorczyk, M. S.; Biliaderis, C. G. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *28*, 33.
- (4) Ishii, T. *Plant Sci.* **1997**, *127*, 111.
- (5) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6106.
- (6) Carvajal-Millan, E.; Guijliarelli, B.; Belle, V.; Rouau, X.; Micard, V. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *59*, 181.
- (7) Bunzel, M.; Ralph, J.; Bruning, P.; Steinhart, H. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6409.
- (8) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5845.
- (9) Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J.; Criton, M. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 899.
- (10) Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 3845.

- (11) Saulnier, L.; Crepeau, M. J.; Lahaye, M.; Thibault, J. F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 82.
- (12) Jacquet, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Mhamdi, F.; Rolando, C. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2746.
- (13) Tanahashi, M.; Higuchi, T. *Wood Res.* **1981**, *67*, 29.
- (14) Higuchi, T.; Ogino, K.; Tanahashi, M. *Wood Res.* **1971**, *51*, 1.
- (15) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Zon, J.; Amrhein, N. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1077.
- (16) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T.; Pell, A. N. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1453.
- (17) Kerr, E. M.; Fry, S. C. *Planta* **2004**, *219*, 73.
- (18) Fry, S. C. *New Phytol.* **2004**, *161*, 641.
- (19) Chanliaud, E.; Saulnier, L.; Thibault, J. F. *J. Cereal Sci.* **1995**, *21*, 195.
- (20) Lapierre, C.; Pollet, B.; Ralet, M.-C.; Saulnier, L. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 765.
- (21) Ludley, F. H.; Ralph, J. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2942.
- (22) Harris, J. R. In *The Thin Film Techniques*; Bios Scientific Publishers: Oxford, U. K., 1977.
- (23) Chanliaud, E.; Roger, P.; Saulnier, L.; Thibault, J. F. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *31*, 41.
- (24) Cathala, B.; Saake, B.; Faix, O.; Monties, B. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1020*, 229.
- (25) Wyatt, P. *J. Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 1.
- (26) Saake, B.; Kruse, T.; Puls, J. *Bioresour. Technol.* **2001**, *80*, 195.
- (27) Linder, A.; Bergman, R.; Bodin, A.; Gatenholm, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 5072.
- (28) Carvajal-Millan, E.; Guilbert, S.; Doublier, J. L.; Micard, V. *Food Hydrocolloids* **2006**, *20*, 53.
- (29) Derville-Pinel, G.; Rimsten, L.; Saulnier, L.; Andersson, R.; Aman, P. *J. Cereal Sci.* **2001**, *34*, 207.
- (30) Ralph, J.; Helm, R. F.; Quideau, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1992**, *21*, 2971.
- (31) Putaux, J. L.; Buleon, A.; Borsali, R.; Chanzy, H. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 145.
- (32) Laguna, M. T. R.; Saiz, E.; Tarazona, M. P. *Polymer* **2000**, *41*, 7993.
- (33) Laguna, M. T. R.; Tarazona, M. P. *Polymer* **2001**, *42*, 1751.
- (34) Percec, V.; Ahn, C. H.; Cho, W. D.; Jamieson, A. M.; Kim, J.; Leman, T.; Schmidt, M.; Gerle, M.; Moller, M.; Prokhorova, S. A.; Sheiko, S. S.; Cheng, S. Z. D.; Zhang, A.; Ungar, G.; Yeardley, D. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8619.
- (35) Lairez, D.; Cathala, B.; Monties, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, D.; Gorrichon, L. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 763.
- (36) Yoo, S. H.; Jane, J. L. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*, 307.
- (37) Terashima, N.; Awano, T.; Takabe, K.; Yoshida, M. *C. R. Biol.* **2004**, *327*, 903.
- (38) Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 167.
- (39) Salmen, L.; Olsson, A. M. *J. Pulp Pap. Sci.* **1998**, *24*, 99.

BM060885S

# Chapitre n° 4

# Chapitre n° 4

*Synthèse et caractérisation de nanoparticules DHP-Arabinoxylane:  
Diffusion de la lumière et des neutrons aux petits angles*

*(Publication n°4, à soumettre à Biomacromolécules).*



(publication n°4 : à soumettre à biomacromolécules)

**Synthèse et caractérisation de nanoparticules DHP-Arabinoxylane: Diffusion de la lumière (DL) et des neutrons aux petits angles (DNPA).**

*A. Barakat<sup>a</sup>, D. Lairez<sup>b</sup>, L. Saulnier<sup>c</sup>, B. Chabbert<sup>a</sup>, B. Cathala<sup>a, c</sup>*

<sup>a</sup>INRA UMR FARE, CREA, 2 Esp R. Garros, 51686 Reims Cedex, France

<sup>b</sup>LLB CEA/CNRS CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette France

<sup>c</sup>INRA, Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages, Rue de la Géraudière, BP 71627, F 44316 Nantes



## INTRODUCTION

Nous avons polymérisé l'alcool coniférylique et un mélange d'alcool coniférylique/sinapylque en présence de deux types d'hétéroxylane (HX-40 et HX-90) différant entre eux par la proportion d'acide férulique (FA), le premier renferme une teneur en FA non négligeable ( $3,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) alors que le deuxième (HX-90) en est pratiquement dépourvu ( $0.15\mu\text{g}/\text{mg}$ )<sup>1</sup>. L'effet de ces paramètres structuraux sur la morphologie et la structure des nanoparticules HX-DHP a été évaluée après caractérisation des produits de polymérisation obtenus à partir des ces HX (Chap n°3). La morphologie a été étudiée par microscopie électronique à transmission (MET). Nous avons ainsi pu observer des agrégats interconnectés composés d'unités élémentaires sphériques dans le cas des nanoparticules obtenues avec la fraction HX-40 aussi bien dans le cas du monomère G que du mélange GS. Par contre concernant le HX-90, nous avons observé des objets isolés<sup>1</sup>. Le suivi de la réaction de polymérisation par la CES-DLMA (chromatographie d'exclusion stérique couplé à la diffusion de lumière multi-angle) a permis de mettre en évidence que les nanoparticules sont plus denses avec le HX-90 qu'avec le HX-40. Ceci met en évidence l'effet de FA sur la structure supramoléculaire des nanoparticules. Par ailleurs, le précurseur Syringyle (S) semble induire la formation de particules plus denses que les unités G<sup>1</sup>.

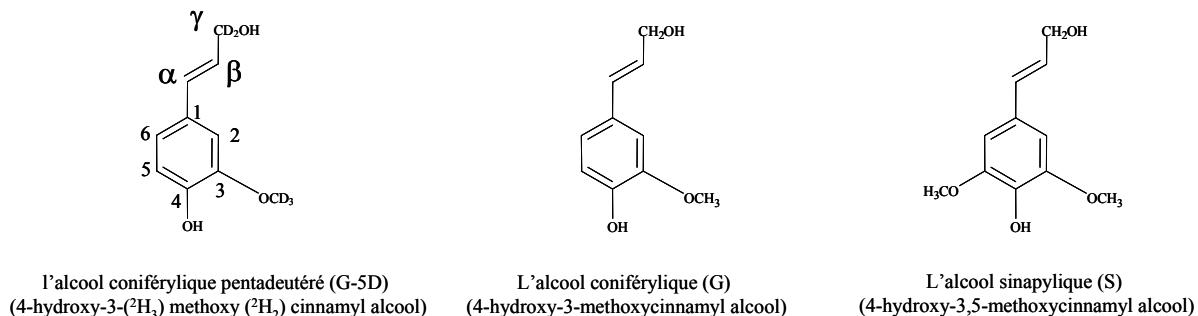
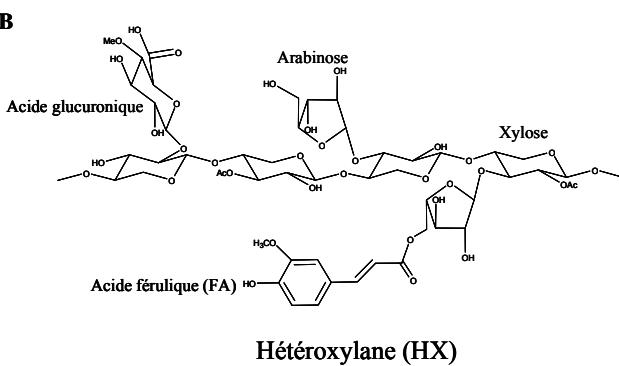
Afin de préciser l'organisation supramoléculaire et le comportement de ces polymères au sein des complexes HX-DHP, nous les avons étudiés par diffusion de la lumière (DL) et diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA). Ces outils sont puissants et bien adaptés pour la caractérisation des solutions colloïdales. Les deux techniques (DL et DNPA) permettent d'étudier la façon dont ces polymères s'organisent et interagissent, ainsi que

certaines de leurs propriétés dynamiques. La DL permet d'accéder à des ordres de grandeurs caractéristiques allant de la dizaine de nanomètre jusqu'au micron, alors que les neutrons permettant d'atteindre des échelles plus petites (1 à 100nm). De plus, la mise à profit de la propriété des neutrons à distinguer le comportement des polymères hydrogénés des polymères deutérés permet d'identifier le comportement individuel d'un polymère (HX ou DHP) au sein d'un mélange HX-DHP. Cette technique dite « variation de contraste »<sup>2</sup> a déjà été utilisée dans le cas de mélange de polymères synthétiques<sup>3-5</sup> mais également dans le cas de complexes pectine-DHP-G<sup>6</sup>. Ces dernières études ont notamment permis de mettre en évidence que les pectines et les DHP-G, même s'ils participent au même complexe pectine-DHP-G, ne sont pas vraiment mélangés mais présente une nette séparation de phase à l'échelle nanométrique<sup>6</sup>. Ainsi, au-delà de la compréhension de l'influence de l'acide férulique, la détermination de la structure interne des nanoparticules HX-DHP permettra une meilleure compréhension des liens entre polyosides et lignines et, par comparaison avec les résultats obtenus sur le complexe pectine-DHP, une meilleure connaissance du phénomène de lignification dans les parois.

## MATERIELS ET METHODES

**Synthèse de l'alcool coniférylique (G) (4-hydroxy-3-methoxycinnamyl alcool) et sinapylique (S) (4-hydroxy-3,5-methoxycinnamyl alcool). Synthèse de l'alcool coniférylique pentadeutéré (4-hydroxy-3-( $^2\text{H}_3$ ) methoxy ( $^2\text{H}_2$ ) cinnamyl alcool) ou  $^2\text{H}_5$ -alcool coniférylique.**

L'alcool coniférylique (G) et l'alcool sinapylique (S) ont été synthétisés selon la méthode décrite par Lidley et Ralph.<sup>7</sup> L'alcool coniférylique- $^2\text{H}_5$  a été synthétisé selon la méthode décrite par Lairez et coll.<sup>6</sup> (Schéma 1A).

**A****B**

**Schéma 1 : A)** Structure de l'alcool coniférylique pentadeutéré (G-5D), l'alcool coniférylique (G) et l'alcool sinapylique (S). **B)** Structure de l'hétéroxylane (HX).

**Polymérisation de l'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique en présence des hétéroxylanes (HX-40 et HX-90).**

Trois solutions ont été préparées pour la polymérisation du monomère de lignine (G et GS) en présence des solutions d'hétéroxylane (Schéma 1A et B) HX-40 et HX-90 (0.1 %) extrait de son de maïs, respectivement à 40 °C avec KOH 1.5M et à 90°C avec Ca(OH)<sub>2</sub>1%<sup>1</sup>.

-**Solution A** : solution de HX (1g/L, 100 mL) préparée dans un tampon phosphate (1/30N, pH 5)

-**Solution B** : 100 mg de monomère de lignine G ou GS dissous dans 2 mL de dioxane et 23 mL de Solution A, (100mg de G) dans le cas de monomère G seul et (50 mg de G + 50 mg de S) dans le cas de monomères GS.

-**Solution C**: 0.1 ml de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35% wt dans l'eau (2 équivalents par rapport au monomère de lignine) dissous dans 25 ml de Solution A.

La Solution B et la Solution C sont additionnées progressivement « goutte à goutte : Zutropfverfahren (ZT) » pendant 4h dans 50 mL de Solution A contenant 5 mg de peroxidase (EC 1 11.1.7, Sigma (250-330 unit/mg)) et sous agitation à 25 °C. À la fin de la réaction, nous avons obtenu des suspensions colloïdales correspondant aux complexes : HX-90-DHP-G, HX-90-DHP-GS, HX-40-DHP-G et HX-40-DHP-GS.

**Diffusion statique (DSL) et dynamique (DDL) de la lumière**

Les expériences de diffusion de la lumière (DSL et DDL) ont été effectuées avec un laser He-Ne à une longueur d'onde de radiation incidente  $\lambda_0 = 488$  nm. Ces expériences ont été réalisées en utilisant le toluène comme référence. Le rapport de Rayleigh ( $R$ ) est égal à  $4.27 \times 10^{-5}$  cm<sup>-1</sup> pour le toluène. Les mesures de diffusion des échantillons ont été effectuées

dans des tubes de quartz de 1 cm de diamètre à différents angles de diffusion  $\theta$  ( $15^\circ < \theta < 150^\circ$ ) avec un photomultiplicateur Hamamatsu H7155. Les vecteurs de diffusions q correspondant sont les suivants :  $3.4 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1} < q = (4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2) < 2.5 \times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$  où l'indice de réfraction pour l'eau  $n = 1.333$ , (pour plus des détails voir les références<sup>1,6</sup>) (**Annexes**). Le  $dn/dC$  utilisé dans le calcul pour les xylanes seuls (HX) est égal à 0.146 et pour le complexe HX-DHP à la fin de réaction (240 min) est égal à 0.278<sup>1</sup>.

### **Diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)**

En DNPA, pour mesurer le signal d'un objet, il est nécessaire que celui-ci ait un contraste avec le milieu dans lequel il se trouve. Dans nos expériences, les mesures ont été effectuées en solution, il était donc nécessaire que les objets que nous voulions sonder aient un contraste envers l'eau. Le contraste se définit par une différence de longueur de diffusion  $b$ . Cette longueur de diffusion est calculée à partir de la densité de l'objet, de sa masse molaire et de la somme des longueurs de diffusion des atomes le composant.

$$b = \frac{\sum_0^i b_i d N}{M}$$

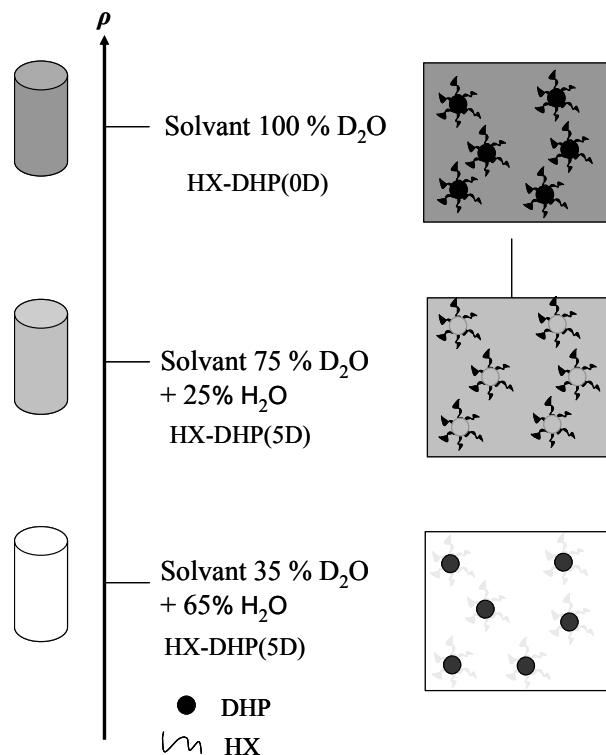
Avec  $b_i$  les différentes longueurs de diffusion,  $d$  la densité de l'objet,  $M$  sa masse molaire et  $N$  le nombre d'Avogadro.

L'interaction des neutrons avec la matière dépend alors de la longueur de diffusion  $b$  de chaque noyau (**Annexes**). L'eau légère possède une longueur de diffusion négative et l'eau lourde possède une longueur de diffusion positive. Par conséquent, le signal d'un objet deutéré sera différent de celui d'un objet hydrogéné. On pourra donc distinguer un seul constituant d'un mélange binaire de polymère au sein du mélange aux conditions suivantes 1)

un des constituants est deutéré et l'autre hydrogéné et 2) la longueur de diffusion du solvant est ajustée à celle de l'un des deux composants. Le polymère ayant la même longueur de diffusion que le solvant sera « effacé » et seul le signal du deuxième sera visible. Une deuxième expérience symétrique permettra d'obtenir le signal du polymère précédemment effacé, alors que l'utilisation de polymères complètement hydrogénés dans un solvant deutéré permettra d'obtenir le signal total du mélange. Dans nos expériences, nous avons synthétisé l'alcool coniférylique deutéré (5D) (Schéma 1A) permettant d'obtenir des DHP deutérés (5D) qui ont une longueur de diffusion équivalente à un mélange 75% D<sub>2</sub>O/ 25 % H<sub>2</sub>O. Ainsi, un tel mélange masquera son signal et par conséquent on n'observera que le signal des HX au sein du complexe HX-DHP. De même les HX possèdent une longueur de diffusion équivalente à celle d'un mélange 35% D<sub>2</sub>O/ 65 % H<sub>2</sub>O, le fait de mettre le complexe HX-DHP-5D dans ce mélange masquera le signal des HX et on n'observera que celui des DHP. Enfin, les deux polymères hydrogénés sont observés simultanément dans un solvant deutéré (Schéma 2).

Les différents complexes HX - DHP ont été synthétisés dans les mélanges de D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O correspondant aux conditions de contraste (Tableau 1). Les échantillons ont été ensuite dialysés (4 fois) contre le solvant de contraste correspondant.

Les expériences de DNPA ont été effectuées sur le spectromètre PACE au LLB à Saclay. Le principe général des spectromètres de diffusion aux petits angles est de placer un multidétecteur bidimensionnel à plusieurs mètres de ce dernier. Afin de couvrir tout le domaine de vecteur de diffusion, le multidétecteur a été placé à différentes distances en fonction du vecteur de diffusion (pour les détails voir références<sup>6,8</sup>). Le traitement des données a été réalisé selon Cotton<sup>9</sup>. Les mesures ont été effectuées sur les échantillons et les témoins correspondant (les solutions de dialyse) dans des cuvettes de quartz de 2 mm de diamètre.



**Schéma 2 :** Représentation schématique des possibilités de variation de contraste.

**Tableau 1:** Les différentes conditions de polymérisation et de contrastes isotopiques pour des mesures en DNPA.

D <sub>2</sub> O (%) (conditions de contraste)	HX-DHP-G	HX-DHP-GS
35	HX-DHP-G(5D)	HX-DHP-G(5D)S(0D)
75	HX-DHP-G(5D)	HX-DHP-G(5D)S(0D)
100	HX-DHP-G(0D)	HX-DHP-G(0D)S(0D)
G + S (%)	100 + 0	50 + 50
Rapport [HX]/[DHP] (4h)	1	1

## RESULTATS

Nous avons polymérisé l'alcool coniférylique (G : 100 %) et un mélange d'alcool coniférylique et d'alcool sinapylique (G/S : 50/50 %) en présence d'hétéroxylane féruloylé (HX-40) riche en acide férulique (FA) ou d'hétéroxylane appauvri en acide férulique (HX-90) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Caractéristiques physico-chimiques des HX extraites à partir de son de maïs par des solutions alcalines, HX-40 a été extrait à 40°C et HX-90 à 90°C.

	HX-40	HX-90
Oses neutres (%)	93.4	92.5
Ara	33.7	33.4
Xyl	51.3	51.1
Gal	8.4	8.2
Oses acides (%)	6.6	7.5
Ara/Xyl	0.66	0.65
Acides Férulique (µg/mg)	3.5	0.15
$M_w(\text{g/mol}) \times 10^{-5}$	2.52	2.68
Polydispersité ( $M_w/M_n$ )	1.36	1.18

Les acides féruliques (FA) présentent la particularité de se dimériser en présence du système peroxydase/ $H_2O_2$ <sup>10,11</sup>. Au cours de cette réaction, l'acide férulique oxydé peut former un radical phénoxyle. La réaction de dimérisation s'effectue selon un mécanisme non enzymatique par un simple couplage des radicaux phénoxyle qui conduit à la formation des dimères (di-FA), trimères (tr-FA) voire tétramères<sup>12-18</sup>. L'acide férulique sous la forme de

monomère (FA), dimère, trimère ou tétramère constitue des points d'initiation de la lignification<sup>19</sup>.

Avant polymérisation, les milieux HX-40 et HX-90 contiennent respectivement 4.85 et 0.29 µg/mg d'acides phénoliques. La diminution de la teneur en FA et di-FA dans les complexes HX-DHP après hydrolyse alcaline (NaOH 2M)<sup>1</sup> indique clairement l'incorporation de ces structures dans le DHP<sup>20,21</sup>. Ces associations entre les HX et les DHPs conduisent à la construction d'un complexe HX-DHP hétérogène et interconnecté. Les régions d'interconnections ou « zones de jonction » entre les deux polymères peuvent intéresser deux chaînes de HX ou plus<sup>1</sup>.

L'objectif de ce travail est d'approfondir l'étude de l'effet de l'acide férulique et la nature du monomère de lignine (G et S), sur l'organisation supramoléculaire du complexe HX-DHP formé durant la réaction de polymérisation. Pour cela, les complexes HX-DHP ont été caractérisés par la diffusion de la lumière (DL) et la diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA) afin de caractériser comment les HX et les DHPs s'organisent et interagissent à l'intérieur du complexe HX-DHP.

### **Formation et organisation des nanoparticules HX-DHP : diffusion de la lumière (DL)**

Deux types d'expériences peuvent être conduites : la diffusion quasi élastique de la lumière et la diffusion statique de la lumière. L'ensemble des mesures a été effectué par des dilutions successives de l'échantillon.

### 1) Diffusion statique de la lumière DSL

On mesure l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion  $q$ ,  $I(q)$ . Les spectres des intensités diffusées en fonction du vecteur de diffusion  $q$  ont été ajustés par des approximations de Zimm qui s'écrit (**Annexes**):

$$1/I = 1/I_{q \rightarrow 0} (1 + q^2 Rg^2 / 3 + \dots)$$

Où  $Rg$  est le rayon de giration des particules dans la solution, i.e. le complexe HX-DHP. Les mesures de diffusion de la lumière ont été effectuées sur des solutions diluées de chaque échantillon (i.e. les complexes HX-DHP) avec des concentrations  $C$  comprises entre 0.2 et 2.5 mg/cm<sup>3</sup>. Ces dilutions permettent d'extrapoler la masse molaire apparente  $M_{app \ q \rightarrow 0}(C)$  et la rayon de giration  $Rg(C)$  à une concentration nulle (Figure 1).

L'extrapolation à une concentration nulle de la masse apparente ( $M_{app}$ )  $q \rightarrow 0, C \rightarrow 0$  permet de déterminer la masse molaire  $M_w$  (g/mol) du complexe HX-DHP en solution. La pente de la courbe  $M_{app}$  en fonction de  $C$  permet de déduire le second coefficient viriel  $1/MA_2(\text{cm}^3/\text{g})$ . Tandis que l'extrapolation de  $R_g(C)$  à une concentration nulle permet de déterminer le rayon de giration  $R_g$  (nm) des particules. Le rapport  $\rho = M_w/R_g^3$  (g/cm<sup>3</sup>) est une indication de leurs concentrations internes « densité des particules » et  $f = MA_2 \times M_w/R_g^3$  est un facteur de forme des particules<sup>6,22</sup>.

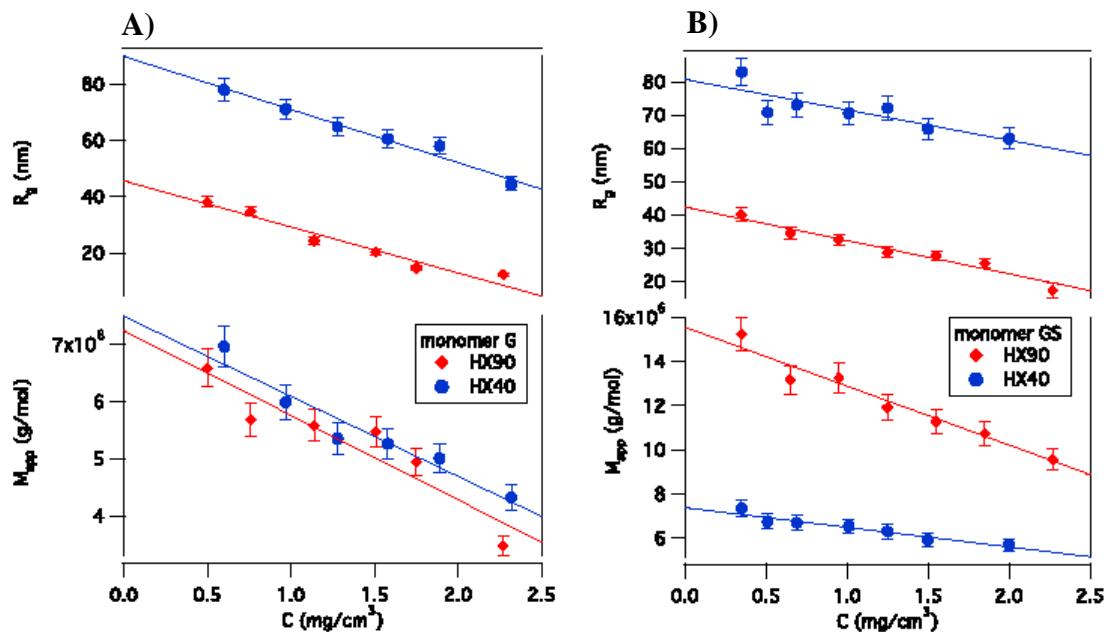
La figure 1 montre que  $M_{app \ q \rightarrow 0}(C)$  et  $Rg(C)$  augmentent linéairement en fonction de la dilution, ce qui signifie que la structure des particules en solution des différents complexes HX-DHP n'est pas affectée par la dilution. Ceci suggère la présence d'agrégats stables.

Le traitement des données obtenues en DSL (figure 1) permet de déduire différentes caractéristiques structurales (Tableau 3) :

-(1) Rayon de giration ( $R_g$ ): Les rayons de giration  $R_g$  des nanoparticules HX-90-DHP-G et HX-90-DHP-GS sont dans un même ordre de grandeur compris entre 42 et 45 nm (Tableau 3). De même avec le HX-40, la nature des monomères de lignine G et GS n'a pas d'effet sur le rayon de giration des nanoparticules qui varie entre 80 et 90 nm. Par contre la présence de FA semble induire une augmentation de  $R_g$  des nanoparticules avec le HX-40, le même effet a déjà été observé en CES-DLMA<sup>1</sup>. Ceci peut être attribué à la forte agrégation de particules synthétisées avec le HX-40, en accord avec l'observation en MET<sup>1</sup>, d'unités élémentaires sphériques interconnectés dans le cas de HX-40-DHP-G et GS. Dans le cas de HX-90, nous avons observé des particules individuelles.

-(2) Masse molaire ( $M_w$ ): Au contraire de FA, le monomère S semble avoir un impact sur la masse molaire. En effet dans le cas de HX-90, la masse molaire est deux fois plus grande avec le monomère GS. Ceci confirme les résultats obtenus en CES-DLMA<sup>1</sup> où nous avons observé que  $M_w$  du complexe HX-90-DHP-GS est deux à trois fois plus grand que  $M_w$  du complexe HX-90-DHP-G. Par contre dans le cas du HX-40, les masses molaires du complexe HX-40-DHP-G et HX-40-DHP-GS sont du même ordre de grandeur (Tableau 3).

-(3) Densité interne ( $M_w/R_g^3$ ): L'analyse des résultats (Tableau 3) montre que les particules GS synthétisées avec le HX-90 et HX-40 sont plus denses que les particules G. En revanche, comme le  $R_g$  des particules synthétisées en présence de HX-40 est deux fois plus élevé qu'en présence de HX-90, les particules G et GS synthétisées avec le HX-40 sont beaucoup moins denses que les particules synthétisées avec le HX-90. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en CES-DLMA, qui montrent que la densité des particules G ( $\rho = 0.095$  g/cm<sup>3</sup>) et GS ( $\rho = 0.108$  g/cm<sup>3</sup>) synthétisées avec le HX-40 sont beaucoup plus faibles en comparaison aux particules G ( $\rho = 0.374$  g/cm<sup>3</sup>) et GS ( $\rho = 0.530$  g/cm<sup>3</sup>) synthétisées avec le HX-90<sup>1</sup>.



**Figure 1:** Variation de la masse molaire  $M_{app}$  (g/mol) et le rayon de giration  $R_g$  (nm) apparent en fonction de la concentration des différents complexes HX-DHP : A) le HX-90 et HX-40 avec le monomère G, B) le HX-90 et HX-40 avec le monomère GS.

**Tableau 3 :** Récapitulatif des différents paramètres structuraux ( $R_g$ ,  $M_w$  et  $1/MA_2$ ,  $\rho$  et  $f = MA_2 \times M_w R_g^3$ ) déterminés par DSL pour les différents échantillons (HX90-DHP-G, HX90-DHP-GS, HX40-DHP-G et HX40-DHP-GS).

Complexe	HX-90-DHP-G	HX-90-DHP-GS	HX-40-DHP-G	HX-40-DHP-GS
$M_w \times 10^6$ (g/mol)	$7.2 \pm 0.4$	$15.4 \pm 0.5$	$7.5 \pm 0.3$	$7.4 \pm 0.3$
$R_g$ (nm)	$45 \pm 3$	$42 \pm 2$	$90 \pm 3$	$80 \pm 3$
$1/MA_2$ (mg/cm <sup>3</sup> )	$9.8 \pm 0.25$	$11.8 \pm 0.25$	$10.7 \pm 0.25$	$16.6 \pm 0.5$
$\rho = M_w / R_g^3$ (g/cm <sup>3</sup> )	$0.13 \pm 0.03$	$0.34 \pm 0.06$	$0.017 \pm 0.002$	$0.024 \pm 0.003$
$f = MA_2 \times M_w / R_g^3$	$13 \pm 3$	$29 \pm 6$	$1.6 \pm 0.1$	$1.44 \pm 0.2$

-4) Forme des nanoparticules ( $f = MA_2 \times M_w / R_g^3$ ): Dans le cas d'une chaîne de polymère en bon solvant le facteur de forme  $f$  a été estimé à  $6.6 \pm 0.3$  et à 36 dans le cas d'une

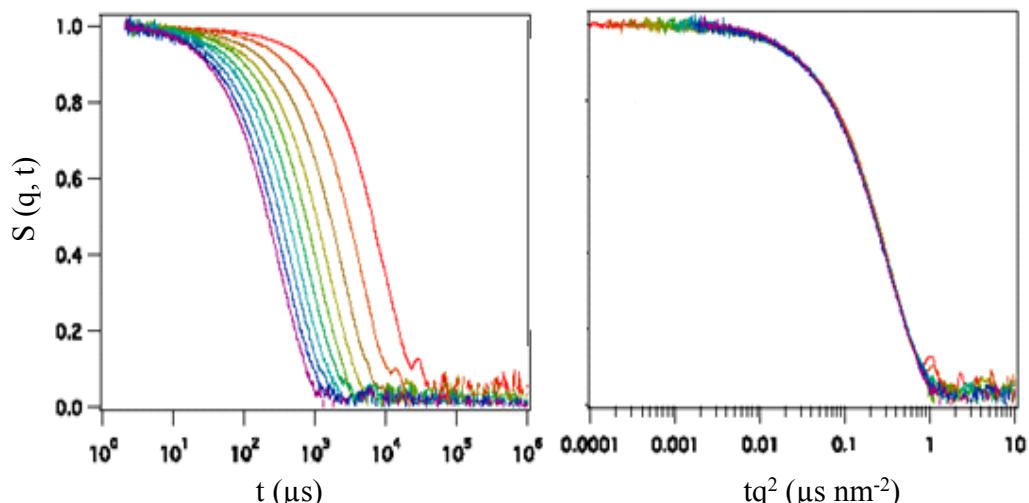
sphère dure et dense<sup>22</sup>. Ce facteur est égal à 29 pour les particules GS synthétisées avec le HX-90, ce qui est très proche d'une sphère compacte, cette valeur est la même que celle mesurée dans le cas de pectine-DHP-G ( $f = 30$ ), mais les objets sont moins denses ( $\rho = 0.22 \text{ g/cm}^3$ )<sup>6</sup>. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en CES-DLMA<sup>1</sup>. En effet l'exposant  $q$  obtenu à partir de la loi d'échelle  $R_g = M^q$ , à la fin de la réaction est inférieur ou égal 0.3, ce qui est une indication d'une sphère compacte<sup>23</sup>. Par contre, dans le cas des complexes HX-40-DHP-G et HX-40-DHP-GS, le facteur de forme  $f$ , qui est compris entre 1.4 et 1.6, est beaucoup plus faible. Cependant, une interprétation de ces valeurs apparaît complexe en raison des effets de polydispersité et de la forte agrégation des particules comme il a déjà été montré par MET<sup>1</sup>.

-5) Interaction entre les polymères ( $1/MA_2$ ): Le terme  $1/MA_2$  est la concentration à laquelle les polymères sont en interaction et ne sont plus dans un régime dilué. Ce terme est égal 17 mg/cm<sup>3</sup> dans le cas de fibronectin<sup>24</sup>, et 7.5 mg/cm<sup>3</sup> dans le cas de pectine-DHP-G<sup>6</sup>. Dans le cas de xylane-DHP, ce terme est plus fort que celui de pectine-DHP-G. On note que dans le cas des particules HX-40-DHP-GS, ce terme est très proche de celle des protéines<sup>24</sup>. Ceci peut être interprété, dans un premier temps, par une forte réactivité des xyloses féruloylées avec les monomères GS par rapport au monomère G. Une telle différence est liée bien évidemment à la structure des polyosides ainsi qu'au type de monomère de lignine. Cette différence de réactivité entre les pectines et les xyloses d'une part et entre le monomère G et S d'autre part durant la polymérisation peut être une information importante pour la compréhension des étapes de la formation et la structure des parois lignifiées. En effet, les pectines sont présentes dans les coins des cellules et la lamelle moyenne où se déroulent les premières étapes de la lignification conduisant au dépôt de lignine de type G

essentiellement<sup>25</sup>. Toutefois, les xylanes sont présents plutôt dans la paroi secondaire où se mettent en place des lignines de type GS.

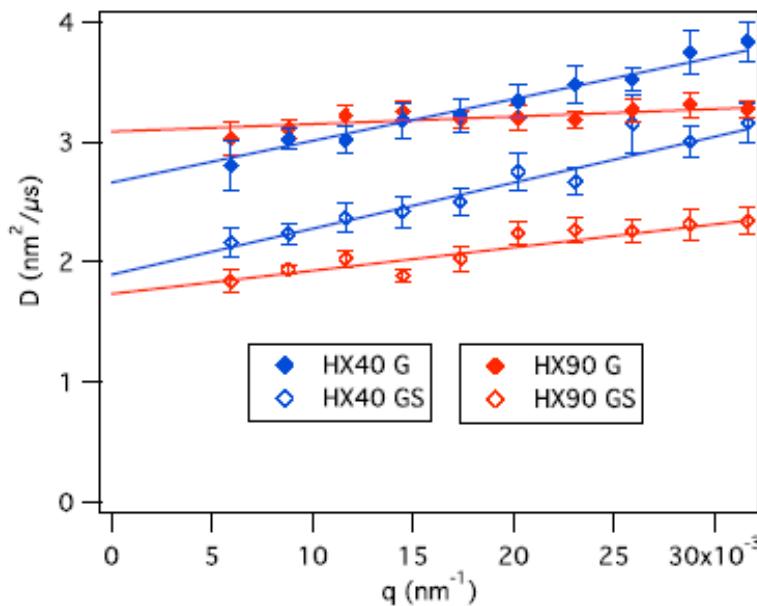
## 2) Diffusion dynamique de la lumière (DDL)

En diffusion dynamique ou quasi élastique de la lumière (DDL), nous mesurons la fonction d'auto-correlation de l'intensité diffusée par les particules en solution à différents angles par rapport au faisceau incident,  $S(q, t) = e^{-Dtq^2}$ , où  $D$  est le coefficient de diffusion des particules (**Annexes**).



**Figure 2:** Diffusion dynamique de la lumière à différents angles de diffusion en fonction de  $t$  et  $tq^2$  du complexe HX-90-DHP-G.

La figure 2 montre un exemple des intensités mesurées en fonction des différents angles  $\theta$  pour le HX-90-DHP-G. Pour les quatre échantillons, on constate que l'ensemble des courbes (Figure 2) se superposent en fonction de  $tq^2$ , signifiant la présence des particules diffusives.



**Figure 3:** Le coefficient de diffusion apparent  $D_{app}$  en fonction de  $q$  (déduit à partir des courbes de  $S(q, t)$  en fonction de  $tq^2$ , (Figure 2) pour HX-90-DHP-G, HX-90-DHP-GS, HX-40-DHP-G et HX-40-DHP-GS.

La figure 3 donne le coefficient de diffusion apparent  $D_{app}$  en fonction de  $q$  déduit d'un ajustement exponentiel des spectres de la Figure 2. Dans le cas de HX-90, le  $D_{app}$  est indépendant de  $q$  (parallèle à l'axe de  $q$ ), mais montre une légère évolution aux faibles valeurs de  $q$  avec le monomère GS. Dans le cas de HX-40 avec le monomère G et GS, les valeurs de  $D_{app}$  augmentent en fonction de  $q$  (Figure 2). Ces résultats suggèrent deux choses :

- (1) le coefficient de diffusion est indépendant de  $q$  dans le cas des HX90, ce qui met en évidence une structure dense et monodisperse
- (2) la dépendance de coefficient de diffusion  $D_{app}$  de  $q$  pour les échantillons HX40 est un signe d'une polydispersité des particules en solution.

La relation de Stokes-Einstein permet de calculer le rayon hydrodynamique  $R_H$  des particules à partir de ce coefficient de diffusion:

$$D = kT/(6\pi\eta R_H)$$

**Tableau 4 :** Récapitulatif des valeurs de coefficient de diffusion  $D$ , le rayon hydrodynamique  $R_H$  et le rapport  $R_H / R_g$  déterminés par DSL et DDL pour les différents échantillons (HX-90-DHP-G, HX-90-DHP-GS, HX-40-DHP-G et HX-40-DHP-GS).

Complexe	$D$ ( $\text{nm}^2/\mu\text{s}$ )	$R_H$ (nm)	$R_H / R_g$
HX-90-DHP-G	$3.1 \pm 0.1$	$69 \pm 2$	$1.5 \pm 0.15$
HX-90-DHP-GS	$1.75 \pm 0.05$	$123 \pm 3$	$2.93 \pm 0.2$
HX-40-DHP-G	$2.7 \pm 0.1$	$80 \pm 3$	$0.89 \pm 0.06$
HX-40-DHP-GS	$1.9 \pm 0.1$	$113 \pm 6$	$1.4 \pm 0.1$

Nous avons estimé les valeurs  $R_H$  et  $R_g$  de chaque complexe à partir des données de DDL et DSL respectivement (Tableau 4). Nous observons que le  $R_H$  est plus grand dans le cas des complexes HX-DHP-GS avec le HX-40 et le HX-90. Dans un premier temps ceci peut être interprété par la polydispersité ou l'hétérogénéité des particules en solution<sup>26</sup>. Le rapport  $R_H/R_g$  donne une indication sur la forme et la conformation des polymères en solution. Pour une sphère homogène le rapport  $R_H/R_g = (5/3)^{1/2} = 1.3$ . Dans le cas des complexes HX-90-DHP-G et GS, le  $R_H/R_g$  est plus grand que la valeur 1.3, suggérant des répartitions différentes et hétérogènes des DHP à l'intérieur des agrégats HX-DHP. On suppose que, ces nanoparticules HX-90-DHP s'organisent en un cœur dense où les DHP sont agrégés avec les chaînes de HX et une couronne de HX moins dense plutôt vers l'extérieur (sera vérifié en DNPA). En présence de HX-90, le rayon hydrodynamique des particules GS est plus grand que celui des particules G, ce qui peut être expliqué par une couronne plus large de HX plutôt chevelue avec le monomère GS.

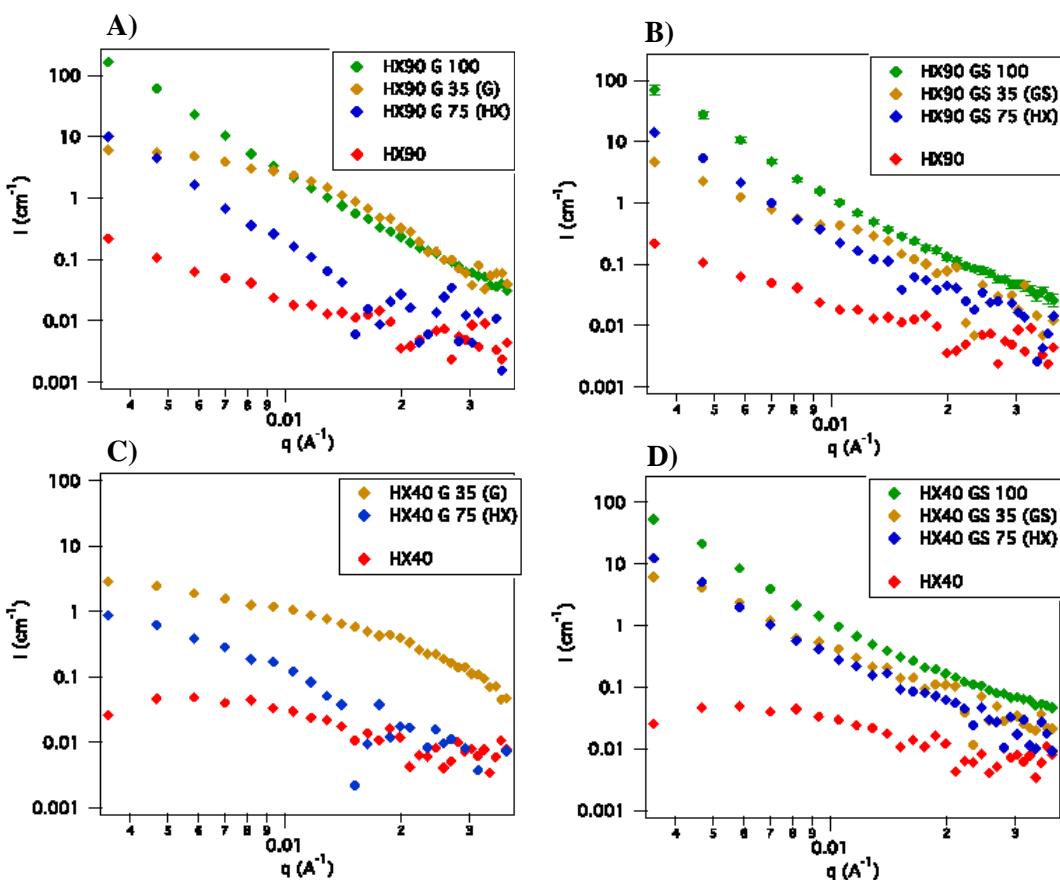
Dans le cas de HX-40, le  $R_H/R_g$  est égal à 1.4 avec le monomère GS et à 0.89 avec le monomère G (Tableau 4). Toutefois, le facteur de forme  $f$  déterminé en diffusion statique est trop faible (cf tableau 3). L'interprétation de ces résultats concernant la forme de ces particules est très complexe, en raison de possibles effets de polydispersité ou à un phénomène d'agrégation interparticules.

### **Formation et organisation des nanoparticules HX-DHP : diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).**

Afin de mieux comprendre l'organisation des polymères à l'intérieur des agrégats, l'étude des complexes HX-DHP a été poursuivie par une approche de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)<sup>8</sup> (**Annexes**). Les échantillons ont été synthétisés dans des mélanges D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O.

Nous avons fait varier le contraste en faisant varier le pourcentage D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O afin d'observer l'organisation de chaque polymère séparément:

- (1) à 100 % de D<sub>2</sub>O on observe les HX et les DHPs en même temps au sein du complexe HX-DHP (*courbes vertes* figure 4) (cf partie expérimentale) (Schéma 4).
- (2) à 35 % de D<sub>2</sub>O, on « éteint » le HX et on n'observe que le DHP dans les complexes HX-DHP (*courbe oranges*).
- (3) à 75 % on « éteint » le DHP ce qui permet d'observer uniquement les HX dans les complexes HX-DHP (*courbes bleues*).



**Figure 4:** Spectres de DNPA des échantillons : A) HX-90-DHP-G ; B) HX-90-DHP-GS; C) HX-40-DHP-G et D) HX-40-DHP-GS, dans différentes conditions de contraste, avec un spectre d'arabinoxylane seul dans 100 % de  $D_2O$ , à 35 % on voit que le DHP, et à 75 % le HX et à 100 % de  $D_2O$  on voit les deux (HX+DHP) au sein du complexe HX-DHP.

La figure 4 montre que aux faibles valeurs de  $q$ , l'intensité des pics correspondant aux complexes HX-DHP (*courbes vertes*) et au HX dans le complexe (*courbes bleues*) augmente par rapport à celle de HX seul (*courbes rouges*). Cette augmentation est liée à la présence de structures qui diffusent intensément et indique que 1) les DHP et les HX sont agrégés et 2) la structure de HX dans le complexe a été modifiée par (i.e. des interactions) :

-(1) ComPLEXe HX-DHP (*courbes vertes*): la figure 4 montre que l'intensité diffusée varie comme  $q^{-4 < \alpha < -3}$  dans tout le domaine de  $q$  pour les quatre échantillons. Cette évolution signifie

la formation de particules compactes dont la taille est supérieure à 500 Å. La valeur de  $\alpha$ , nettement supérieur à (-4), traduit une interface très loin d'être nette ou lisse mais plutôt irrégulière, ce qui peut être expliqué par la présence d'une couronne chevelue de HX, en accord avec l'hypothèse proposée en diffusion de la lumière .

-(2) HX (*courbes bleues*): Pour le comportement de HX au sein du complexe HX-DHP, on ne constate pas de nette différence entre le HX-40 et le HX-90, mais un comportement différent de celui des pectines<sup>6</sup>. Dans le cas des pectines, dans la gamme intermédiaire de  $q$ , l'intensité varie comme  $q^{-2}$ , les pectines se comportent donc comme des polymères gaussiens. En revanche, dans le cas de HX, les courbes (*courbes bleues*) montrent un comportement plus proche de  $q^{-3}$  que de  $q^{-4}$ , qui peut être dû à une couronne d'arabinoxylane vers l'extérieur du complexe HX-DHP. Ceci est en accord avec l'hypothèse proposée en DL.

-(3) DHP (*courbes oranges*): Concernant le comportement et l'organisation de particules DHP-G et DHP-GS au sein du complexe HX-DHP, on observe que les courbes correspondant au DHP-G et DHP-GS sont différentes que ce soit avec le HX-40 ou avec le HX-90 :

-(a) Les particules DHP-G : Les signaux obtenus présentent une remontée avec changement de pente vers des valeurs de  $q$  intermédiaires. Ce changement de pente s'accompagne d'un épaulement assez marqué surtout dans le cas du HX-90-DHP-G. L'intensité diffusée par les particules DHP-G augmente en fonction de  $q$  en décrivant une loi de Porod<sup>27</sup> (l'intensité diffusée varie comme  $q^{-4}$ ) avec un plateau observé aux petits  $q$ , caractéristique des interfaces entre deux milieux homogènes. Ces résultats montrent la formation de domaines de DHP-G de plus petite taille ( $\approx 100\text{\AA}$ ) que le domaine HX. La taille des domaines de particules DHP-G synthétisées avec les HX-40 est plus petite que la taille

des domaines de particules DHP-G synthétisées avec le HX-90. Dans le cas de HX-40, aux petites valeurs de  $q$ , l'intensité diffusée montre une évolution en fonction de  $q$ . Ce phénomène peut être du à une grande polydispersité des nanoparticules (confirmant les résultats obtenus en DL) et apparaît cohérent avec la morphologie complexe (ficelle) de ces particules observées en MET. En général, ces résultats montrent que les courbes de HX et DHP-G sont différentes, ce qui indiquerait clairement que chaque polymère possède un comportement propre. En effet, le HX et le DHP-G même s'ils participent aux même complexe HX-DHP-G, ne sont pas vraiment mélangés mais présentent une nette séparation de phase à l'échelle nanométrique comme dans le cas des pectines-DHP-G<sup>6</sup>.

-(b) Les particules DHP-GS : Dans le cas de particules DHP-GS, l'intensité diffusée évolue en fonction de  $q^{-2,5}$ , c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'interface nette entre le domaine de DHP-GS et le domaine de HX à l'inverse du comportement observé avec les DHP-G. Les courbes de HX (*courbes bleues*) et celles de particules DHP-GS (*courbes oranges*) se superposent, ce qui indiquerait que les deux polymères sont mélangés au sein du même agrégat. La taille des domaines de DHP-GS au sein du complexe est donc plus grande ( $\approx 500\text{\AA}$ ) que celle mesurée pour les domaines de DHP-G. Cette organisation expliquerait la plus forte densité des particules HX-DHP-GS mesurée en DL mais également en CES-DLMA<sup>1</sup>. Ce résultat peut être interprété dans un premier temps par une affinité différente du monomère S et G avec les xylanes.

## DISCUSSION

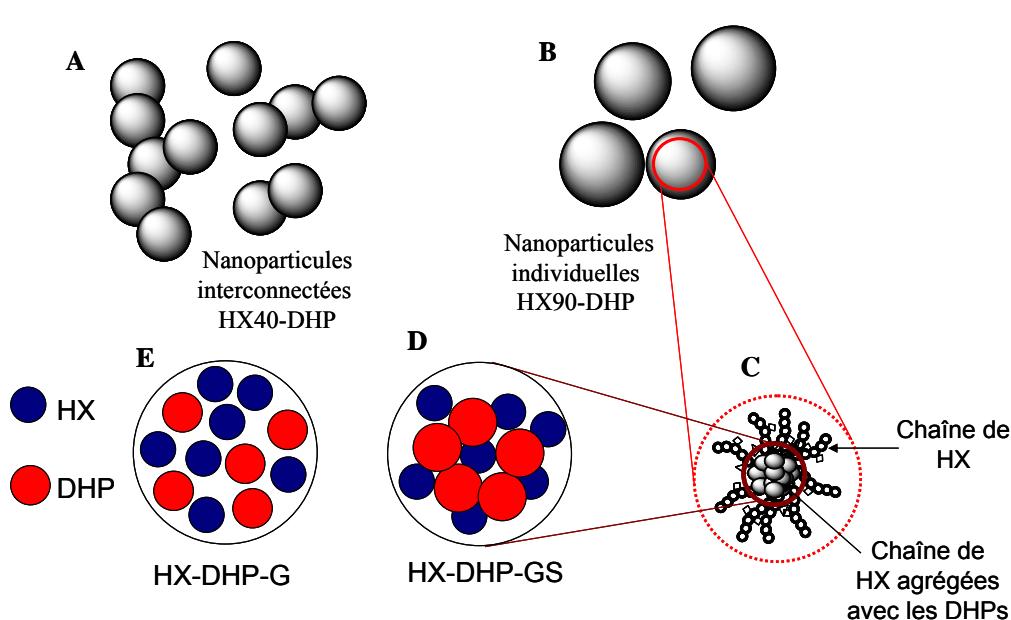
La différence majeure existant entre le HX-40 et le HX-90 est la teneur en FA. Le premier présente une teneur en FA non négligeable ( $3,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) alors que le deuxième (HX-90) est pratiquement dépourvu en FA ( $0.15 \mu\text{g}/\text{mg}$ )<sup>1</sup>. D'autre part, la seule différence entre l'alcool coniférylique (G) et l'alcool sinapylique (S) est la substitution par un méthoxyle en position *ortho* (Schéma 1A). Le groupement méthoxyle permet de bloquer un site de couplage intermonomérique et modifie la distribution électronique par des inductifs et mésomères. Cette réactivité, favorable à la formation des liaisons  $\beta$ -O-4, limite la ramifications des chaînes et augmente la masse molaire des polymères formés<sup>28,29</sup>.

Ce travail a permis de mettre en évidence que la présence de FA induit une augmentation du rayon de giration des nanoparticules. En effet, le  $R_g$  des particules synthétisées avec le HX-40 est plus grand ( $\approx 90 \text{ nm}$ ) qu'avec le HX-90 ( $\approx 42 \text{ nm}$ ). Ceci peut être expliqué par la forte agrégation des nanoparticules dans le cas de HX-40 (Schéma 3A) attribuable à la formation de microgels en présence de FA<sup>1</sup>. Ceci a déjà été montré par l'observation en MET<sup>1</sup>, d'unités élémentaires sphériques interconnectées dans le cas de HX-40 avec le monomère G et GS (Schéma 3A). Dans le cas de HX-90, nous avons observé des particules individuelles (Schéma 3B). Par conséquent, dans le cas de HX-40 l'augmentation de  $R_g$  semble avoir un impact sur la densité des particules. En effet, les particules G et GS synthétisées avec le HX-40 sont beaucoup moins denses que les particules G et GS synthétisées avec le HX-90. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en CES-DLMA<sup>1</sup>.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées à partir de ces résultats qui mettent en lumière certaines propriétés de ces polymères:

(1) La DL et DNPA ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des particules HX-DHP qui s'organise de la façon suivante:

- (a) un cœur dense qualifié hydrophobe formé d'un complexe mixte interconnecté de chaînes de HX et des molécules de DHP (Schéma 3C).
- (b) une couronne de HX moins dense vers l'extérieur (Schéma 3C) qui peut être constituée par des microgels<sup>1</sup> ou des chaînes de xylane.



**Schéma 3:** A, B) structures des nanoparticules de HX-40-DHP et HX-90-DHP, C) représentation schématique de la structure supramoléculaire des nanoparticules de HX-DHP, D et E) l'organisation supramoléculaire des HX et les nodules de DHP-GS et DHP-G à l'intérieur des agrégats HX-DHP.

(2) La diffusion des neutrons montre que les nodules de DHP-G et DHP-GS s'organisent différemment à l'intérieur des agrégats HX-DHP :

-(a) Le domaine de particules GS, dont la taille est de l'ordre de 500Å est plus grand que le domaine de HX (Schéma 3D). En revanche, la taille de particules DHP-G est plus petite et de l'ordre de 100Å (Schéma 3E).

-(b) La forte agrégation du monomère S avec les chaînes de HX et par conséquent, la densification des particules GS semble avoir induit une diminution des interfaces entre le domaine de DHP-GS et le domaine de HX (Schéma 3D). Le même phénomène a été observé précédemment en CES-DLMA<sup>1</sup>, où nous avons observé une forte agrégation de HX avec le monomère GS. En revanche, pour les particules DHP-G participant à un même agrégat, une séparation de phase a été observée entre le domaine de DHP-G et le domaine de HX (Schéma 3E). Ce phénomène de ségrégation a été montré dans le cas des pectines-DHP-G<sup>6</sup>, et pourrait être expliqué par une faible affinité du monomère G avec les polyosides comparé au monomère S.

Ces travaux soulignent un net effet de la nature du monomère de lignine sur la structure et l'organisation supramoléculaire de lignine et par conséquent du complexe polyosides-lignine. Ceci peut être interprété par un phénomène d'affinité ou une compétition entre le monomère G et S avec les xylanes pendant la polymérisation. De tels mécanismes expliqueraient le dépôt hétérogène et complexe de lignine durant la lignification des parois de monocotylédones<sup>30-32</sup>.

## **ABREVIATIONS**

HX: Hétéroxylane

FA: Acide Férule

DHP: Déhydrogénative Polymers (Modèle de Lignine)

G: précurseur de lignine Gaïacyle

S: précurseur de lignine Syringyle

CES-DLMA : Chromatographie d'Exclusion Stérique couplé à la Diffusion de Lumière Multi-Angle.

MET: Microscopie Electronique à Transmission.

DL: Diffusion de la Lumière

DDL: Diffusion Dynamique de la Lumière

DSL: Diffusion Statique de la Lumière

DNPA: Diffusion de Neutrons aux Petits Angles.

## **REFERENCES**

- (1)Barakat, A.; Putaux, J. L.; Saulnier, L.; Chabbert, B.; Cathala, B. *Biomacromolecules* **2006**, accepté.
- (2)Cotton, J. P. *Advances in Colloid and Interface Science* **1996**, 69, 1.
- (3)Pepin Donat, B.; De Geyer, A.; Lairez, D.; Viallat, A. *Synthetic Metals* **1999**, 101, 471.
- (4)Hourdet, D.; L'alloret, F.; Durand, A.; Lafuma, F.; Audebert, R.; Cotton, J. P. *Macromolecules* **1998**, 31, 5323.
- (5)Hardouin, F.; Sigaud, G.; Achard, M. F.; Brulet, A.; Cotton, J. P.; Yoon, D. Y.; Percec, V.; Kawasumi, M. *Macromolecules* **1995**, 28, 5427.
- (6)Lairez, D.; Cathala, B.; Monties, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, D.; Gorrichon, L. *Biomacromolecules* **2005**, 763.
- (7)Ludley, F. H.; Ralph, J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, 2942.
- (8)Lairez, D. *Journal de Physique IV* **2003**, 103, 253.
- (9)Cotton, J.-P. In Neutron, X-ray and light scattering; Linder, P., Zemb,T., Eds.; North Holland Publishing: Amsterdam, 1991; Chapter 1, pp 3-31.
- (10)Scalbert, A.; Monties, B.; Lallemand, J.-Y.; Guittet, E.; Rolando, C. *Phytochemistry* **1985**, 24, 1359.
- (11)Fry, S. C. *Annual Review of Plant Physiology* **1986**, 37, 165.

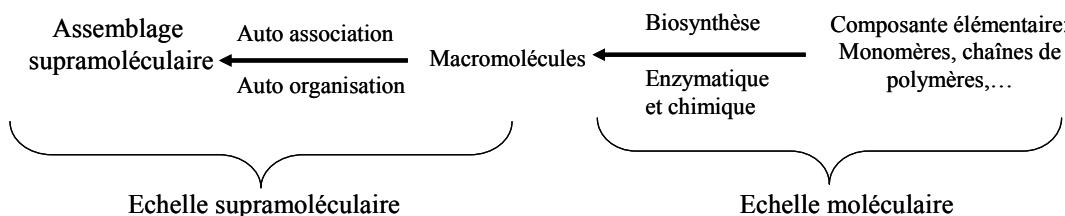
- (12)Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. H. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions I* **1994**, 3845.
- (13)Grabber, J. H.; Hatfielld, R. D.; Ralph, J.; Zon, J.;Amrhein, N. *Phytochemistry* **1995**, 40, 1077.
- (14)Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. *European Food Research and Technology* **2003**, 217, 128.
- (15)Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J.; Criton, M. *Phytochemistry* **2003**, 63, 899.
- (16)Carvajal-Millan, E.; Landillon, V.; Morel, M.-H.; Rouau, X.; Doublier, J.-L.; Micard, V. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 309.
- (17)Saulnier, L.; Crepeau, M. J.; Lahaye, M.; Thibault, J. F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G. *Carbohydrate Research* **1999**, 320, 82.
- (18)Bunzel, M.; Ralph, J.; Bruening, P.; Steinhart, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 6409.
- (19)Grabber, J., H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 6008.
- (20)Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 6106.
- (21)Ralph, J.; Grabber, J.H.; Hatfield, R.D. *Carbohydrate Research*. **1995**, 275, 167.
- (22)Raspaud, E; Lairez, D; Adam, M. *Macromolecules* **1995**, 28, 927.
- (23)Wyatt, P. J. *Analytica Chimica Acta* **1993**, 272, 1.
- (24)Pelta, J.; Berry, H.; Fadda, G. C.; Pauthe, E.; Lairez, D. *Biochemistry* **2000**, 39, 5146.
- (25)Terashima, N.; Fukushima, K.; He, L.-F.; Takabe, K., in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Jung, H.G.; Buxton, D. R.; Hatfield, R. D.; Ralph, J., Editors. 1993, American Society of Agronomy: Madison. pp. 247-270.
- (26)Harnau, L.; Winkler, R. G.; Reineker, P. *Macromolecules* **1999**, 32, 5956.
- (27)Auvray, L.; Aurroy, P., in *Neutron, X-Ray and light scattering*, Linder, P.;Zemb, T., Editors. 1994, North Holland.
- (28)Saake, B.; Argyropoulos, D. S.; Beinhoff, O.; Faix, O. *Phytochemistry* **1996**, 43, 499.
- (29)Faix, O.; Beinhoff, O. *Holzforschung* **1992**, 46, 335.
- (30)Fukushima, K.; Terashima, N. *Holzforschung* **1991**, 45, 87.
- (31)He, L.-F.; Terashima, N. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **1990**, 435.
- (32)He, L.; Terashima, N. *Mokkuzai Gakkaishi* **1989**, 35, 123.



# Discussion générale



L'utilisation de produits lignocellulosiques agricoles à différentes fins (production de pulpe, bioéthanol, biocomposites,...) nécessite une meilleure compréhension de la structure et l'organisation des parois végétales lignifiées et des mécanismes conduisant aux propriétés de ces réseaux complexes et variables. La mise en place des lignines est le dernier événement de la formation des parois secondaires, et se produit dans le gel polyosidique déjà mis en place. La lignification a été décrite comme un ensemble d'évènements soumis à la fois à des contraintes biologiques (disponibilité de la peroxydase, et des cofacteurs, etc...) mais également à des contraintes physico-chimiques (diffusion de monomères, forte concentration en polyosides, variabilité structurale des macromolécules, etc...). Afin de comprendre certains événements intervenant lors de la lignification, nous avons réalisé des polymérisations de monomères de lignine en présence de xylanes. L'objectif de ces études est de relier la structure chimique des polymères élémentaires (type de monomères de lignines, structures des xylanes,...), leur réactivité au cours des processus d'assemblage modèle et finalement l'organisation finale de ces assemblages supramoléculaires (Figure 17). Ces démarche qui permettent d'isoler certains phénomènes étroitement liés *in vivo*, autorisent de nombreuses approches expérimentales inapplicables sur des échantillons biologiques.



**Figure 17 :** De la chimie moléculaire à la chimie supramoléculaire [144].

Nous avons focalisé nos efforts sur la compréhension des interactions entre la lignine et les xylanes, notamment les hétéroxylanes de graminées. Nous avons notamment pris en compte le fait que les xylanes et les lignines sont présents à forte concentration dans la paroi,

et interagissent entre eux pour former des complexes covalents et non-covalents et finissent par s'associer en une seule phase dont la structure finale varie en fonction des paramètres physico-chimiques de la réaction. A travers ce fil conducteur, nous avons étudié :

- L'influence de la formation d'entité supramoléculaire sur la réactivité des deux partenaires à travers 1) la formation de LCC (Chapitre n°1) ou 2) sur la réactivité des monolignols (Chapitre n°2).

- L'organisation et la morphologie des assemblages supramoléculaires (Chapitre n°3) HX/DHP ainsi que la structuration interne de ces objets (Chapitre n°4). Dans chaque cas, nous avons essayé de relier ces éléments à la structure chimique des polymères/monomères constitutifs et par conséquent à la réactivité associée.

### **Interaction xylane/DHPs**

La formation des liaisons covalentes entre les xylanes et la lignine peut être établie selon deux mécanismes : i) un mécanisme oxydatif par l'intermédiaire des acides phénoliques en présence du système peroxydase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce mécanisme a été identifié chez les graminées<sup>[48]</sup>, ii) une addition nucléophile des polyosides (fonctions carboxyliques des acides uroniques ou groupements hydroxyles) à la méthylène quinone (MQ) générée pendant la polymérisation<sup>[59]</sup>, ce mécanisme est présent dans toutes les parois lignifiées et reste encore mal compris. En effet, l'addition de polyosides est directement en concurrence avec l'addition des autres nucléophiles, notamment l'addition de l'eau. La formation de LCC pourrait être attribuée à une réactivité plus élevée des polyosides (i.e. constante d'addition élevée) ou à une modification des conditions locales de la réaction qui réduisent la concentration locale en eau et augmentent ainsi l'addition de polyosides.

Afin de vérifier cette seconde hypothèse et d'essayer de proposer un mécanisme général de la formation des LCCs *via* l'addition nucléophile des xylanes à la MQ, nous avons

polymérisé l'alcool coniférylique (AC, 1g/L) dans des solutions diluées de xylanes (1g/L) selon deux méthodes Zutropfverfahren (ZT) et Zulaufverfahren (ZL). Pour cela nous avons utilisé un Hétéroxylane non féruloylé (HX extrait d'avoine).

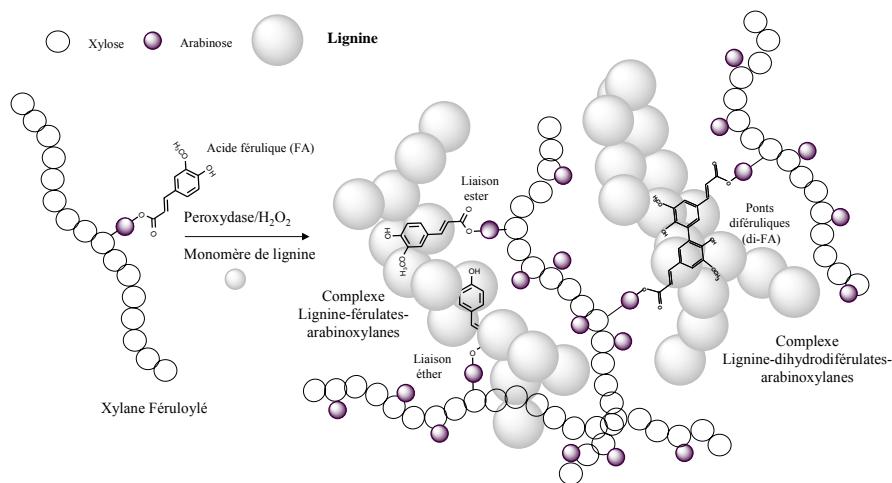
L'analyse des mélanges xylane/DHPs par la SEC et  $^{13}\text{C}$  RMN nous a permis de conclure sur la présence des liens covalents entre les xylanes et les DHP *via* le C5 d'arabinose uniquement dans le cas de la réaction ZT. Cette approche a été complétée par des techniques de dégradation/fractionnement. La dégradation enzymatique par une xylanase et l'extraction par le dioxane/eau a également renforcé l'existence des liens covalents entre les xylanes et les DHPs impliquant l'arabinose et la C $\alpha$  de la MQ. Le rôle de l'arabinose dans la formation de LCC a déjà été démontré<sup>[125,126,128]</sup>. En revanche, l'acide glucuronique ne semble pas s'additionner à la MQ dans nos conditions. Ceci a été confirmé par les données RMN qui montrent l'absence des signaux spécifiques des liaisons ester entre l'acide glucuronique et le C $\alpha$  de la MQ; ce qui pourrait être expliqué par un effet de pH<sup>[127]</sup>. En effet, Sipilä a réalisé la réaction entre la MQ et l'acide glucuronique à pH4 et à pH6, et a montré par RMN la formation des liaisons benzyl ester uniquement à pH4<sup>[127]</sup>. De même, les conditions expérimentales, notamment la formation des zones hydrophobes pourraient limiter la réactivité des fonctions carboxyliques. La variation systématique du pH permettrait de répondre à cette question.

Ces résultats mettent en évidence la formation de LCC uniquement dans le cas de la réaction ZT. La seule différence entre la réaction ZL et ZT est la distribution de la quantité de la MQ durant la réaction. Dans le cas de ZL toute la quantité du MQ réagit au début de la réaction, par contre en ZT, elle est stable durant la réaction. L'absence de formation de LCC dans la réaction ZL peut être expliquée par le fait que toutes les molécules de la MQ

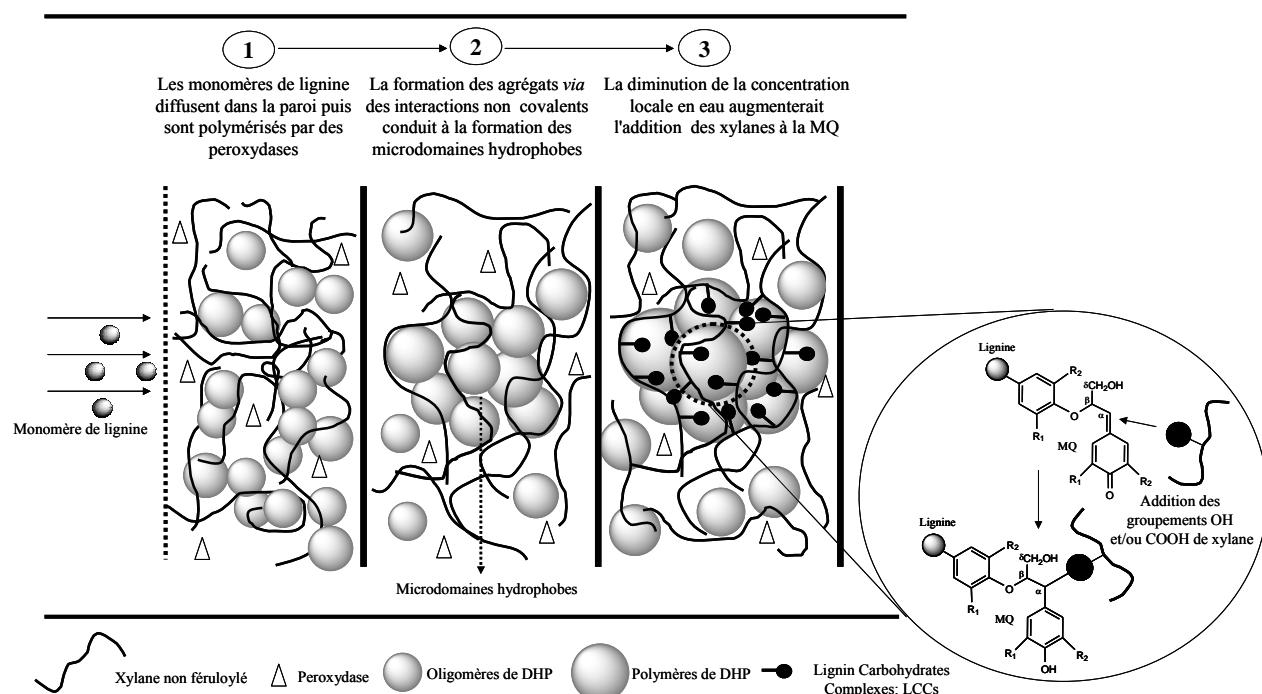
réagissent rapidement avant tout processus de réorganisation des polymères ou densification du système. En revanche, dans le cas de ZT, la formation d'agrégats hydrophobes de xylane-DHP par l'intermédiaire des liens non covalents peut également se produire dès le début de la réaction. Ainsi, les monomères additionnés seraient probablement diffusés puis polymérisés dans les agrégats hydrophobes de xylane-DHP déjà formés. Le DHP apparaît alors sous forme de nodules qui grandissent et fusionnent, ce qui conduit à la densification du système<sup>[140]</sup>, induisant un phénomène de déshydratation. Ce phénomène a déjà été observé pendant la lignification de la paroi végétale<sup>[82,87,143]</sup>. Durant cette étape, la structure de la paroi est fortement modifiée. L'eau est notamment drainée par un mécanisme restant à déterminer. L'élimination continue des molécules d'eau durant la réaction limiterait la concurrence avec les molécules de xylane et par conséquent favoriserait l'addition des xylanes à la MQ.

Si le mécanisme oxydatif par l'intermédiaire des acides phénoliques en présence du système peroxydase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intervient dès le début de la lignification en établissant diverses liaisons covalentes entre les polyosides et la lignine (Figure 18), l'addition nucléophile de polyosides à la MQ serait plus favorisée aux dernières étapes de la lignification permettant le blocage et la stabilité du système (Figure 19).

Les informations physico-chimiques obtenues *via* ces approches modèles devraient être confrontés aux caractéristiques des parois de graminée afin de vérifier cette hypothèse sur la formation de LCC. L'analyse de parois de tige de blé collectées à différents stades de maturation devrait par exemple permettre d'établir une relation entre la formation de LCC et les étapes de la lignification des tissus.



**Figure 18 :** Représentation schématique de la réticulation des xylanes avec la lignine selon un mécanisme oxydatif *via* l'acide férulette (FA).



**Figure 19 :** Représentation schématique de la réticulation des xylanes avec la lignine selon un mécanisme nucléophile *via* la méthylène quinone (MQ).

### Réactivité de l'alcool coniférylique dans un milieu dense

La paroi végétale est un milieu présentant des concentrations locales élevées. Afin d'examiner l'effet de la concentration élevée du milieu sur la réactivité de monomère de lignine et la structure finale de la lignine, nous avons polymérisé des fortes concentrations en alcool coniférylique (AC) (1, 5, 10 g/L) en présence de fortes concentrations en xylanes (1, 5, 10g/L).

Les DHPs synthétisés en absence de xylane précipitent hors de la solution au cours de la réaction et sont donc non-réactifs. Au contraire les DHPs synthétisés en présence de xylane forment des colloïdes stables. Ces associations entre les deux réseaux ont un impact sur la réactivité de l'AC en empêchant la précipitation de DHP. Les oligomères pourraient alors continuer à réagir avec les DHPs provoquant une augmentation de la masse molaire du DHP associée aux xylanes. Nous avons vérifié cette hypothèse en déterminant les masses molaires des DHP ; elles sont systématiquement plus élevées dans le cas des synthèses réalisées en présence de xylane en accord avec la littérature<sup>[118]</sup>.

L'analyse de la structure de DHP par thioacidolyse met en évidence une augmentation de la quantité de liaisons non-condensées (les liaisons  $\beta$ -O-4) en présence de xylane. Les données rapportées dans la littérature montrent des conclusions contradictoires. Par exemple Higuchi et *al.*(1981) n'ont pas observé un effet des xylanes sur la structure de DHP<sup>[132]</sup>. De même dans le cas de pectines Terashima et *al.*(1995) ont montré que le taux de liaisons  $\beta$ -O-4 augmente en présence de pectine<sup>[129,130]</sup>, plus tard Cathala et *al.*(2001) ont démontré l'inverse<sup>[134]</sup>. Ceci peut être lié à la structure de polyosides utilisés mais également aux conditions physico-chimiques de polymérisation.

Dans le cas des synthèses réalisées avec des concentrations élevées en xylane/DHP, le taux de liaisons  $\beta$ -O-4 est similaire à celui mesuré dans le cas de lignines naturelles<sup>[3]</sup>. L'agrégation engendre un environnement apolaire favorisant la formation de liaisons  $\beta$ -O-4 selon un mécanisme analogue à celui proposé dans le cas de la polymérisation réalisée dans des mélanges méthanol/eau<sup>[138]</sup> ou dans le 1,4-dioxane<sup>[139]</sup>. L'augmentation des liaisons  $\beta$ -O-4 peut également être attribuée à la solubilité du monomère de lignine en présence de xylane, qui favoriserait le couplage entre monomère et oligomères provoquant la formation d'un polymère « end wise »<sup>[58]</sup>.

En effet, la polymérisation de lignine est très sensible à la solvatation, à la polarité, et à d'autres paramètres physico-chimiques du milieu de réaction. La structure et l'organisation spatiale de lignine peuvent donc indirectement modulées par une modification de la quantité de polysaccharides/lignine dans n'importe quelle variation des systèmes de polymérisation.

L'étude de la réactivité pourrait être poursuivie en examinant la polymérisation du monomère de lignine dans un milieu plus dense à savoir un composite de cellulose/polyosides<sup>[133,145]</sup>. Par ailleurs, compte tenu de l'implication de l'acide p-coumarique (pCA) dans la formation de parois secondaires de graminées, l'étude de la polymérisation des monomères (G/S/pCA) en présence de xylane devrait permettre d'étudier l'effet de la nature de monomère de lignine sur la structure macromoléculaire de la lignine dans un milieu complexe.

### **Organisation supramoléculaire de complexes xylanes/lignines modèles**

Afin de relier la structure élémentaire des polyosides préexistant à la polymérisation de la lignine à la structure supramoléculaire des assemblages finaux, nous avons réalisé des polymérisations de monomère de lignine G et S en utilisant comme milieux modèles des solutions de polyosides (hétéroxylanes : HX) avec des structures différentes. Nous avons notamment focalisé notre étude sur une des caractéristiques des parois de graminées à savoir l'existence de l'acide férulique estérifié sur les résidus arabinose des HX. Nous avons extrait deux types de HX différant seulement par la quantité d'acide férulique (HX-40; HX-90). Le suivi de réaction de polymérisation xylane/DHP par CES-DLMA nous a permis d'étudier la cinétique de formation et la structure de ces assemblages. La morphologie des nanoparticules à la fin de la réaction a été observée en microscopie électronique à transmission (MET). La structure interne des différents complexes HX-DHP en fin de la réaction a été étudiée par diffusion de la lumière (DL) et des neutrons aux petits angles (DNPA) (Tableau 3).

Plusieurs conclusions peuvent être tirées à partir de ces résultats:

- Morphologie : La morphologie des nanoparticules observées en MET montre la formation de structures plus complexes dans le cas de HX-40. En effet, nous avons observé des agrégats interconnectés composés d'unités élémentaires sphériques. En revanche, dans le cas de HX-90, nous avons observé des objets isolés.
- Taille des nanoparticules : La taille des nanoparticules obtenues par les différentes techniques (MET, CES-DLMA et DL) à la fin de la réaction sont sensiblement différentes. Ces différences ont été attribuées à la méthode de calcul choisie pour chaque technique mais également à la formation de microgels ou la présence de structures fortement branchées qui correspondent à une couronne d'arabinoxylane vers l'extérieur des agrégats

mixtes de HX-DHP. Ces structures pourraient induire des valeurs plus élevées de Rg. La formation des microgels est probablement favorisée dans le cas de HX-40 puisqu'elles sont plus riches en acide férulique ce qui expliquerait les valeurs élevées de Rg (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Récapitulatif des différents paramètres structuraux déterminés par DL, MET et CES-DLMA pour les différents échantillons : HX90-DHP-G, HX90-DHP-GS, HX40-DHP-G et HX40-DHP-GS.

		HX-40-DHP-G	HX-40-DHP-GS	HX-90-DHP-G	HX-90-DHP-GS
	D <sub>n</sub> (nm) <sup>a</sup>	24.6	18.4	30.8	32.0
	D <sub>w</sub> (nm) <sup>b</sup>	55.2	25.7	39.4	71.0
MET	P <sub>d</sub> <sup>c</sup>	2.2	1.4	1.3	2.2
	C (%)	84.2	45.5	11.9	19.3
	$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	63	52	39	47
SEC	M <sub>w</sub> x 10 <sup>-6</sup> (g/mol)	14.3	9.09	13.3	33.0
	$\rho$ (mg/cm <sup>3</sup> ) <sup>d</sup>	95	108	374	530
	Rg (nm)	90± 3	80± 3	45 ± 3	42 ± 2
	R <sub>H</sub> (nm)	80 ± 3	113 ± 6	69 ± 2	123 ± 3
DL	M <sub>w</sub> x 10 <sup>-6</sup> (g/mol)	7.5	7.4	7.2	15.4
	M <sub>w</sub> /Rg <sup>3</sup> (mg/cm <sup>3</sup> )	17	24	130	340

<sup>a</sup> 2R<sub>H</sub> = D<sub>w</sub>, <sup>b</sup> 2R<sub>g</sub> = D<sub>n</sub>, <sup>c</sup> P<sub>d</sub> = D<sub>w</sub>/D<sub>n</sub> et <sup>d</sup>  $\rho = (\overline{M_w}/N_A) / (\langle S^2 \rangle^{1/2})^3$

N<sub>A</sub> : nombre d'Avogadro

- Densité interne : La DL et CES-DLMA mettent en évidence que la différence de taille entre le HX-40 et HX-90 et par conséquent la densité des objets est liée au taux d'acide férulique, différence structurale principale entre les deux xylanes, mais également à la nature du monomère de lignine (Tableau 3). Ces résultats démontrent clairement l'effet de la structure chimique du réseau préexistant de xylane sur l'architecture et l'organisation supramoléculaire des complexes de xylane/lignine.

- Organisation interne : L'étude des complexes par la diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA) a mis en évidence l'existence de zones riches en xylane et de zones riches en DHP. Les particules GS, dont la taille est proche de 500Å, sont plus grandes que le domaine riche en HX. La forte agrégation du monomère S avec les xylanes induit une densification de nanoparticules GS. Ceci peut être à l'origine de la diminution des interfaces entre le domaine de DHP-GS et le domaine de HX. En revanche, la taille de particules G est plus petite et de l'ordre de 100Å, en plus, même si les nodules DHP-G participent aux mêmes agrégats mixtes de HX-DHP, une séparation de phase a été observée entre le domaine de DHP-G et le domaine de HX. Ce phénomène de ségrégation a été observé dans le cas de pectines-DHP-G<sup>[140]</sup>. Ces travaux soulignent donc un net effet du monomère S sur la structure et l'organisation supramoléculaire des nodules de lignine et par conséquent la structure du complexe xylane/lignine.

Si ces travaux révèlent un effet marqué de la présence de l'acide férulique sur l'architecture supramoléculaire des complexes, les monomères de syringyles semblent également avoir un impact sur la densification de particules puisque les particules GS sont plus denses quel que soit le type de xylane. Ce résultat est soutenu par la forte agrégation

observée en CES-DLMA au début de la réaction en présence du monomère S; ceci a été confirmé par la DL (Tableau 3). Ce phénomène peut être interprété par un phénomène d'affinité ou une compétition entre le monomère G ou le monomère S avec les xylanes pendant la polymérisation. Le monomère S aurait plus d'affinité avec les xylanes que le monomère G.

La structure chimique des biopolymères de départ a donc un impact sur la taille et la morphologie des nanoparticules. Il serait intéressant de poursuivre ces études avec des systèmes plus concentrés à savoir les gels réticulés de xylane afin de se rapprocher encore des conditions existant *in vivo*. De même la synthèse du monomère S deutéré permettrait de différencier le comportement de chaque monomère au sein d'un même agrégat DHP-GS : mélanges des monomères G et S ou existence d'une zone riche en S et/ou en G. de telles informations contribuerait à mieux appréhender l'organisation des lignines G par rapport aux GS notamment, et leurs interactions avec les polyosides.

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux souligne que l'étude de l'organisation supramoléculaire des assemblages lignine-polyosides à l'échelle nanométrique est indispensable dans la compréhension des interactions lignine-polyosides. La prise en compte de ce niveau d'organisation permettrait de mieux comprendre la formation des parois lignifiées et d'apprécier les mécanismes sous-tendant les propriétés des parois notamment leur aptitude au fractionnement. De plus, les informations sur les assemblages lignine-polyosides à cette échelle pourront ouvrir de nouvelles applications dans les domaines pharmaceutiques ou biotechnologiques. Ainsi par exemple, le cœur hydrophobe des nanoparticules lignine-polyosides pourrait être utilisé pour encapsuler des substances possédant des activités biologiques d'intérêt...



# Annexes

-*Brève introduction à la diffusion de rayonnement*

-*Brève introduction à la diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA)*

-*Publication:*

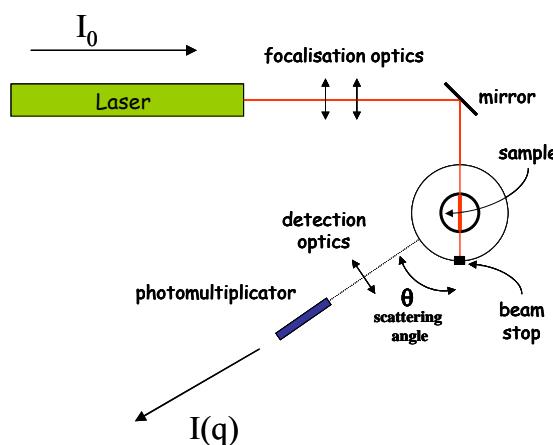
*Heiko Winter, Abdellatif Barakat, Bernard Cathala and Bodo Saake. Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation. Macromol. Symp. 2006, 232, 74–84.*



## I. Diffusion statique de la lumière

Une expérience de diffusion de rayonnement consiste à mesurer l'intensité diffusée  $I$  par un échantillon en fonction du vecteur de diffusion  $q$  (Figure 20). Le  $q^{-1}$  joue le rôle d'un grossissement d'un microscope. Ce vecteur de diffusion est relié à l'angle de diffusion ( $\theta$ ) et à la longueur d'onde  $\lambda$  par :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$



**Figure 20 :** Principe de diffusion de rayonnement

Dimensionnellement,  $q$  est homogène à l'inverse d'une longueur. C'est la longueur à laquelle il est fait référence lorsque l'on parle d'échelle d'observation. Considérons une expérience de diffusion par un système constitué de  $n$  particules en solution de  $N$  diffuseurs élémentaires chacun. Appelons  $I_0$  l'intensité du rayonnement incident,  $I(q)$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) l'intensité de la radiation diffusée. Les propriétés de la diffusion sont décrites par la fonction de diffusion:

$$I(q) = \left( \frac{b_1 - b_0 v_1}{v_0} \right)^2 V \left( \frac{C}{M} \right)^2 K T \left( \frac{C d\pi}{dC} \right)^{-1} \quad (2)$$

Avec  $M = N m_1$  (g/mol),  $v = N v_1$  et  $b = N b_1$ ,  $K^2 = (b_1 - b_0 v_1 / v_0)^2 / m_1$  ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-2}$ ) et  $C = n M / V$  (g/cm<sup>3</sup>)

## **Brève introduction à la diffusion de rayonnement**

---

$\pi$ : pression osmotique.

$b_1$ : longueur de diffusion du diffuseur élémentaire, soluté.

$b_0$ : longueur de diffusion du solvant.

$v_1$ : volume moléculaire du diffuseur élémentaire de soluté.

$v_0$ : volume moléculaire de solvant.

$m_1$  : masse de diffuseur élémentaire.

Pour une solution diluée les interactions intermoléculaires sont négligeables et on peut montrer que lorsque  $q$  tend vers 0, l'intensité  $I(q)$  correspond à:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{q \rightarrow 0}} \left( 1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} + \dots \right) \quad (3)$$

En outre la diffusion de la lumière permet de déterminer la *masse molaire* et le *second coefficient du viriel*. On peut en effet montrer que l'intensité  $I(q)$  dans la limite  $q \rightarrow 0$  divisée par la concentration  $C$  est homogène à une masse apparente  $M_{app}$ .

$$\frac{I_{q \rightarrow 0}}{CK^2} = M_{app} \quad (4)$$

$K^2$  est un facteur de contraste ( $K^2 = ((2n_0/\lambda_0)(dn/dC))^2$ , où  $n_0$  est l'indice de réfraction de solvant et  $dn/dC$  est l'incrément d'indice de réfraction de particules. L'équation (4) permet d'avoir accès à la *masse molaire*  $M_w$  (g/mol). En régime dilué  $M_w$  varie comme :

$$M_{app} = M_w (1 - 2MA_2C + \dots) \quad (5)$$

L'équation (5), permet d'avoir accès au *second coefficient du viriel*  $A_2$  ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) (interaction entre les macromolécules).

### II. Diffusion quasi élastique ou dynamique de la lumière

En diffusion quasi élastique de la lumière, nous mesurons la fonction d'auto-correlation de l'intensité diffusée par les particules en solution à différents angles par rapport au faisceau incident  $S(q,t)$ . Pour une solution diluée de macromolécules avec  $qR \ll 1$ , où  $R$  est la taille de la macromolécules, on peut écrire :

$$S(q, t) = e^{-Dtq^2} \quad (6)$$

Où  $S(q,t)$  est une fonction de relaxation des fluctuations de concentration dont la longueur d'onde  $q^{-1}$  et  $D$  le *coefficient de diffusion* de la particule. Ce coefficient est lié au *rayon hydrodynamique*  $R_H$  par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (7)$$

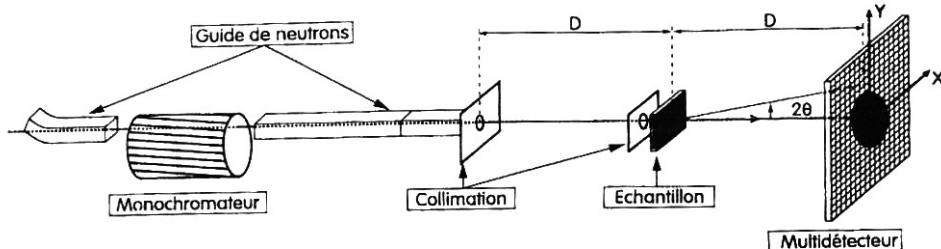
Où  $T$  est la température et  $\eta$  est la viscosité du solvant.

Une particule en solution a des interactions hydrodynamiques avec les molécules de solvant. Au cours de son déplacement, la particule entraîne avec elle tout ou partie du solvant contenu dans son volume. Son déplacement est équivalent à celui d'une sphère impénétrable de rayon  $R_H$  (rayon hydrodynamique).



## I. Spectromètres de DNPA

Un faisceau de neutrons monochromatique est collimaté et envoyé sur l'échantillon. Les neutrons sont ensuite diffusés par l'échantillon dans plusieurs directions (Figure 21).



**Figure 21 :** Schéma d'un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles.

Les neutrons sont ensuite mesurés par un détecteur en fonction de leur position au centre. Cette position donne l'angle de diffusion et de la valeur du vecteur de diffusion  $q$  telle que :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$

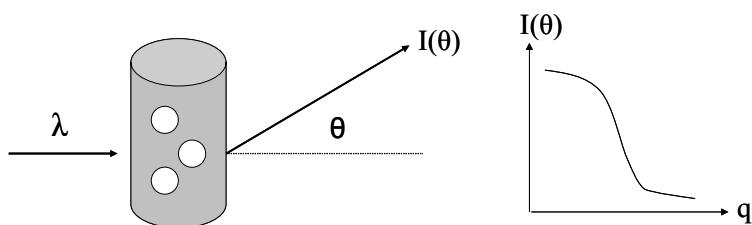
Les détecteurs sont soit un croisement de fils horizontaux et verticaux (détecteurs XY), soit des anneaux (détecteur centré). Ces détecteurs sont dans une atmosphère de  $\text{BF}_3$ , gaz qui permet de capter les neutrons et de réémettre un gamma qui va créer une différence de potentiel entre les fils et donc être détecté ; pour des échantillons isotopes un regroupement est ensuite effectué pour sommer tous les neutrons comptés à une même distance du centre. On obtient donc une courbe d'intensité en fonction de  $q$  ; pour faire varier les valeurs de  $q$  deux choix sont possibles, varier la distance ou la longueur d'onde ; les longueurs d'onde sont comprises entre 4 et 25 Å et les distances entre 1m et 7m généralement. Les valeurs extrêmes de  $q$  atteintes sont donc de l'ordre de  $1.10^{-3}$  à  $0.5 \text{ \AA}^{-1}$ . Pour couvrir une gamme importante de vecteurs d'onde, il est nécessaire de faire la mesure en plusieurs configurations, une en courte

## **Brève introduction à la diffusion des neutrons aux petits angles**

distance et petite longueur d'onde pour les grandes valeurs de  $q$ , et une en longue distance et grande longueur d'onde pour les petits  $q$ . Nous avons effectué nos mesures sur le spectromètre PACE au CEA de Saclay dont la gamme de  $q$  est varie de  $2.10^{-3}$  à  $0.5 \text{ \AA}^{-1}$ .

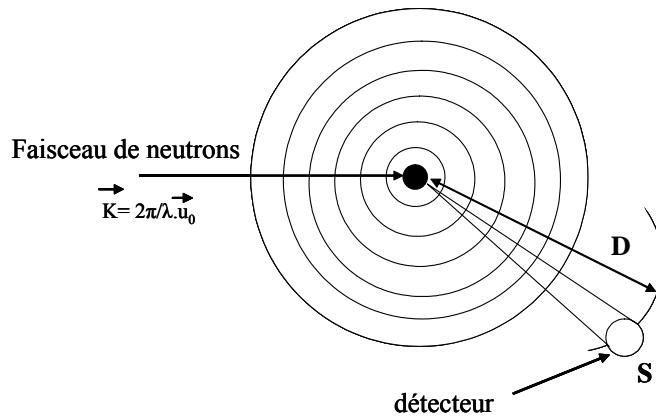
### **II. Interaction neutron-matière**

La technique de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) est une méthode, dite basse résolution, dédiée à l'étude de la forme et l'organisation de particules de tailles comprises entre 5 et 500 Å. Les systèmes étudiés sont par exemple des polymères, des amas, etc... L'expérience consiste à envoyer, sur l'échantillon, un faisceau faiblement divergent de neutrons monochromatiques et d'étudier l'intensité diffusée en fonction de l'angle de diffusion  $\theta$  (Figure 22).



**Figure 22:** Principe de diffusion de neutrons aux petits angles

Ici la description des neutrons, de leurs propriétés et leur usage sera limitée à l'expression générale de l'intensité, puis à la description des formules analytiques permettant de décrire des formes géométriques simples, et enfin et surtout à des modèles théoriques plus élaborés, qui permettront de décrire plus fidèlement les spectres de diffusion des objets synthétisés<sup>[146-148]</sup>. Lors d'une expérience de diffusion de rayonnement ; l'échantillon étudié est placé sur le trajet d'une onde plane, monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$  (Figure 23)..



**Figure 23 :** Principe de diffusion d'une onde de neutrons monochromatique.

Lorsque cette onde interagit avec un atome de l'échantillon, elle est diffusée dans toutes les directions. L'onde diffusée est sphérique (Figure 23), on supposera une diffusion élastique, c'est à dire que les ondes incidentes et diffusées ont la même longueur d'onde. La probabilité qu'une particule soit diffusée est proportionnelle à l'aire  $\sigma$  d'une surface caractéristique entre l'atome et rayonnement considéré. Cette aire est la section efficace totale de diffusion:  $\sigma = 4\pi b^2$  avec  $b$ , la longueur de diffusion d'un atome isolé.

Les ondes diffusées par plusieurs atomes interfèrent. Le résultat de ces interférences dépend des différences de phase des ondes diffusées. La section efficace différentielle de diffusion est obtenue lorsque l'échantillon reçoit un flux de neutrons  $\Phi(\lambda)$  en  $\text{cm}^{-2}\text{S}^{-1}$  et qu'il diffuse un nombre de neutrons  $I(q)$  en  $\text{S}^{-1}$  sur une surface  $S$  (surface du détecteur) située à une distance  $D$  (soit dans un angle solide  $\Delta\Omega = S/D^2$  formé par le détecteur vu depuis l'atome) (Figure 23).

$$I(q) = \Phi(\lambda) \frac{d\sigma}{d\Omega} \Delta\Omega \quad (8)$$

Cette section efficace est divisée par le volume de l'échantillon et devient donc homogène à des  $\text{cm}^{-1}$  et peut s'écrire:

$$\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega} = \sum_i^n \sum_j^n b_i b_j e^{i\mathbf{q}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)} \quad (9)$$

On peut finalement écrire :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = b_0^2 V (\langle \rho^2 \rangle - \langle \rho \rangle^2) + b_0^2 \langle \rho \rangle^2 \sum_i^V \sum_j^V b_i b_j e^{i\mathbf{q}(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)} \quad (10)$$

Avec  $b_i = b_0 \rho_i$ ;  $\rho_i = n/V$  (densité).

L'intensité totale diffusée (eq 10) est la somme de deux termes : le premier terme est le terme de diffusion incohérente liée à l'écart moyen des longueurs de diffusion et le second est le terme de diffusion cohérente qui représente les corrélations spatiales collectives entre les objets diffusants. Le terme incohérent représente les dynamiques individuelles de chaque de centre diffuseur non corrélé avec un autre. Le terme incohérent est dû à des fluctuations de  $b_i$ .

**Tableau 4:** Longueurs de diffusion de neutrons

Isotope	Spin	$b_0 (10^{-12} \text{ cm})$
<sup>1</sup> H	1/2	-0.373
<sup>2</sup> H	1	0.667
<sup>12</sup> C	0	0.665
<sup>13</sup> C	1/2	0.62
<sup>14</sup> N	1	0.94
<sup>16</sup> O	0	0.580

### **III. L'intensité diffusée**

L'expression générale de l'intensité diffusée par des objets de forme quelconque en régime concentré dans un milieu continu fait intervenir un facteur de forme (qui décrit la taille et la géométrie des objets) et un facteur de structure qui décrit les corrélations entre objets dans le système. Donc l'expression de l'intensité diffusée peut être réécrite sous la forme :

$$I(q) = \Phi V \Delta b^2 S(q) P(q) \quad (11)$$

Avec  $\Phi$  la fraction volumique en objets diffusants,  $\Delta b^2$  le contraste entre les objets et le solvant,  $V$  le volume d'un objet,  $P(q)$  le facteur de forme et  $S(q)$  le facteur de structure de ces objets.

Le facteur de forme est fonction de la forme d'un objet individuel. Le facteur de forme tend toujours vers 1 aux petits  $q$ . Si le système est en régime dilué et que les objets sont assez dispersés pour ne pas avoir d'interaction entre eux, alors le facteur de structure est lui aussi égal à 1 et la mesure de l'intensité aux petits  $q$  est directement en fonction des préfacteurs et permet d'atteindre une taille caractéristique, le rayon de giration, ainsi que la masse molaire *via* la densité pour les objets diffusants. Différents facteurs de forme typiques existent suivant le type d'objet considéré. Nous donnons ici un exemple d'une sphère, plus de détails peuvent être trouvés dans la littérature<sup>[146]</sup>. Le facteur de forme d'une sphère de rayon  $R$  s'écrire :

$$P(q) = \left[ 3 \frac{(\sin(qR) - qR\cos(qR))}{(qR)^3} \right]^2 \quad (12)$$

Si  $qR \ll 1$ , alors un développement limité donne :

$$P(q) = 1 - \frac{(qR)^2}{3} \quad (13) \quad (R_g^2 = 3/5 R^2)$$

## **Brève introduction à la diffusion des neutrons aux petits angles**

---

On se trouve alors dans le domaine de Guinier qui permet de mesurer le rayon de giration d'un objet. De même si  $qR \gg 1$ ,  $\sin qR \approx \cos qR \approx \frac{1}{2}$  et alors on obtient :

$$P(q) \approx 9/2 (qR)^3 \quad (14)$$

On parle alors de régime de Porod et on observe une diffusion en  $q^{-4}$  typique des interfaces.

Cette expression permet de mesurer une surface spécifique pour l'objet.

### **III.1. Le rayon de giration et le domaine de Guinier**

En milieu suffisamment dilué, le facteur de structure est égal à 1, et l'intensité est proportionnelle au facteur de forme des objets qui contient l'information concernant les corrélations entre les positions des diffuseurs élémentaires d'un même objet dominant la diffusion du système.

$$P(q) = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle e^{iq \cdot r_{ij}} \rangle \quad (15)$$

Le facteur de forme dépend donc du type d'objet. Cependant, aux très petits angles  $q \rightarrow 0$ , un développement général de l'équation de diffusion générale, pour  $qRg \ll 1$  donne:

$$P_{\text{Guinier}} \approx -\frac{q^2 R_g^2}{3} \quad (16)$$

Cette limite aux très petits angles s'appelle limite de Guinier, et elle est très utilisée pour déterminer des tailles caractéristiques d'objets isolés. Il est plus commode d'exprimer le rayon de giration en fonction des distances au centre de gravité, pris pour origine:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_i^N r_i^2 = \langle r_i^2 \rangle \quad (17)$$

Cette formule peut être reliée au rayon d'une sphère (pleine) de rayon  $R$  (cas souvent rencontré dans notre étude) par:

$$R_g^2 = 3/5 R^2 \quad (18)$$

### **III.2. Aire spécifique de l'interface et domaine de Porod**

Certains objets sont caractérisés par l'interface entre deux milieux homogènes de longueurs de diffusion différentes. C'est le cas d'objets denses, homogènes et de grande taille par rapport à l'échelle d'observation. On s'intéresse au domaine des valeurs de  $q$  suffisamment grandes, où l'on observera des distances petites. À ces échelles, on peut montrer que la dépendance du signal est en  $1/q^4$ . La section efficace (eq 9) par unité de volume est alors donnée par la loi de Porod:

$$\frac{1}{V} \frac{d\sigma}{d\Omega}(q) = \frac{2\pi}{q^4} \Delta b^2 S_v \quad (19)$$

Où  $S_v$ , est l'aire spécifique (ou aire par unité de volume) des interfaces entre les deux milieux. On peut avoir ainsi les informations sur la nature de la surface ou bien son rayon de courbure. Dans le cas d'une sphère dure par exemple, on a:

$$S_v = \frac{4\pi R^2 n}{V} \quad (20)$$

Avec  $4\pi R^2$  l'aire d'une particule,  $V$  le volume d'échantillon contenant  $n$  particules.

Dans ce cas, la taille de l'objet diffuseur peut être reliée à la période des oscillations qui apparaissent bien mieux en représentation de Porod c'est à dire  $q^4$ . Nous utiliserons fréquemment, les présentations de « Porod » et de « Guinier », (Chapitre n°4) qui font apparaître avec un traitement de signal simple, certaines dimensions caractéristiques des colloïdes.



# Publication

Heiko Winter, Abdellatif Barakat, Bernard Cathala and Bodo Saake.  
**Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation.** Macromol. Symp. 2006, 232, 74–84.



# Preparation of Arabinoxylan and its Sorption on Bacterial Cellulose During Cultivation

Heiko Winter,<sup>1</sup> Abdellatif Barakat,<sup>2</sup> Bernard Cathala,<sup>2</sup> Bodo Saake<sup>\*1</sup>

**Summary:** The sorption of arabinoxylan (AX) on bacterial cellulose was investigated by adding AX to the culture medium of *Gluconacetobacter xylinus*. The starting AX material was produced by alkaline extraction of oat spelts. To investigate the impact of varying AX quality, the residual lignin was reduced by ClO<sub>2</sub> bleaching. Furthermore, bleached and unbleached xylans were subjected to xylanase hydrolysis in order to produce fractions of varying molar mass. Of all samples only the water soluble fractions were used for sorption experiments. A reduced molar mass resulted in a lower sorption of AX to the cellulose, while the lignin content increased the sorption of AX on bacterial cellulose. The sorption of AX resulted in a reduction of bacterial cellulose crystallinity and cellulose I $\alpha$  content. In combined treatments of AX with xyloglucan and  $\beta$ -glucan no synergistic effect of those polysaccharides on the AX sorption was found.

**Keywords:** arabinoxylan; bacterial cellulose;  $\beta$ -glucan; cellulose I $\alpha$ /I $\beta$ ; crystallinity; molar mass; sorption; xyloglucan

## Introduction

Bacterial cellulose (BC) is often used as a model system to elucidate influencing factors on the formation of cellulose.<sup>[1,2]</sup> The lack of lignin, hemicelluloses, pectin and extractives is a major advantage of bacterial cellulose for these purposes. In contrast to that cellulose in lignified plant cell walls is always contaminated by other components and modified by isolation procedures. BC formation is subdivided into several steps. Glucan chains are enzymatically synthesized from activated D-glucose at linear terminal complexes located in the bacterial plasma membrane.

The chains extruded into the extracellular phase are immediately assembled into one elementary fibril per terminal complex. As a next step several elementary fibrils are combined to microfibrils, then associating to form bundles which subsequently configure the final bacterial cellulose ribbons.<sup>[3–7]</sup> Except for the biosynthesis of single chains, all further steps occur by self-assembly forming highly crystalline structures by intra- and intermolecular hydrogen bonds. Up to 30 min after extrusion, weak alkali suffices to transform the native cellulose I into technical cellulose II, while later on only strong alkali has this effect.<sup>[8]</sup> This behavior indicates that crystallite stabilization is not finished at the time of extrusion but can be influenced for a short-term period. The presence of water soluble polysaccharides in the culture medium can affect the structure and formation of BC as well. If these polysaccharides bind to cellulose, they can interfere with the assembly of microfibrils and bundles. Carboxymethylcellulose<sup>[4,9,10]</sup>, glucomannan<sup>[6,9,11]</sup>, xyloglucan (XG)<sup>[9,10,12]</sup>, pectin<sup>[6]</sup> and

<sup>1</sup> Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Chemistry and Chemical Technology of Wood, Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany  
Fax: (+49) 040 73962 599  
E-mail: b.saake@holz.uni-hamburg.de

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique; Unité Mixte de Recherche Fractionnement des AgroRessources et Emballages, Equipe Parois et Matériaux Fibreux, 51686 Reims Cedex 2, France

xylan<sup>[6,9]</sup> influence nascent BC in different manner and extent. In general the sorption results in less ordered bacterial cellulose proven via electron microscopy, X-ray diffraction, FTIR- and solid-state NMR spectroscopy. Besides crystallinity, the ratio of cellulose I <sub>$\alpha$</sub>  and cellulose I <sub>$\beta$</sub>  can be affected. The cellulose I <sub>$\alpha$</sub>  content of BC is reduced when cultivation is accomplished in the presence of some polysaccharides.<sup>[6,13,14]</sup> Accordingly, some of the cellulose from BC/polysaccharide composites is more akin to plant cellulose concerning their crystalline characteristics.<sup>[9]</sup> Based on various model systems, the role of structural hemicelluloses in plant cell walls is redefined. Hemicelluloses are not only a link between cellulose and lignin but also a major factor for the formation of cellulose structure. In view of that, it can be expected that they influence the formation of lignin structures as well.<sup>[15,16]</sup> In the present study several arabinoxylan (AX) fractions varying in molar mass and lignin content were produced and added to the culture medium of *Gluconacetobacter xylinus*. The sorption effect of these AX fractions on the cellulose and their effect on the BC structure were investigated. A focal point was the importance of AX molar mass for these experiments. Since xylans from lignocellulosic plants are not available in a pure form, the effect of lignin as a major impurity was investigated as well in this study. For testing synergistic effects on sorption rates AX was also added in combination with xyloglucan or  $\beta$ -D-glucan to the cultivation medium.  $\beta$ -glucan consists of cellobiosy and cello-

tetrasyl units which are bound by  $\beta$ -(1,3) linkages. Xyloglucan is made up of a  $\beta$ -(1,4)-glucan backbone which is highly substituted with  $\alpha$ -D-xylose. Some of the xylose units are further linked to  $\beta$ -D-galactose.<sup>[17]</sup>

## Experimental

### Xyloglucan (XG), $\beta$ -Glucan ( $\beta$ -Gl) and Arabinoxylan (AX)

XG from tamarind seeds (Megazyme, LOT 00401) and  $\beta$ -Gl from oat (medium viscosity, Megazyme, LOT 60501) were purchased from Megazyme. AX samples were produced by a successive extraction and fractionation procedure (Figure 1). The starting material (AX<sub>raw</sub>) was extracted from oat spelt with 5% (w/v) NaOH at 90 °C.<sup>[18]</sup> AX<sub>raw</sub> was further purified by washing with methanol/water (60/40, v/v), methanol and ether. A part of the purified sample (AXMeOH) was bleached with 3% ClO<sub>2</sub> at 70 °C and 25% consistency for 3 h (AXClO<sub>2</sub>). AXMeOH and AXClO<sub>2</sub> were both dissolved in water (concentration: 5%, w/v; 100 °C for 20 min, shaken over night at 20 °C) and centrifuged (20 min, 3500 rpm) to remove the insoluble fractions. The supernatants were freeze dried (Alpha 2-4 LSC, Christ), yielding the water soluble fractions AX1 (from AXMeOH) and AX2 (from AXClO<sub>2</sub>).

AX1 and AX2 were fragmented by xylanase (78nkat/g, Ecopulp TX-200C, Röhm Enzyme) at a concentration of 0.4% in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 6) at

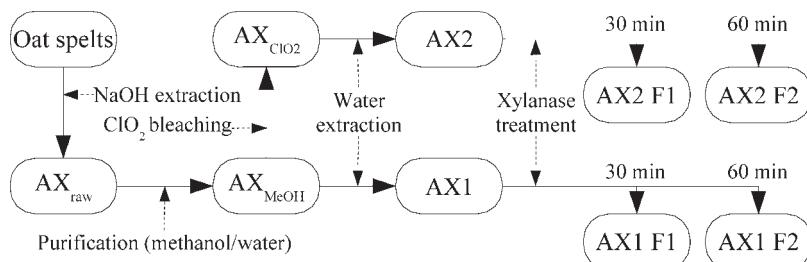


Figure 1.

Diagram of the extraction and fractionation steps of the oat spelt arabinoxylan also illustrating the abbreviations used for the different arabinoxylan fractions.

55 °C for 30 min (fraction F1) and 60 min (fraction F2). After enzyme denaturation (100 °C) and centrifugation (4400 rpm, 60 min) the supernatant was lyophilized.

### Cultivation of Bacterial Cellulose (BC)

BC was produced by *Gluconacetobacter xylinus* (DSM 2004, ATCC 23768) in a static medium (pH 5, 28 °C) for 10–12 days in flat poly-carbonate boxes (26/15.3/4.5 cm).<sup>[19,20]</sup> The culture medium contained 5 g/l of tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 g/l citric acid, 0.1 g/l cycloheximide, 20 g/l glucose and 1 g/l hemicellulose except for the reference. Inoculating was performed with 1% bacteria from a pre-culture. As a pretreatment for the carbohydrate analysis residues from the culture medium were removed from BC mats by a washing procedure (distilled H<sub>2</sub>O, 60 °C). Subsequently the samples were freeze dried. For FTIR analysis an additional intense purification was applied.<sup>[6]</sup> A part of each mat was treated with 0.25 M NaOH (100 °C, 6 h) followed by washing and incubation with 2.5 M HCl (100 °C, 4 h). Finally the samples were washed (distilled H<sub>2</sub>O) and freeze dried after solvent exchange with ethanol and tert-butanol.

### Monosaccharide Analysis

Individual AX fractions were hydrolyzed in a 1-step procedure applying 1% of sulphuric acid for 40 min at 120 °C. Monosaccharides were determined according to Puls *et al.* on MCI Gel CA08F in the borate form.<sup>[21,22]</sup> BC mats were ground in a ball mill (MM 2000, Retsch) and subjected to a 2-step hydrolysis: pre-hydrolysis: 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 h, 20 °C; post-hydrolysis: 9.8% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 h, 100 °C. Hydrolysates were analyzed by anionic exchange chromatography with pulsed amperometric detection (AEC-PAD) on CarboPac PA1 columns (analytical 4 × 250 mm and guard column 4 × 50 mm, Dionex).

### <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy

30 mg arabinoxylan were dissolved in D<sub>2</sub>O, freeze dried and re-dissolved in 1% NaOD.

Acquisitions were performed at 80 °C on a Mercury spectrometer (400 MHz, Varian, CA) using a 5 mm probe, a pulse angle of 45° and a relaxation delay of 12 sec. Signal analysis was carried out according to Teleman and co-workers.<sup>[23]</sup>

### Size Exclusion Chromatography (SEC)

Separation was performed on GRAM columns (10  $\mu$ ; 30, 1000, 3000 Å, each 8 × 300 mm; Polymer Standard Service) using DMSO:H<sub>2</sub>O (9:1) with addition of 0.05 M LiBr as eluent at 60 °C with flow rate of 0.4 ml min<sup>-1</sup>.<sup>[24]</sup> Molar masses were determined from a viscosimetric (H502B, Viscotek) and refractive index detector (RI-71, Shodex) using a universal calibration with pullulan standards.<sup>[25]</sup>

### Nitrogen Determination

The determination of nitrogen in bacterial cellulose was carried out with an N-Protein NA2000 unit (Fisons Instruments). Samples were weighed on a microbalance (M2P, Sartorius) and the system was calibrated with atropine (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>).

### FTIR Spectroscopy

FTIR spectra were recorded on a Vector 33 spectrometer (Bruker) employing the KBr technique. 2–3 mg carefully defibrated freeze dried BC were blended with 350 mg pre-ground KBr without exerting pressure to prevent changes of crystalline properties. Baselines were corrected manually at 4000, 3800, 1895, 850 and 400 cm<sup>-1</sup> (the last only at half intensity). The highest peak in the range from 2000 to 800 cm<sup>-1</sup> was scaled to 1. Base lines, absorption intensities (A) and crystallinity indices were determined applying the methods of O'Conner *et al.*<sup>[26]</sup> ( $A_{1429\text{ cm}^{-1}}/A_{897\text{ cm}^{-1}}$ ), Nelson *et al.*<sup>[27]</sup> ( $A_{1372\text{ cm}^{-1}}/A_{2900\text{ cm}^{-1}}$ ) and Hulleman *et al.*<sup>[28]</sup> ( $A_{1280\text{ cm}^{-1}}/A_{1200\text{ cm}^{-1}}$ ). For the last method the spectra were additionally deconvoluted (half bandwidth = 20 cm<sup>-1</sup>, peak-width narrowing factor = 1.5).<sup>[28]</sup> Cellulose I <sub>$\alpha$</sub>  and I <sub>$\beta$</sub>  ratios were determined according to the method of Yamamoto *et al.* using  $A_{750\text{ cm}^{-1}}$  ( $A_{\alpha}$ ) for cellulose I <sub>$\alpha$</sub>  and  $A_{710\text{ cm}^{-1}}$  ( $A_{\beta}$ ) for cellulose I <sub>$\beta$</sub> .<sup>[13]</sup> The

$I_\alpha$  content was calculated according to the equation suggested by Yamamoto:  $I_\alpha = [2,55^*A_\alpha/(A_\alpha + A_\beta)] - 0,32$ . The standard deviation ( $s$ ) for most of the FTIR methods was determined by repeated measurements on the starting BC material: crystallinity index O'Conner:  $\pm 1.1\%$ , crystallinity index Nelson:  $\pm 3.3\%$ , cellulose  $I_\alpha/I_\beta$  ratio:  $\pm 1.0\%$ .

## Results and Discussion

### Preparation and Characterization of Water Soluble Arabinoxylans

Arabinoxylan obtained from alkaline extraction of oat spelts (AXraw) was subjected to various purification and fragmentation treatments in order to produce samples of varying lignin content and molar mass. The carbohydrate composition was determined after a mild 1-step hydrolysis. The resulting hydrolysis residue is considered as a measure for lignin content analogous to the Klason procedure.<sup>[29]</sup> This procedure is based on a complete acid hydrolysis of the polysaccharides and a gravimetric determination of the insoluble lignin condensation products. Additionally the kappa number of samples was determined.<sup>[30]</sup> In this method the residual lignin in AX is oxidized and the required amount of KMnO<sub>4</sub> is measured as a more sensitive procedure for lignin determination. A purification of AXraw was performed by a successive washing in order to remove lignin impurities and low molar

mass components. Both, the hydrolysis residue and the kappa number indicated a reduced lignin content of the resulting fraction (AXMeOH) while the carbohydrate composition of the material changed only slightly (Table 1). A part of the sample was subjected to a bleaching stage with ClO<sub>2</sub> (AXClO<sub>2</sub>) leading to a further reduction of the lignin content corresponding to a Kappa number of 13.3 and a hydrolysis residue of 4.7%. The bleaching resulted as well in a change of the carbohydrate composition, respectively a lower arabinose and higher xylose content.

From both samples, AXMeOH and AXClO<sub>2</sub> the water soluble fractions were isolated by dissolution, centrifugation and lyophilization (Figure 1). The resulting fractions were obtained in yields of 33% (AX1) and 26% (AX2). Both samples had a significantly higher arabinose content compared to the previous fractions (Table 1), indicating an enrichment of polysaccharides with high arabinose substitution. It had been previously reported that substituents in AX improved water solubility and impeded aggregation.<sup>[17]</sup>

The amount of 4-O-methylglucuronic acid substituents (4-O-MeGlucA) was determined by <sup>1</sup>H-NMR. The ClO<sub>2</sub> bleaching had no significant effect on 4-O-MeGlucA, while higher amounts were found in the water soluble fractions AX1 and AX2. This indicated again that water soluble fractions exhibited a higher branching (Table 2). The amount of arabinose linked to the xylan backbone was deter-

**Table 1.**  
Carbohydrate composition, hydrolysis residue and kappa number of arabinoxylan fractions.

Sample <sup>a)</sup>	Lignin content		Carbohydrate composition <sup>b)</sup>			
	Kappa-no.	Hydrolysis residue % abs.	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
			% rel.	% rel.	% rel.	% rel.
AXraw	48.9	10.7	13.3	3.5	1.0	82.0
AXMeOH	42.0	7.6	12.1	1.9	2.4	83.4
AXClO <sub>2</sub>	13.3	4.7	8.6	2.0	2.7	86.6
AX1	—	5.4	18.0	5.4	2.8	73.6
AX2	—	4.9	16.1	7.7	5.1	71.1

<sup>a)</sup> see Figure 1 for abbreviations

<sup>b)</sup> determination after 1-step hydrolysis and borate anion exchange chromatography

**Table 2.**

4-O-methylglucuronic acid and arabinose substituents on the xylan backbone compared to the total arabinose content of the samples.

Sample <sup>a)</sup>	4-O-MeGlucA <sup>b)</sup>	Arabinose <sup>b)</sup>	Arabinose <sup>c)</sup>
	based on xylan backbone	total sample	mol-%
	mol-%	mol-%	mol-%
AXMeOH	2.3	8.7	14.6
AXClO <sub>2</sub>	2.4	7.2	10.0
AX1	5.3	12.8	24.5
AX2	8.2	11.4	22.7

<sup>a)</sup> see Figure 1 for abbreviations

<sup>b)</sup> determined by <sup>1</sup>H-NMR

<sup>c)</sup> determined by 1-step hydrolysis and borate anion exchange chromatography

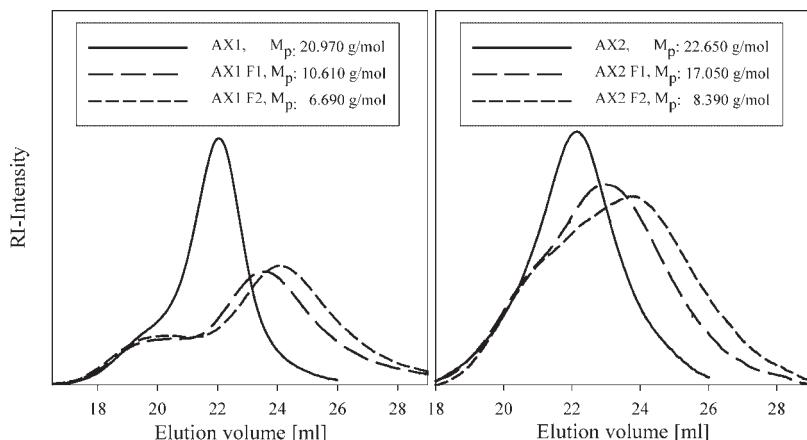
mined by <sup>1</sup>H-NMR as well. These values were lower compared to the arabinose determined by hydrolysis and chromatography. Accordingly a part of the total arabinose was not incorporated into the arabinoxylan, an indication for significant impurities most likely due to arabinogalactan (Table 2). A detailed comparison of arabinose mol-% from NMR and hydrolysis gave further insight into the fractionation procedure. The ClO<sub>2</sub> bleaching reduced the arabinose content in AX by 17% while the total arabinose content was reduced by more than 30%. Therefore most of the degradation occurred in the postulated arabinogalactan impurity. The water

soluble fractions AX1 and AX2 on the other hand show a higher increase of arabinose in the hydrolysis results. Accordingly, it can be still stated that the water soluble arabinoxylan fraction has a higher proportion of arabinose substituents. Nevertheless, the higher results for arabinose determined by hydrolysis indicate an enrichment of the proposed arabinogalactan impurity in the water soluble fractions.

### Xylanase Degradation of Water

#### Soluble Arabinoxylans

Various approaches have been attempted in order to produce arabinoxylans of varying molar mass. An ultrafiltration treatment failed due to a clogging of membranes in the first pre-filtration steps. A fractionated precipitation resulted into fraction with varying molar masses from 19,000 to 24,000 g/mol ( $M_p$  in peak maximum). Nevertheless, the chemical characterization revealed that the major differences existed in the substitution pattern of the various fractions obtained.<sup>[31]</sup> Finally an enzymatic degradation of the water soluble fractions AX1 and AX2 with xylanase was performed. The resulting size exclusion chromatography (SEC) elution profiles were somehow broad but showed a clear shift to lower elution volume (Figure 2). For the starting materials AX1 and AX2 it became

**Figure 2.**

SEC elution profiles of the water soluble fractions of unbleached (AX1) and bleached (AX2) arabinoxylan before and after xylanase hydrolysis (F1 30 min; F2 60 min).

apparent that AX1 had a more pronounced high molar mass shoulder in the range from 18 to 20 ml. This material could not be degraded by the xylanase, indicating a different chemical structure. It could be assumed that this fraction represented the impurity postulated from the carbohydrate analysis data. This impurity was less pronounced in the fraction AX2 supporting the previous conclusion that the impurity was preferably degraded during the  $\text{ClO}_2$  bleaching. Due to the broad molar mass distribution, the degradation intensity was best characterized by the change of molar mass in the peak maximum ( $M_p$ ). For the unbleached sample AX1, the  $M_p$  was reduced from 20,970 g/mol to 10,610 g/mol for AX1 F1 and to 6,690 g/mol for AX1 F2.

For the bleached AX2 sample the corresponding  $M_p$  values were 22,650 g/mol for AX2, 17,050 g/mol for AX2 F1 and 8,390 g/mol for AX2 F2. It was somewhat surprising that  $M_p$  values were slightly higher for the fractions produced from the bleached sample. This might be at least partly due to the different yields in the generation of the water soluble fractions. As an outcome of this fractionation and degradation scheme six water soluble AX samples with varying lignin content and molar masses were obtained. The carbohydrate composition of these samples was determined by a 2-step hydrolysis which was more intense compared to the protocol

applied previously. This procedure was chosen since a carbohydrate assay was needed for sorption experiments which could degrade not only AX but also bacterial cellulose (BC), xyloglucan (XG) and  $\beta$ -Glucan ( $\beta$ -Gl). This could only be achieved with a procedure using concentrated acid (72%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) in the first step (Table 3).

Applying the 2-step hydrolysis procedure to AX1 and AX2 a slightly lower arabinose content and a higher proportion of galactose, glucose and xylose was determined compared to the 1-step hydrolysis (Table 1). Within each fractionation series ( $\text{AX1} \rightarrow \text{AX1 F1} \rightarrow \text{AX1 F2}$  and  $\text{AX2} \rightarrow \text{AX2 F1} \rightarrow \text{AX2 F2}$ ) no significant differences in the carbohydrate composition were found. Therefore it could be stated that within each series the samples only varied with regard to their molar mass and not regarding their substitution pattern or the level of impurities. The XG sample consisted not only of xylose and glucose but also of galactose and arabinose. This complicated the calculation of sorption rates for mixed experiments with AX and XG. For the  $\beta$ -Gl only glucose could be detected.

### Sorption of Arabinoxylan on Cellulose

#### During the Cultivation of

#### *Gluconacetobacter Xylinus*

The various AX fractions were added to the culture medium of *Gluconacetobacter xyl-*

**Table 3.**

Carbohydrate composition of water soluble arabinoxylan fractions, xyloglucan, and  $\beta$ -glucan as determined by a 2-step hydrolysis procedure and AEC-PAD chromatography.

Sample <sup>a)</sup>	Xylanase hydrolysis		Carbohydrate composition			
	min		Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
		% rel.	% rel.	% rel.	% rel.	% rel.
AX1	—	15.5	6.1	3.7	74.8	
AX1 F1	30	16.3	6.3	3.6	73.9	
AX1 F2	60	16.1	7.5	4.8	71.6	
AX2	—	14.5	7.7	5.5	72.5	
AX2 F1	30	15.2	8.2	5.9	70.8	
AX2 F2	60	15.9	7.2	4.9	72.1	
XG	—	1.6	16.8	50.8	30.8	
$\beta$ -Gl	—	—	—	100.0	—	

<sup>a)</sup> see Figure 1 for abbreviations

nus in order to investigate the sorption of polysaccharides to the BC. Besides the AX fractions XG and  $\beta$ -Gl were included into this study. To determine the sorption of polysaccharides, only a gentle washing of the BC mats was performed in order to remove the constituents of the culture medium. Afterwards the material was freeze dried and hydrolyzed followed by carbohydrate analysis. A direct extraction of hemicelluloses from the BC mats was not pursued because even with alkali a complete recovery of hemicelluloses can not be achieved.<sup>[11]</sup> However, with the procedure applied in this study only hydrolysis yields in the magnitude of 40–50% could be achieved. The nitrogen contents of samples indicated that likewise 40–50% of proteins were contained in the samples. This indicates that the gentle washing procedure could remove the low molar mass components of the culture medium but not bacterial residues which are the source of the protein contamination. The combined yield of hydrolysis and proteins amounted to ~90% for all samples indicating a complete hydrolysis of the polysaccharides. The normalized carbohydrate data showed 99.9 % of glucose for the BC reference which confirmed that no carbohydrate impurities originated from the bacteria which would interfere with the determination of AX or XG (Table 4). For all experiments performed with AX samples especially an increased amount of xylose, arabinose and galactose was found. XG resulted in an increase of xylose and galactose (Table 4). The polysaccharide sorption rates were now calculated from the normalized carbohydrate data under consideration of the composition determined for the various starting materials.

In order to calculate the sorption of AX1 and AX2 fractions onto BC, the xylose percentage from Table 4 and the arabinose/xylose ratio from the <sup>1</sup>H-NMR measurements (Table 2) were used. This procedure enabled a good estimation of the AX sorption without interference from the impurities. The situation became more complicated for the combined treatments

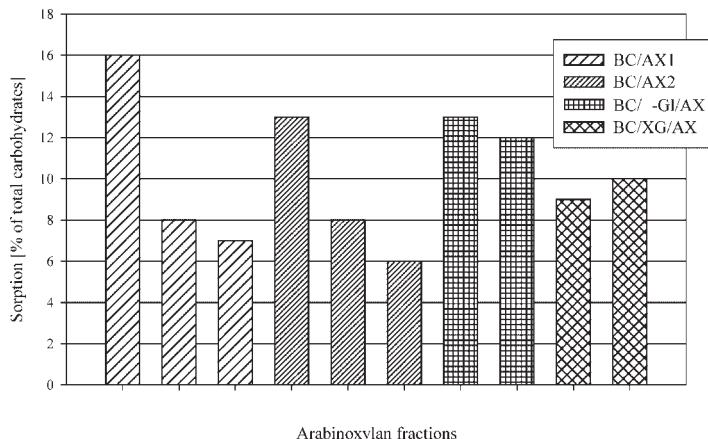
**Table 4.**

Normalized carbohydrate composition of bacterial cellulose (BC) mats produced in the presence of various polysaccharide fractions.

Sample <sup>a)</sup>	Carbohydrate composition			
	Arabinose % rel.	Galactose % rel.	Glucose % rel.	Xylose % rel.
BC	0.0	0.1	99.9	0.0
BC/AX1	2.1	0.9	83.2	13.8
BC/AX2	2.4	0.9	85.4	11.3
BC/AX1 F1	1.1	0.7	91.1	7.1
BC/AX1 F2	1.1	0.9	91.8	6.2
BC/AX2 F1	1.1	1.1	90.7	7.2
BC/AX2 F2	0.7	1.0	92.7	5.6
BC/XG	0.0	2.3	94.5	3.2
BC/XG/AX1	2.0	2.3	82.4	13.3
BC/XG/AX2	1.7	2.2	84.0	12.1
BC/ $\beta$ -Gl	0.0	0.1	99.9	0.0
BC/ $\beta$ -Gl/AX1	1.5	0.9	86.0	11.5
BC/ $\beta$ -Gl/AX2	1.1	0.9	86.9	11.1

<sup>a)</sup> see Figure 1 for abbreviations

with the two other polysaccharides. The  $\beta$ -Gl consisted only of glucose and could not be differentiated from the cellulose. Therefore AX sorption could only be calculated based on the total glucan (BC plus  $\beta$ -Gl) and not solely on its BC component. For the XG even more assumptions had to be made in order to calculate an estimate of the AX sorption. For all experiments incorporating AX fractions and BC, the galactose values were rather stable between 0.7 and 1.0%. As discussed before the galactose in AX fractions must result from impurities, most likely an arabinogalactan component. All BC mats cultivated in the presence of XG had a higher galactose content of 2.2 to 2.3% due to the galactose within the XG polymer. It was assumed that for combined treatments 0.7% galactose was due to the AX fraction and the remaining galactose due the XG fraction. Subsequently a sorption rate of XG was calculated from the galactose/xylose ratio in Table 3. Considering that the lowest galactose value for impurities from BC/AX experiments was applied, the calculated XG sorption should represent a rather high level. The remaining xylose percentage was used now for the calculation of AX sorption and should represent a minimum value which

**Figure 3.**

Polysaccharide sorption rates onto BC. For experiments with AX fractions an accurate calculation was performed, while data for combined treatments with  $\beta$ -Glucan ( $\beta$ -Gl) and xyloglucan (XG) estimate a minimum level of the sorption rate.

might be exceeded by the real sorption level.

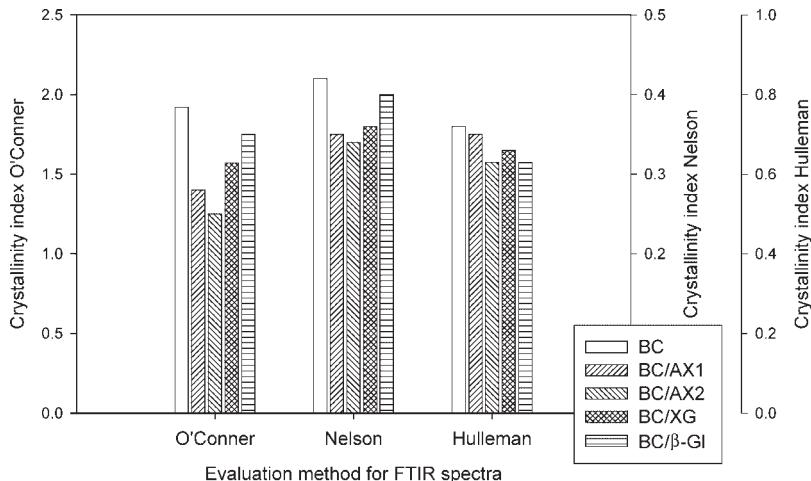
From the experiments with the various AX fractions it became apparent that the unbleached AX1 sample had a higher sorption rate compared to the bleached AX2 (Figure 3). It could be possible that the higher lignin content favored the aggregation of AX and consequently the retention of larger particles within the BC mat. An increased sorption of xylan aggregates to cellulose was reported previously.<sup>[32]</sup> Further, it became evident that enzymatic degraded fractions F1 and F2 were always adsorbed to a far lower content by comparison to the starting materials AX1 and AX2. Apparently high molar masses were beneficial for the sorption of AX onto BC. For the combined treatments with  $\beta$ -Gl a lower sorption rate of AX1 and AX2 occurred. As discussed before this value could not be related exclusively to the BC component of the fiber mat. Nevertheless, it is at least unlikely that a strong synergistic effect existed between  $\beta$ -Gl und AX fractions.

The sorption rate determined for XG without AX fractions was about 10% and rather low compared to literature data of 35% and 47%.<sup>[10,11]</sup> These differences might result from variations in solubility, molar mass or substitution. For combined

treatments with XG and AX the estimated sorption rates were lower compared to the single experiments. Considering the assumptions made, these calculations can not be used as proof for a reduction of AX sorption by XG. Nevertheless, it is on the other hand unlikely that a positive synergistic effect existed between AX fractions and the XG polymer

#### **Effect of Polysaccharide Sorption on the Structure of Cellulose**

The changes of cellulose structure resulting from polysaccharides in the cultivation medium were investigated by FTIR spectroscopy. This method could not provide absolute information but a qualitative comparison between the various samples. For these investigations it was crucial to further purify the cellulose mats in order to remove all impurities from the bacteria. A purification procedure from Tokoh was applied, which enables the determination of cellulose  $I_\alpha$  and  $I_\beta$  ratios.<sup>[6,7]</sup> The crystallinity index was determined as well. However, the applied purification using HCl treatments at 100 °C resulted in a hydrolysis of amorphous cellulose regions. From viscosimetric determinations in cupriethylenediamine the degree of polymerisation was calculated for the various samples. The results varied between 400 and 500 indicat-



**Figure 4.**

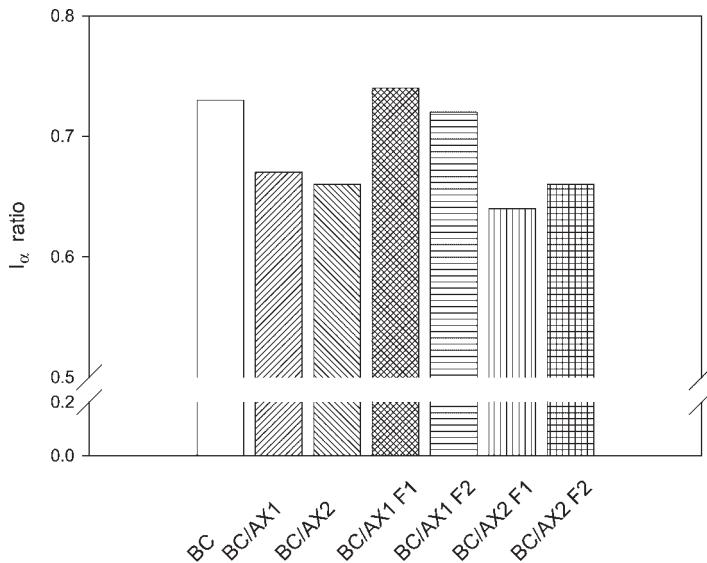
Crystallinity index of cellulose from various BC/polysaccharide mats as determined by FTIR spectroscopy according to the methods of O'Conner ( $A_{1429}/A_{897}$ ), Nelson ( $A_{1372}/A_{2900}$ ), and Hulleman ( $A_{1280}/A_{1200}$ ).<sup>[26–28]</sup> (see Figure 1 for abbreviations).

ing a severe hydrolysis of cellulose chains.<sup>[31]</sup> Therefore the information on crystallinity should be considered with caution. In future studies a milder purification with sodium dodecyl sulfate solutions should be applied in order to avoid hydrolytic degradation.<sup>[33]</sup>

The evaluation of crystallinity was performed by various methods which all indicated a reduction of BC crystallinity as a result of AX sorption (Figure 4). This reduction was more pronounced for the data obtained by the methods of Nelson and O'Conner compared to the procedure of Hulleman.<sup>[26–28]</sup> In experiments applying XG or  $\beta$ -Gl a reduction of crystallinity occurred as well. However, at least for the determination method according to Nelson and O'Conner this reduction was less pronounced than for experiments with AX fractions. The bleached AX2 sample had always a higher effect compared to the unbleached AX1 sample. This was somehow surprising, since AX1 showed the higher sorption rates. It has already been discussed that the higher sorption of AX1 might result from a more intense aggregation caused by the higher lignin content. It could be postulated that AX2 was better integrated into cellulose microfibrils and

bundles, exhibiting a larger effect on crystallinity, even at lower sorption rates. The effect of the lower molar mass fractions F1 and F2 on the crystallinity of BC was not conclusive, since results from the various determination methods were somehow contradicting (data not shown).

The ratio of cellulose I $\alpha$  was significantly reduced for BC cultivated in the presence of the AX of high molar mass (Figure 5). Again it can not be excluded that the intense purification procedure might effect the magnitude of the values determined here. Various authors have stated that Cellulose I $\alpha$  was easier degraded compared to cellulose I $\beta$  by both, enzymatic and acid hydrolysis procedures.<sup>[34,35]</sup> However, considering that within this study all samples have been submitted to the same experimental procedures a comparison between the various samples should be legitimate. In accordance with the crystallinity index, the effect of the unbleached AX1 was slightly lower compared to the bleached AX2 sample. This might again support the assumption that lower lignin contents favored the integration of polysaccharides within the cellulose microfibrils and bundles. Again the results on fractions with reduced molar mass were not univocal.

**Figure 5.**

Ratio of cellulose  $I_{\alpha}$  in various BC polysaccharide mats as determined by FTIR spectroscopy according to the methods of Tokoh.<sup>[6,7]</sup>

Enzymatic degraded fractions from unbleached AX1 (AX1 F1, AX1 F2) hardly had any effect on the cellulose  $I_{\alpha}$  proportion compared to the reference BC sample. The fraction AX2 F1 and AX2 F2 obtained from the bleached sample had a similar effect as the corresponding high molar mass sample AX2. In general the magnitude of these results was in accordance with the data of Tokoh obtained after sorption of 4-*O*-methylglucuronoxylan from birch.<sup>[6]</sup> The author determined cellulose  $I_{\alpha}$  values of 0.73 for the reference BC and 0.62 for BC cultivated in the presence of birch xylan.

## Conclusion

A method for the production of water soluble AX fractions with varying molar masses and lignin content was developed. This enabled for the first time to investigate the effect of these two characteristics on the sorption of AX onto BC. In cultivation experiments of BC with the different AX fractions it became apparent that higher molar masses of AX increased the sorption rate significantly.

A higher lignin content resulted as well in a higher sorption rate of AX to the BC mat. Further, BC cultivation was performed combining AX fractions with XG and  $\beta$ -Gl. Here the determination of sorption rates was less accurate. For experiments with  $\beta$ -Gl no differentiation between BC and  $\beta$ -Gl could be made from the carbohydrate analysis. For combined treatment with  $\beta$ -Gl and AX the differentiation of these components was based on assumptions, permitting only an estimated minimum sorption rate. Nevertheless, the results gave a strong indication that no positive synergistic effect existed between those polysaccharides regarding their sorption on BC. Crystallinity and cellulose  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  ratio were qualitatively investigated by FTIR spectroscopy. A sample purification was applied, which somehow obscure the crystallinity data due to the hydrolysis of amorphous cellulose regions. Nevertheless, the comparison of the various samples indicated that unbleached and bleached AX (AX1, AX2), XG and  $\beta$ -Gl all reduced the crystallinity of the BC formed during cultivation. This tendency was already stated previously for various polysaccharides.<sup>[6,9,10]</sup>

For two of the three evaluation methods applied to the FTIR spectra the effect of AX was more pronounced compared to XG and  $\beta$ -Gl. Surprisingly the bleached sample AX2 caused a higher reduction of crystallinity, although the sorption rates were higher for the unbleached sample (AX1). Both AX fractions resulted as well in a reduction of the cellulose  $I_\alpha$  proportion within the BC. The cellulose  $I_\alpha$  values for the BC reference, BC/AX1 and BC/AX2 resemble to literature.<sup>[6]</sup> Again the findings indicate a higher effect for the bleached AX2 sample. Based on these results it might be hypothesized that lignin impurities could favor aggregation and higher sorption rates, which might be preferential on outer surfaces of microfibrils and bundles. On the other hand a lower lignin content might improve incorporation into the structure of BC, due to lower aggregation. Therefore AX2 could exhibit a stronger effect on crystallinity and cellulose  $I_\alpha/I_\beta$  ratio. Additionally the present study demonstrated that the sorption of xylans is strongly dependent on their structure, molar mass and level of impurities. The developed procedure for the production of bleached, water soluble arabinoxylan might be a suitable model for future studies.

- [1] S. Bielecki, A. Krystynowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, in: "Biopolymers: Polysaccharides I: Polysaccharides from prokaryotes", E. Vandamme, S. De Baets, A. Steinbüchel, Eds., Wiley-VCH, Weinheim, FRG, 2002, 37–90.
- [2] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Hohn, *Ang. Chem.* **2005**, *117*, 3422.
- [3] R.M. Brownjr., D. Montezinos, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 143.
- [4] C. Haigler, A. White, R.M. Brown jr., K.M. Cooper, *J. Cell Biol.* **1982**, *94*, 64.
- [5] R. Jonas, L. Farah, *Polym. Degrad. Stabil.* **1998**, *59*, 101.
- [6] C. Tokoh, "Interactions of cellulose produced by Acetobacter xylinum with non-cellulosic plant cell wall polysaccharides", PhD Thesis, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, 2001.
- [7] C. Toko, K. Takabe, J. Sugijama, M. Fujita, *Cellulose* **2002**, *9*, 65.
- [8] A. Kai, T. Koseki, *Chem. Lett.* **1985**, 607.
- [9] K.I. Uhlin, R.H. Atalla, N.S. Thompson, *Cellulose* **1995**, *2*, 129.
- [10] S.E.C. Whitney, J.E. Brigham, A.H. Darke, J.S.G. Reid, M.J. Gidley, *Plant J.* **1995**, *8*, 491.
- [11] T. Iwata, L. Indrarti, J.-I. Azuma, *Cellulose* **1998**, *5*, 215.
- [12] T. Hayashi, M.P.F. Mardsen, D.P. Delmer, *Plant Physiol.* **1987**, *83*, 384.
- [13] H. Yamamoto, F. Horii, A. Hirai, *Cellulose* **1996**, *3*, 229.
- [14] J.M. Hackney, R.H. Atalla, D.L. VanderHart, *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 215.
- [15] R.H. Atalla, J.M. Hackney, I. Uhlin, N.S. Thompson, *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 109.
- [16] R.H. Atalla, in: "Lignin and lignan biosynthesis", N. G. Lewis, S. Sarkany, Eds., ACS Symp. Ser. 697, Washington, DC, 1998, pp. 172.
- [17] N. Carpita, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 445.
- [18] B. Saake, N. Erasmy, T. Kruse, E. Schmekal, J. Puls, in: "Hemicelluloses: Science and technology", P. Gatenholm, M. Tenkanen, Eds., ACS Symp. Ser. 864, Washington, DC, 2004, pp. 52.
- [19] S. Hestrin, M. Schramm, *Biochem. J.* **1954**, *58*, 345.
- [20] J.-P. Touzel, B. Chabbert, B. Monties, P. Debeire, B. Cathala, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 981.
- [21] J. Puls, K. Poutanen, H.-U. Körner, L. Viikari, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*, 416.
- [22] M. Sinner, J. Puls, *J. Chromatogr.* **1978**, *156*, 197.
- [23] A. Teleman, V. Hajunpaa, M. Tenkanen, J. Buchert, T. Hausalo, T. Drakenberg, T. Vuorinen, *Carbohydr. Res.* **1995**, *272*, 55.
- [24] B. Saake, T. Kruse, J. Puls, *Bioresour. Technol.* **2001**, *80*, 195.
- [25] Z. Grubisic, P. Rempp, H. Benoit, *Polymer Letters* **1967**, *5*, 753.
- [26] R. O'Connor, E.D. Pré, D. Mitcham, *Text. Res. J.* **1958**, *382*.
- [27] M. Nelson, R. O'Connor, *J. Appl. Polym. Sci.* **1964**, *8*, 1325.
- [28] S.H.D. Hulleman, J.M. van Hazendonk, J.E.G. van Dam, in: "Cellulose and cellulose derivates: Physico-chemical aspects and industrial applications", J.F. Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams, Eds., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 1995, pp. 63.
- [29] Tappi test method T222-om98, Tappi Press, Atlanta, GA, 1998.
- [30] Tappi test method T236-om99, Tappi Press, Atlanta, GA, 1999.
- [31] H. Winter, "Wechselwirkungen von Arabinoxylan mit Bakterienzellulose und Dehydrierungspolymerat", Master Thesis, University of Hamburg, Hamburg, 2005.
- [32] A. Linder, R. Bergman, A. Bodin, P. Gatenholm, *Langmuir* **2003**, *19*, 5072.
- [33] M. Seifert, S. Hesse, V. Kabreljan, D. Klemm, J. Polym. Sci. Part A **2004**, *42*, 463.
- [34] M. Wada, T. Okano, *Cellulose* **2001**, *8*, 183.
- [35] N. Hayashi, T. Kondo, M. Ishihara, *Carbohydr. Polym.* **2005**, *61*, 191.



# Bibliographie



## BIBLIOGRAPHIE

- [1]Billa, A.; Tollier, M. T.; Monties, B. Characterization of the Monomeric composition of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *Journal of Science and Food Agriculture.* **1996**, 72, 250.
- [2]Nimz, H.; Robert, D.; Faix, O.; Nemr, M. Carbon-13 NMR Spectra of Lignins, 8 : Structural Differences Between Lignins of Hardwoods, Softwoods, Grasses and Compression Wood. *Holzforschung.* **1981**, 35, 16.
- [3]Lapierre, C., *Application of New Methods for the Investigation of Lignin Structure*, in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J., Editors. **1993**, American Society of Agronomy: Madison. pp. 133-163.
- [4]Billa, E.; Monties, B. Structural variability of lignins and associated phenolic acids in wheat straw. *Cellulose Chemistry and Technology.* **1995**, 29, 305.
- [5]Hartley, R. D.; Harris, P. J. Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochemicals Systematics and ecology.* **1981**, 9, 189.
- [6]Chesson, A., *Mechanistic Models of Forage Cell Wall*, in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Jung, H.G.;Buxton, D.R.;Hatfield, R.D.;Ralph, J., Editors. **1993**, American Society of Agronomy: Madison. pp. 347-395.
- [7]Goring, D. A. I. A speculative picture of the delignification process. *ASC Symp. Series*, 1977, Vol N298, pp 273-277.
- [8]Salmen, L.; Olsson, A. M. Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: Structure-property relationships. *Journal of Pulp and Paper Science.* **1998**, 24, 99
- [9]Aman, P., *Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages.*, in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Jung, H.G.;Buxton, D.R.;Hatfield, R.D.;Ralph, J., Editors. **1993**, American Society of Agronomy: Madison pp 183-196.
- [10]Hafren, J.; Fujino, T.; Itoh, T. Changes in cell wall architecture of differentiating tracheids of *Pinus thunbergii* during lignification. *Plant Cell Physiology.* **1999**, 40, 532.
- [11]Jarvis, M. C.; Mccann, M. C. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: Concepts and methodology. *Plant Physiology and Biochemistry.* **2000**, 38, 1.
- [12]Esau, K. Anatomy of seed plant. Second eds. **1977** (J. Wiley and sons) pp. 1-500, New York.
- [13] Chanzy, H., *Aspects of cellulose structure*. in *Cellulose source and exploitation Kennedy JF, Pillips GO, Williams PA (eds)..* **1990**, Ellis Horwood Limited, New York pp 3-12.

- [14]Marx-Figini, M. Kinetics of biosynthesis of cellulose in higher plants. *Journal of Polymer Science, Polymer Symposia*. **1967**, 16, 1947.
- [15]Sugiyama, J.; Persson, J.; Chanzy, H. Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. *Macromolecules*. **1991**, 24, 2461.
- [16]Nishiyama, Y.; Langan, P.; Chanzy, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*. **2002**, 124, 9074.
- [17]Nishiyama, Y.; Kim, U. J.; Kim, D. Y.; Katsumata, K. S.; May, R. P.; Langan, P. Periodic disorder along ramie cellulose microfibrils. *Biomacromolecules*. **2003**, 4, 1013.
- [18]Atalla, R. H.; Vanderhart, D. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*. **1984**, 223,
- [19]Yamamoto, H.; Horii, F.; Hirai, A. In situ crystallization of bacterial cellulose .2. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I-alpha and I-beta at the early stage of incubation. *Cellulose*. **1996**, 3, 229.
- [20]Schols, H. A.; Vierhuis, E.; Bakx, E. J.; Voragen, A. G. J. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls\*1. *Carbohydrate Research*. **1995**, 275, 343.
- [21]Vincken, J. P.; Schols, H. A.; Oomen, R.; Mccann, M. C.; Ulvskov, P.; Voragen, A. G. J.; Visser, R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*. **2003**, 132, 1781.
- [22]Carpita, N.; Gibeaut, D. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. **1993**, 3, 1.
- [23]Chambat, G.; Barnoud, F.; Joseleau, J. P. Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca* Cells. *Plant Physiology*. **1984**, 74, 687.
- [24]Hayashi, K.; Mardsen, M.; Delmar, D. Pea xyloglucan and cellulose: xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiology*. **1987**, 83, 384.
- [25]Mcneil, M.; Albersheim, P.; Taiz, L.; Jones, R. The structure of plant cell walls. *Plant Physiology*. **1975**, 55, 64.
- [26]Carpita, N. Structure and Biogenesis of the Cell Walls of Grasses. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **1996**, 47, 445.
- [27]Buchala, A. J.; Wilkie, K. C. B. Total hemicelluloses from wheat at different stages of growth. *Phytochemistry*. **1973**, 12, 499.

- [28]Ebringerova, A.; Heinze, T. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communication.* **2000**, 21, 542.
- [29]Kacurakova, M.; Wellner, N.; Ebringerova, A.; Hromadkova, Z.; Wilson, R. H.; Belton, P. S. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids.* **1999**, 13, 35.
- [30]Buchala, A. J.; Fraser, C. G.; Wilkie, K. C. B. Quantitative studies on the polysaccharides in the nonendospermic tissues of the oat plant in relation to growth. *Phytochemistry.* **1971**, 10, 1285.
- [31]Wende, G.; Fry, S. C. O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochemistry.* **1997**, 44, 1011.
- [32]Lequart, C.; Nuzillard, J. M.; Kurek, B.; Debeire, P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate Research.* **1999**, 319, 102.
- [33]Teleman, A.; Lundqvist, J.; Tjerneld, F.; Stalbrand, H.; Dahlman, O. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing H-1 and C-13 NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research.* **2000**, 329, 807.
- [34]Robert, P.; Marquis, M.; Barron, C.; Guillon, F.; Saulnier, L. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2005**, 53, 7014.
- [35]Chanliaud, E.; Saulnier, L.; Thibault, J. F. Alkaline extraction and characterization of heteroxylans from maize bran. *Journal of Cereal Science.* **1995**, 21, 195.
- [36]Saulnier, L.; Chanliaud, E.; Thibault, J. F. Extraction, structure and functional properties of maize bran heteroxylans. *Zuckerindustrie.* **1997**, 122, 129.
- [37]Dervilly-Pinel, G.; Tran, V.; Saulnier, L. Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour. *Carbohydrate Polymers.* **2004**, 55, 171.
- [38]Saulnier, L.; Marot, C.; Chanliaud, E.; Thibault, J. F. Cell-Wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers.* **1995**, 26, 279.
- [39]Ebringerova, A.; Hromadkova, Z.; Burchard, W.; Dolega, R.; Vorwerg, W. Solution properties of water-insoluble rye-bran arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers.* **1994**, 24, 161.
- [40]Izydorczyk, M. S.; Biliaderis, C. G. Cereal arabinoxylans:advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers.* **1995**, 28, 33.

- [41]Fry, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*. **1986**, 37, 165.
- [42]Wallace, G.; Russel, T.; Lomax, J., A.; Jarvis, M.; Lapierre, C.; Chesson, A. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell wall. *Carbohydrate Research*. **1995**, 272, 41.
- [43]Wallace, G.; Fry, S. C. Action of diverse peroxidases and laccases on six wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 769.
- [44]Ralph, J.; Quideau, S.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. H. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction 1*. **1994**, 3845.
- [45]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.
- [46]Carvajal-Millan, E.; Landillon, V.; Morel, M.-H.; Rouau, X.; Doublier, J.-L.; Micard, V. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*. **2005**, 6, 309.
- [47]Rouau, X.; Cheynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudec, E.; Louis-Montero, J.; Criton, M. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*. **2003**, 63, 899.
- [48]Grabber, J. H.; Hatfielld, R. D.; Ralph, J.; Zon, J.; Amrhein, N. Ferulate cross linking in cell walls isolated from maize cell suspension. *Phytochemistry*. **1995**, 40, 1077.
- [49]Carvajal-Millan, E.; Guilbert, S.; Doublier, J. L.; Micard, V. Arabinoxylan/protein gels: Structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*. **2006**, 20, 53.
- [50]Fry, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*. **2004**, 161, 641.
- [51]Chesson, A.; Gardner, P. T.; Wood, T. J. 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.
- [52]Chesson, A.; Provan, G. J.; Russel, W.; Scobbie, L.; Chabbert, B.; Monties, B. Characterization of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1997**, 73, 10.
- [53]Waldron, K. W.; Smith, A. C.; Parr, A. J.; Ng, A.; Parker, M. L. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science & Technology*. **1997**, 8, 213.

- [54]Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 6106.
- [55]Grabber, J.; Ralph, J.; Hatfield, R. Model studies of ferulate-coniferyl-alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in Grasses. *Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 6008.
- [56]Monties, B.; Fukushima, K., *Occurrence, Function and Biosynthesis of Lignins*, in *Biopolymers*. 2001.
- [57]Boudet, A.-M. Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*. **2000**, 38, 81.
- [58]Sarkanen, K. V., *Precursors and their polymerization*, in *Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reaction*, Sarkanen K. V.;Ludwig G. H., Editors. 1971: New-York. p. 95.
- [59]Freudenberg, K.; Neish, A., *Biosynthesis of Lignin*. Springer ed. 1968, Berlin.
- [60]He, L.; Terashima, N. Formation and strcuture of lignin in monocotyledons II. *Mokkuzai Gakkaishi*. **1989**, 35, 123.
- [61]He, L.; Terashima, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons I. Selective labelling of the strutural units of lignin in rice plant (*Oryza sativa*) with <sup>3</sup>H and vizualization of their distribution in the tissue by microautiradiography. *Mokkuzai Gakkaishi*. **1989**, 35, 116.
- [62]Scalbert, A.; Monties, B.; Lallemand, J.-Y.; Guittet, E.; Rolando, C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*. **1985**, 24, 1359.
- [63]Lam, T.B.T.; Iiyama, K.; Stone, B. Distribution of free and combined phenolic acid in wheat straw internodes. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 468.
- [64]Shimada, M.; Fukuzada, T.; Higuchi, T. Ester linkages of p-Coumaric acid in bamboo and grass lignins. *Tappi*. **1971**, 54,
- [65]Ralph, J.; Hatfield, R.; Quideau, S.; Helm, R.; Grabber, J. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society*. **1994**, 116, 9448.
- [66]Morrison, W. H.; Mulder, M. M. Pyrolysis mass spectrometry and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of ester- and ether-linked phenolic acids in coastal bermudagrass cell walls. *Phytochemistry*. **1994**, 35, 1143.
- [67]Hatfield, R.; Vermerris, W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*. **2001**, 126, 1351.

- [68]Monties, B. Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants. *Polymer Degradation and Stability*. **1998**, 59, 53.
- [69]Lapierre, Hétérogénéité des lignines de peupliers:mise en évidence systématique. Thèse **1986**: Paris. p. 305.
- [70]Faix, O.; Schweers, W. Comparative investigations on polymer models of lignins (DHP's) of different composition. 6. Ethanolysis, nitrobenzene oxidation, and hydrogenolysis. *Holzforschung*. **1975**, 29, 48.
- [71]Chan, F. D.;Nguyen, K. L.;Wallis, A. Contribution of lignin sub-structures to nitrobenzene oxidation products. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1995**, 15, 329.
- [72]Faix, O.; Beinhoff, O. FTIR of milled wood lignins and lignin polymer models (DHP's) with enhanced resolution obtained by deconvolution. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1988**, 8, 505.
- [73]Parkas, J.; Paulsson, U.; Westermark, U.; Terashima, N. Solid State NMR Analysis of Beta-13C-Enriched Lignocellulosic Material During Light-Induced Yellowing. *Holzforschung*. **2001**, 55, 276.
- [74]Saake, B.; Argyropoulos, D. S.; Beinhoff, O.; Faix, O. A comparison of lignin polymer models (DHPs) and lignins by  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy. *Phytochemistry*. **1996**, 43, 499.
- [75]Faix, O.; Grunwald, C.; Beinhoff, O. Determinations of phenolic hydroxyl group content of Milled Wood Lignins from different botanical origins Using Selective Aminolysis, FTIR,  $^1\text{H}$ -NMR and UV Spectroscopy. *Holzforschung*. **1992**, 46, 425.
- [76]Ruel, K.; Faix, O.; Joseleau, J. P. New immunogold probes for studying the distribution of the different lignin types during plant cell wall biogenesis. *Journal of Traceur Microprobe Technique*. **1994**, 12, 247.
- [77]Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C. Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterisation of guaiacyl-syringyl lignins fractions. *Holzforschung*. **1986**, 40, 113.
- [78]Jacquet, G., Structure et réactivité des lignines de graminées et des acides phénoliques associés: développement des méthodologies d'investigation, in *Biochimie*. **1997**, Aix-Marseille III: Aix-Marseille. pp. 180.
- [79]Sun, R.; Lawther, J. M.; Banks, W. B. A Tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*. **1997**, 6, 1.
- [80]Adler, E. Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Science and Technology*. **1977**, 11, 169.

- [81]Billa, E.; Monties, B. Molecular variability of lignin fractions isolated from wheat straw. *Research on Chemical Intermediates.* **1995**, 21, 303.
- [82]Terashima, N.; Fukushima, K.; He, L.-F.; Takabe, K., *Comprehensive model of the Lignified Plant Cell Wall*, in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, Jung, H.G.;Buxton, D.R.;Hatfield, R.D.;Ralph, J., Editors. **1993**, American Society of Agronomy: Madison. pp. 247-270.
- [83]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.
- [84]Pan, Y.; Shenouda, N. S.; Wilson, G.; Schaefer, J. Cross-links in cell walls of bacillus subtilis by rotational-echo double-resonance  $^{15}\text{N}$  NMR. *The Journal of Biological Chemistry.* **1993**, 5, 18692.
- [85]Donaldson, L. A. Mechanical constraints on lignin deposition during the lignification. *Wood Science and Technology.* **1994**, 28, 111.
- [86]Saka, S.; Goring, D. A. I. The Distribution of Lignin in White Birch Wood as Determined by Bromination with TEM-EDXA. *Holzforschung.* **1988**, 42, 149.
- [87]Donaldson, L. A. Lignification and lignin topochemistry.an ultrastructural view. *Phytochemistry.* **2001**, 57, 859.
- [88]Houtman, C. J.; Atalla, R. H. Cellulose-lignin interactions. A computational study. *Plant Physiology.* **1995**, 107, 977.
- [89]Helm, R.; Ralph, J. Lignin-Hydroxycinnamyl model compounds related to Forage Cell Wall Structure. 2. Ester-Linked Structures. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* **1993**, 41, 570.
- [90]Atsushi, K.; Azuma, J.; Koshijima, T. Lignin-carbohydrate complexes and phenolic acids in bagasse. *Holzforschung.* **1984**, 38, 141.
- [91]Hartley, R. D. P-coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *Journal of Science and. Food Agriculture.* **1972**, 34, 1347.
- [92]Ishii, T. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science.* **1997**, 111.
- [93]Russell, W. R.; Provan, G. J.; Burkitt, M. J.; Chesson, A. Extent of incorporation of hydroxycinnamaldehydes into lignin in cinnamyl alcohol dehydrogenase-downregulated plants. *Journal of Biotechnology.* **2000**, 79, 73.

- [94]Lam, T. B. T.; Iiyama, K.; Stone, B. A. Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and phalaris during maturation. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 2655.
- [95]Lam, T.B.T.; Iiyama, K.; Stone, B. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionnated cell walls of wheat internodes, *Phytochemistry*. **1994**, 37, 327.
- [96]Ward, G.; Hadar, Y.; Bilkis, I.; Konstantinovsky, L.; Dosoretz, C. G. Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **2001**, 276, 18734.
- [97]Koshijima, T.; Watanabe, T.; Azuma, J. Existence of benzylated carbohydrate moiety in lignin-carbohydrate complex from pine wood. *Chemistry Letters*. **1984**, 1737.
- [98]Koshijima, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, R. Lignin carbohydrate complex. *Holzforschung*. **1972**, 26, 211.
- [99]Koshijima T.; Takahashi N. Molecular properties of lignin-carbohydrate complexes from beech (*Fagus crenata*) and pine (*Pinus densiflora*) woods. *Wood Science and Technology*. **1988**, 22, 177.
- [100]Watanabe, T. Structural studies on the covalent bonds between lignin and carbohydrate in lignin-carbohydrate complexes by selective oxidation with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. *Wood Research*. **1989**, 76, 59.
- [101]Takahashi, N.; Koshijima, T. Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (*Fagus crenata*) wood. *Wood Science and Technology*. **1988**, 22, 231.
- [102]Imamura, T.; Watanabe, T.; Kuwahara, M.; Koshijima, T. Ester Linkages between Lignin and Glucuronic Acid in Lignin-Carbohydrate Complexes from *Fagus Crenata*, *Phytochemistry*. **1994**, 37, 1165.
- [103]Joseleau, J.-P.; Kesraou, R. Glycosidic bonds between lignin and carbohydrates. *Holzforschung*. **1986**, 40, 163.
- [104]Jacquet, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Mhamdi, F.; Rolando, C. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol in grass straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1995**, 43,
- [105]Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Lignin-ferulate cross-links in grass: active incorporation of ferulate polysaccharides esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research*. **1995**, 275, 167.
- [106]Iiyama, K.; Lam, T. B. T., Stone, B.A., Phenolic acids bridges between polysaccharides and lignin in wheat internode. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 733.

- [107]Lam, T. B.T.; Iiyama, K.; Stone, B. A. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 1179.
- [108]Bunzel, M.; Ralph, J.; Bruening, P.; Steinhart, H. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 6409.
- [109]Saulnier, L.; Crepeau, M. J.; Lahaye, M.; Thibault, J. F.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Williamson, G. Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research*. **1999**, 320, 82.
- [110]Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Kuster, T.; Pell, A. N. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, 1453.
- [111]Quideau, S.; Ralph, J. Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4 Incorporation of 5-5' coupled dehydroferulate into synthetic lignin. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction 1*. **1997**, 2351.
- [112]Lam, T. B. T.; Iiyama, K.; Stone, B. A. Cinnamic acids bridges between cell wall polymers in wheat internodes. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 1183.
- [113]Faix, O. Investigation of Lignin Polymer Models (DHP's) by FTIR Spectroscopy. *Holzforschung*. **1986**, 40, 273.
- [114]Faix, O.; Beinhoff, O. FTIR spectra of milled wood lignins and lignin polymer models (DHP's) with enhanced resolution obtained by deconvolution. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1988**, 8, 505.
- [115]Schweers, W.; Faix, O. Polymer models of lignins (DHP's) of different composition. I. Preparation of polymer models of lignins with different ratios of the three monolignols p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, and sinapyl alcohol. *Holzforschung*. **1973**, 27, 208.
- [116]Terashima, N.; Seguchi, Y. Heterogeneity in formation of lignin IX. Factors affecting the formation of condensed structures in lignin. *Cellulose Chemistry and Technology*. **1988**, 22, 147.
- [117]Sarkanen, K. V., *Lignins-Occurrence, Formation, Structure and Reaction*, ed. Sarkanen K. V.; Ludwig G. H. **1971**, New-York.
- [118]Tanahashi, M.; Higushi, T. Dehydrogenative polymerization of monolignols by peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dialysis tube. I. Preparation of highly polymerized DHPs. *Wood Research*. **1981**, 67, 29.
- [119]Tanahashi, T., A.; Higuchi, T. Dehydrogenative polymerization of monolignols by peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dialysis tube. *Holzforschung*. **1982**, 36, 117.

- [120]Jacquet, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Francesh, C.; Rolando, C.; Faix, O. Thioacidolysis of enzymatic dehydrogenation polymers from p-Hydroxyphenyl, Guaiacyl, and Syringyl precursors. *Holzforschung*. **1997**, 51, 349.
- [121]Fournand, D.; Cathala, B.; Lapierre, C. Initial steps of the peroxidase-catalysed polymerisation of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: capillary zone electrophoresis study of pH effect. *Phytochemistry*. **2003**, 62, 139.
- [122]Hemmingson, J.; Leary, G. The Chemistry of Reactive Lignin Intermediates. Part II. Addition Reactions of Vinyl-Substituted Quinone Methides in Aqueous Solution. *Journal of the Chemical Society*. **1975**, 1584.
- [123] Hemmingson, J.; Leary, G. Anew class of linkage between carbohydrates and lignin model compounds. *Journal of the Chemical Society*. **1978**, 3, 92.
- [124]Sipilä, J., On the reactions of quinone methide intermediates during lignin biosynthesis: A study with models compounds. in Department of chemistry. Thèse **1990**, Helsinki: Helsinki.
- [125]Toikka, M.; Sipila, J.; Teleman, A.; Brunow, G. Lignin-carbohydrate model compounds. Formation of lignin methyl arabinoside and lignin methyl galactoside benzyl ethers via quinone methide intermediates. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*. **1998**, 3813.
- [126]Toikka, M.; Brunow, G. Lignin-carbohydrate model compounds. reactivity of Methyl 3-O-(Alpha-L-Arabinofuranosyl)-Beta-D-Xylopyranoside and Methyl Beta-D-Xylopyranoside Towards - Beta-O-4-Quinone Methide. *Journal of Chemical Society-Perkin Transactions 1*. **1999**, 1, 1877.
- [127]Sipilä, J.; Brunow, G. On the mechanism of formation of non-cyclic benzyl ether during lignin biosynthesis. Part 2. The effect of pH on the reaction of  $\beta$ -O-4 type quinone methides with vanillyl alcohol in water-dioxane solution. *Holzforschung*. **1991**, 45, 275.
- [128]Ohnishi, J.; Watanabe, N.; Koshijima, T. Synthesis of dehydrogenation polymer-polyoside complexes by peroxidase. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 1185.
- [129]Terashima, N.; Atalla, R. H.; Ralph, S. A.; Landucci, L. L.; Lapierre, C.; Monties, B. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate Cell wall Lignification. Part 1 Synthesis of novel lignin polymer models and their structural characterization by  $^{13}\text{C}$  NMR. *Holzforschung*. **1995**, 49, 521.
- [130]Terashima, N.; Atalla, R. H.; Ralph, S. A.; Landucci, L. L.; Lapierre, C.; Monties, B. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate Cell wall Lignification part 2. Structural characterisation of the models by thioacidolysis. *Holzforschung*. **1996**, 50, 9.
- [131]Higuchi, T.; Ogino, K.; Tanahashi, M. Effect of polysaccharides on dehydropolymerization of coniferyl alcohol. *Wood Research*. **1971**, 51, 1.

- [132] Tanahashi, M.; Aoki, T.; Higuchi, T. Dehydrogenative polymerization by peroxydase of monolignol by peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dialysis tube III. Formation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs). *Mokuzai Gakkaishi*. **1981**, 27, 116.
- [133] Touzel, J. P.; Chabbert, B.; Monties, B.; Debeire, P.; Cathala, B. Synthesis and characterization of dehydrogenation polymers in Glucunoacetobacter xylinus cellulose and cellulose/pectin composite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 981.
- [134] Cathala, B.; Chabbert, B.; Joly, C.; Dole, P.; Monties, B. Synthesis, characterisation and water sorption properties of pectin-dehydrogenation polymer (Lignin model compound) Complex. *Phytochemistry*. **2001**, 56, 195.
- [135] Cathala, B.; Monties, B. Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). *International Journal of Biological Macromolecules*. **2001**, 29, 45.
- [136] Cathala, B.; Rondeau-Mouro, C.; Lairez, D.; Bedos-Belval, F.; Durand, H.; Gorrichon, L.; Touzel, J. P.; Chabbert, B.; Monties, B. Model systems for the understanding of lignified plant cell wall formation., *Plant Biosystems*. 2005, 139, 93.
- [137] Shigematsu, M.; Goto, A.; Yoshida, S.; Tanashi, M.; Shinoda, Y. Affinities of monolignols and saccharides determined by the solubility method. *Mokuzai Gakkaishi*. **1994**, 40, 321.
- [138] Chioccara, F.; Poli, S.; Rindone, B.; Pilati, T.; Brunow, G.; Pietikäinen, P.; Setälä, H. Regio- and diastereo-selective synthesis of dimeric lignans using oxydative coupling. *Acta Chemistry Scandinavica*. **1993**, 47, 610.
- [139] Tanahashi, M.; Higuchi, T. Effect of hydrophobic regions of hemicelluloses in dehydrogenative polymerization of sinapyl alcohol. *Mokuzai Gakkaishi*. **1990**, 36, 424.
- [140] Lairez, D.; Cathala, B.; Monties, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, D.; Gorrichon, L. On the first steps of lignification : aggregation during coniferyl alcohol polymerisation in pectin solution. *Biomacromolecules*. **2005**, 763.
- [141] Terashima, N.; Awano, T.; Takabe, K.; Yoshida, M. Formation of macromolecular lignin in ginkgo xylem cell walls as observed by field emission scanning electron microscopy. *Comptes Rendus Biologies*. **2004**, 327, 903.
- [142] Cathala, B.; Lee, L. T.; Aguié-Béghin, V.; Douillard, R.; Monties, B. Organization behaviour of Guaiacyl and Guaiacyl/Syringyl dehydrogenation polymers (DHP, lignin model compounds) at the air/water interface. *Langmuir*. **2000**, 16, 10444.
- [143] Inomana, F.; Takabe, K.; Saiki, H. Cell wall formation of conifer tracheid as revealed by rapid-freeze and substitution method. *Journal of electronic microscopy*. **1992**, 41, 369.
- [144] Lehn, J. M., La chimie supramoléculaire : concepts et perspectives. **1997**: De Boeck.

[145]Winter, H.; Barakat, A.; Cathala, B.; Saake, B., Preparation of arabinoxylan and its sorption on bacterial cellulose during cultivation. in *Makromolecular symposium series: Hemicelluloses*, Fisher, K.; Heinze, T., Editors. **2006**, Wiley-VCH. pp. 85.

[146]Cotton, J. P. Small-angle neutron scattering: introduction and variations on contrast. *Journal de Physique IV: Proceedings*. **1999**, 9, 21.

[147]Lairez, D. Introduction à la Diffusion de Neutrons aux Petits Angles. *Journal de Physique IV*. **2003**, 103, 253.

[148]Lairez, D.; Pelta, J. Small-angle diffusion of neutrons: Application to the study of biological macromolecules in solution. *Journal de Physique IV: Proceedings*. **2005**, 130, 39.



**RESUME:** Les lignocelluloses constituent une matière première renouvelable et disponible en grande quantité. L'utilisation de cette ressource végétale à des fins non alimentaires nécessite une meilleure compréhension des événements sous-tendant l'architecture des parois végétales lignifiées, composante principale des biomasses lignocellulosiques. Devant la complexité des phénomènes impliqués *in planta* dans la construction des parois lignifiées, nous avons tenté d'approcher les mécanismes de formation des interactions entre les polymères pariétaux au moyen d'approches modèles chimiques. Dans cet objectif, nous avons examiné l'organisation supramoléculaire d'assemblages lignines-hémicelluloses en focalisant notre approche sur l'étude des propriétés associatives entre les xylanes (hémicelluloses majoritaires de graminées) et des modèles chimiques de lignines, DHPs (DeHydrogenative Polymers) lors de la polymérisation des lignines.

Au sein des parois lignifiées, les xylanes peuvent être reliés aux lignines par des liaisons covalentes *via* l'acide férulique (FA) et/ou *via* la méthylène quinone (MQ). Ce dernier mécanisme a été étudié en synthétisant des DHPs en présence de xylanes non féruloylés. L'analyse du complexe xylane/DHP en chromatographie d'exclusion stérique et spectroscopie RMN a montré que la formation des liaisons covalentes entre les xylanes et les DHPs implique l'arabinose et la MQ. Toutefois la formation des liaisons non covalentes entre ces deux polymères peut influencer et contrôler la formation des associations covalentes. Afin d'examiner l'impact de la densification du milieu sur la réactivité des monomères de lignine, nous avons synthétisé des DHPs à fortes concentrations en présence de teneurs élevées en xylane. Les résultats indiquent que la densification du système a un effet remarquable sur la réactivité du monomère de lignine et par conséquent sur la structure finale des DHP (augmentation des liaisons  $\beta$ -alkyle aryle éther et de la masse molaire). L'impact de l'acide férulique dans l'organisation des assemblages lignine-xylanes a été étudié au cours de la polymérisation des deux principaux monomères de lignine, syringyle (S) et/ou gaïacyle (G) en présence de xylanes féruloylés ou non. Les données obtenues en Diffusion de la Lumière (DL), Chromatographie d'Exclusion Stérique couplée à la Diffusion de Lumière Multi-Angle (CES-DLMA), Microscopie Electronique à Transmission (MET) et Diffusion de Neutrons aux Petits Angles (DNPA) ont mis en évidence que la présence de FA et le type de monomère de lignine S et G affectent la morphologie et l'organisation supramoléculaire des nanoparticules DHP-xylanes.

**Mots clefs:** Graminées, Lignification, xylane, DHP, Acide férulique, nanoparticules.

**ABSTRACT:** Lignocelluloses represent abundant and renewable biomass for which non food use still require an in-depth knowledge of the mechanisms involved in the architecture of lignified plant cell wall as the main lignocellulosic components. Owing to the highly complex mechanisms involved *in planta* in building the lignified cell walls; we attempted to study wall polymer interactions using chemical model systems. To this end, the supramolecular organization of composites made of xylans (as the main hemicelluloses of grass cell walls) and model lignin (DHP, DeHydrogenative Polymers) were investigated along *in vitro* polymerisation of lignin.

In the lignified cell wall, xylans can be covalently linked to lignin *via* ferulic acid (FA) and/or *via* quinone methide (QM). The latter mechanism has been studied during lignin polymerisation in the presence of feruloylated xylan. Size exclusion chromatography (SEC) and NMR analysis of the DHP-xylans complex indicated that arabinose and QM are involved in covalent bonds between xylans and DHP. However, the formation of these linkages can be affected and controlled by non covalent interactions between the two polymers. In order to investigate the impact of the media concentration on the lignin monomer reactivity, highly concentrated DHPs were synthesised in increasing concentrations of xylans. Densification of the system was shown to impact on the monomer reactivity and consequently the DHP structure (increases of  $\beta$ -alkyl aryl ether bonds and of molar mass). The role of FA on xylan-DHP networks was further studied along polymerisation of the main lignin monomers, *i.e.* syringyl (S) and guaiacyl (G) in the presence of xylans with different FA levels. DHP-xylan analysis by Light Scattering (LS), Size exclusion chromatography with online multi-angle laser light scattering (SEC-MALLS), Transmission electron microscopy (TEM), and Small Angles Neutron Scattering (SANS) showed that both FA and the type of lignin monomer (S and/or G) have a clear impact on the morphology and supramolecular organization of DHP-xylan nanoparticules.

**Keywords:** Graminaceous, Lignification, xylan, DHP, Ferulic acid, nanoparticules.