

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Université Sciences et Technologies de Lille 1

Spécialité : Ingénierie des fonctions biologiques

présentée et soutenue publiquement par

**Stéphanie ARNOULT**

le 29 septembre 2014

## Contribution à la définition d'idéotypes de miscanthus valorisables pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération et perspectives en sélection

Directrice de thèse : **Maryse BRANCOURT-HULMEL**

### Jury

<b>Mme Iris LEWANDOWSKI</b>	Professeur, Université de Hohenheim, Allemagne	Rapporteur
<b>M. Herman HÖFTE</b>	Directeur de Recherche, INRA IJPB, Versailles-Grignon	Rapporteur
<b>Mme Catherine BASTIEN</b>	Directrice de Recherche, INRA UR AGPF, Orléans	Examinateuse
<b>M. Hubert BOIZARD</b>	Ingénieur de Recherche, INRA UR AgroImpact, Laon-Mons	Examinateur
<b>M. Simon HAWKINS</b>	Professeur, Université des Sciences et Technologies de Lille	Examinateur
<b>M. Frédéric MARTEL</b>	Directeur de Procéthol 2G, Pomacle	Examinateur
<b>Mme Maryse BRANCOURT-HULMEL</b>	Directrice de Recherche, INRA UR AgroImpact, Laon-Mons	Directrice de thèse



## Remerciements

*Trois années de thèse...*

*La thèse, une envie qui a longtemps trotté dans ma tête,*

*Jusqu'au jour où j'ai décidé de me lancer...*

*Trois années dont on ne peut s'imaginer le déroulement avant de commencer...*

*Trois années qui ont été uniques, fertiles, et enrichissantes*

*d'un point de vue scientifique mais également humain.*

*Un véritable défi, une véritable aventure, dont on ressort grandi.*

Je suis persuadée que je n'aurai jamais été toute seule au bout de cette aventure ; alors, en cette phase finale, il est temps de remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA, l'« ex » UMR SADV, l'UR AgroImpact et l'UE GCIE (anciennes et nouvelles versions), pour m'avoir permis de réaliser ce travail en parallèle de mes activités d'Ingénieur d'Etudes. Je dois dire que de gérer les deux de front n'a pas été une mince affaire, d'autant plus quand le site se restructure. Mais vous me connaissez, je ne sais pas faire simple et je ne suis pas de ceux qui laissent tomber.... Je remercie également les membres du projet FUTUROL, dans lequel s'inscrit cette thèse, pour m'avoir confié la réalisation de ce travail, ainsi que l'organisme OSEO, en tant que financeur de ce travail.

Je voudrais remercier Maryse Brancourt qui a assuré la direction de cette thèse en me laissant la liberté nécessaire pour que je m'approprie ce travail, et pour que je puisse raconter mon histoire. Je remercie également les membres de mon comité de thèse qui ont toujours répondu présents pour me guider dans ce travail par le biais de leurs questions, leurs remarques, ou leurs conseils toujours pertinents : Catherine Bastien, Hubert Boizard, Brigitte Chabbert, Jacques Le Gouis, Claude-Narcisse Niamba, Marie-Christine Quillet, et Matthieu Reymond. Je retiendrai particulièrement la richesse des discussions pluridisciplinaires que nous avons eues ensemble, qui, certes, m'ont fait beaucoup réfléchir (peut-être un peu trop parfois...), mais qui m'ont toujours fait énormément progresser.

Je tiens également à remercier les chercheurs et ingénieurs du site d'Estrées-Mons, ainsi que ceux du site de Laon que j'ai croisés lors des réunions chercheurs d'AgroImpact, pour leurs précieux conseils et leurs critiques toujours constructives qui ont permis de faire évoluer ce travail.

Cette thèse n'aurait jamais existé sans expérimentation au champ. Alors je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui ont participé aux notations ou aux récoltes des essais : Marie-Chantal Mansard pour ses précieux conseils sur les protocoles, sa rigueur dans les notations, et sa mémoire infaillible (une vraie bible ambulante !) ; Annabelle Obeuf et Linda Béthencourt pour la prise en charge du pilotage des expérimentations de mains de maître pendant une partie de ma thèse ; Camille Dauchy et Emeline Rosiau pour leur aide lors des récoltes ; Benoit Decaux pour ses précieux conseils afin d'améliorer le chantier de récolte en toute sécurité ; Un merci particulier à Didier Laude, « toujours à notre service », surtout pour les problèmes mécaniques ! ; Sans oublier les membres de l'Unité Expérimentale qui ont assuré l'entretien des essais.

Je tiens également à remercier Jean-Paul Charpentier pour m'avoir dévoilé tous les secrets du NIRS ; Merci également à Brieuc Lecart, un stagiaire hors-pair, pour la mise au point des scripts sous R sans lesquels les courbes de calibration n'auraient jamais vu le jour ! Un merci tout particulier à Vincent Segura pour sa disponibilité et son aide sur le sujet épineux des analyses statistiques : grâce à lui, les modèles en données répétées n'ont aujourd'hui plus de secret pour moi !

Un grand merci également à ceux qui ont toujours été disponibles pour m'écouter, pour échanger, et pour répondre à mes questions existentielles (et Dieu sait si j'en ai...), que ce soit lors de conversations au détour d'un couloir, ou pendant notre pause de midi. Je n'oublie pas non plus ceux qui ont relu mes innombrables versions des différents chapitres.

Un merci tout particulier à Isabelle Lejeune-Hénaut pour sa disponibilité, son écoute, et nos discussions de fin de journée (ou devrais-je dire de soirée) sur des sujets vastes et variés, qui m'ont toujours apporté le petit quelque chose qui me manquait. Je tiens également à remercier particulièrement Marion Zapater pour ses encouragements et surtout, pour ses précieux conseils sur la gestion des derniers mois de thèse ou, je dirai plutôt, l'art de trouver un équilibre entre les moments d'inspiration, de panne d'inspiration, la fatigue, et les (quelques) pauses... S'il y a quelque chose que je retiendrai, c'est que les meilleures idées viennent toujours au moment où l'on fait autre chose !

Je ne peux, bien sûr, pas oublier Martine Thomas, ma « deuxième maman », qui a toujours su trouver les mots pour me remonter le moral et m'encourager, sans jamais douter de ma réussite.

Un clin d'œil particulier à Marie-Françoise Marchand, Odile Pichereau, Anne Latrille, et Jean Kallerhoff pour avoir cru en moi et pour m'avoir poussée à aller toujours plus loin !

Et les moments de détente dans tout ça ? J'avoue avoir eu beaucoup de mal à faire des breaks, surtout dans la dernière ligne droite.... Je peux aujourd'hui vous dire que c'est essentiel pour

l'équilibre d'un thésard (et, en ce qui me concerne, pour éviter de m'énerver devant mon ordinateur...). Alors un grand merci à toute la bande du club d'aïkido qui m'a permis de décompresser sur le tatami ; un merci particulier à Sylvain, Mallaury, Jonathan, et Cécile qui ont su me faire sortir de mes réflexions sans fin avec leurs soirées détentes organisées rien que pour moi. Sans oublier Jennifer et François-Xavier, toujours dispos pour partager un moment quand ils étaient de passage !

Un immense merci à mes proches, sans qui je n'aurai jamais été jusqu'au bout de ce travail ; mes parents, qui m'ont toujours épaulée dans les différentes aventures j'ai entreprises, au cours des défis que je me suis lancés, dans les bons comme les mauvais moments, et qui, là encore, étaient présents quand il fallait ; mes grands-parents qui pensaient toujours à moi mais qui n'osaient pas me déranger... ; mon frère et mes sœurs qui m'ont toujours soutenue même si l'on ne se voyait pas beaucoup (vive Internet !).

Et pour terminer, je ne trouve pas de mots assez forts pour remercier celui qui a été quotidiennement à mes côtés pendant ces trois années, celui dont le soutien a été sans faille, celui qui a toujours été aux petits soins, celui qui m'a vu « penser thèse », « rêver thèse », « manger thèse », bref, « vivre thèse » du matin au soir et du soir au matin : celui qui est devenu mon mari pendant cette aventure. Il a subi ma mauvaise humeur, mon stress, mes doutes, les soirées et les week-ends de boulot, et j'en passe, sans jamais rien dire (ou presque !). Je lui tire mon chapeau...

*Une belle aventure qui prend fin pour laisser place à la prochaine...*

## Résumé

Face à l'épuisement du pétrole, l'Europe s'oriente vers la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération à partir de biomasse végétale. L'espèce *Miscanthus x giganteus* est prometteuse de par son fort rendement et ses faibles impacts environnementaux. Cependant, sa diversité génétique est faible et sa composition pas forcément optimale pour ce débouché. Cette thèse explore donc différentes espèces de *Miscanthus* pour définir des idéotypes et des pistes en sélection afin d'améliorer le miscanthus pour produire du bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération.

Trois approches ont été menées : une étude bibliographique, une étude expérimentale au champ et des tests en pilote industriel.

L'étude bibliographique montre une forte variabilité environnementale et génotypique pour les caractères associés à la production et à la composition de biomasse. L'analyse des données expérimentales révèle des caractères antagonistes : une forte production de biomasse est associée à de fortes teneurs en cellulose et lignines, mais à de faibles teneurs en hémicelluloses, solubles et cendres. A l'échelle industrielle, la composition de la biomasse détermine l'aptitude différentielle des clones à être transformés en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération.

Enfin, des outils de phénotypage ont été définis : la hauteur de végétation et le volume aérien de la plante permettent de prédire la production de biomasse des stades adultes à partir des stades jeunes. La spectroscopie proche infra-rouge permet également de prédire la composition de la biomasse.

Ce travail contribue à la définition d'idéotypes de miscanthus pour une valorisation en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération en proposant des critères, des outils et des perspectives en sélection.

### ***Mots-clés :***

*Clones de Miscanthus  
Production de biomasse  
Composition de la biomasse  
Relations entre caractères  
Outils de sélection  
Bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération  
Pilote industriel*

## **Summary**

### **Miscanthus feedstock for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol: definition of ideotypes and implications for breeding**

In front of the depletion of oil resources, Europe is moving towards the 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production from plant biomass. The *Miscanthus x giganteus* species is promising due to its high biomass production and its low environmental impacts. However, the genetic diversity of this species is low and its biomass composition is not necessarily optimal for the 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production. This thesis therefore aims to explore several *Miscanthus* species in order to define ideotypes and to propose guidelines to target miscanthus breeding for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production.

It was based on three approaches: a literature review, an experimental field study, and tests in pilot at industrial scale.

The review of literature showed a strong environmental and genotypic variability for traits related to biomass production and composition. Moreover, the experimental data analysis showed antagonisms between the traits of interest: a high biomass production was associated with high cellulose and lignin contents, but low hemicellulose, soluble, and ash contents. At the industrial scale, biomass composition determined the differential ability of the clones to be converted in 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol.

Lastly, breeding tools were defined: canopy height and aboveground plant volume enabled to predict the biomass production of mature crops from early stages. The near infrared spectroscopy also provided accurate prediction of the miscanthus biomass composition.

This contributes to the definition of miscanthus ideotypes for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production by providing selection criteria, breeding tools, and breeding prospects.

### **Keywords:**

*Miscanthus clones*  
*Biomass production*  
*Biomass composition*  
*Relationships between traits*  
*Breeding tools*  
*2<sup>nd</sup>-generation bioethanol*  
*Pilot plant*

## Table des matières

<b>Chapitre 1 : Contexte et enjeux de la thèse .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1       La production d'énergies à partir de ressources renouvelables : une nécessité.....</b>	<b>23</b>
1.1.1   L'approvisionnement énergétique, le changement climatique et l'émission de gaz à effet de serre : de réels enjeux .....	23
1.1.2   Les actions gouvernementales menées à travers le monde pour promouvoir les énergies renouvelables .....	24
<b>1.2       La production de biocarburants.....</b>	<b>26</b>
1.2.1   La biomasse comme ressource énergétique renouvelable .....	26
1.2.2   Les biocarburants de 1 <sup>ère</sup> génération et de 2 <sup>ème</sup> génération .....	27
1.2.3   La production de biocarburants de 2 <sup>ème</sup> génération : des verrous technologiques à lever.....	30
1.2.4   Le projet FUTUROL: vers une production industrielle de bioéthanol 2 <sup>ème</sup> génération en France .....	33
<b>1.3       Le miscanthus, un candidat prometteur pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération .</b>	<b>34</b>
<b>1.4       Les objectifs et la stratégie de recherche de la thèse.....</b>	<b>36</b>
1.4.1   Les objectifs de recherche.....	36
1.4.2   La stratégie de recherche.....	37
1.4.3   L'organisation de la thèse .....	37
<b>1.5       Références bibliographiques .....</b>	<b>41</b>
<b>Chapitre 2 : A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding .....</b>	<b>43</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1       Introduction .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2       Database description and compilation .....</b>	<b>49</b>
<b>2.3       The phenotypic variability for the traits of interest .....</b>	<b>55</b>
2.3.1   The phenotypic variability for aboveground biomass production and biomass components....	55
2.3.2   The phenotypic variability for the traits related to biomass composition .....	67
2.3.3   Key points and conclusions on phenotypic variability for miscanthus biomass production and biomass composition.....	74
<b>2.4       Implications for miscanthus breeding considering the industrial requirements for bioenergy use.....</b>	<b>75</b>
<b>2.5       Prospects.....</b>	<b>79</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>80</b>

<b>References .....</b>	<b>81</b>
<b>Chapitre 3 : Cadre expérimental, matériel et méthodes.....</b> <b>87</b>	
<b>3.1       Caractéristiques pédo-climatiques du site experimental .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2       Description et justification du dispositif expérimental .....</b>	<b>91</b>
3.2.1   Facteurs de variation .....	91
3.2.2   Structure du dispositif.....	94
3.2.3   Conduite de l'essai.....	97
<b>3.3       Evaluation des caractères d'intérêt .....</b>	<b>102</b>
3.3.1   Evaluation des stades phénologiques.....	102
3.3.2   Evaluation de la production de biomasse aérienne.....	103
3.3.3   Evaluation des composantes de la production de biomasse.....	104
3.3.4   Evaluation de la composition de biomasse .....	106
3.3.5   Mise au point d'équations de calibration par spectroscopie proche infra-rouge pour les constituants de la biomasse .....	108
3.3.6   Evaluation des rendements potentiels en cellulose, hémicelluloses, et lignines .....	108
3.3.7   Qualité technologique des clones de miscanthus : aptitude à la transformation en bioéthanol 2 <sup>ème</sup> génération .....	109
<b>3.4       Gestion des données manquantes.....</b>	<b>109</b>
3.4.1   Données manquantes pour certains clones très tardifs qui n'atteignent pas le stade floraison en Picardie .....	109
3.4.2   Données manquantes pour les clones dont les observations n'ont pas toutes été réalisées ..	110
<b>3.5       Analyses statistiques .....</b>	<b>111</b>
<b>3.6       Références bibliographiques .....</b>	<b>114</b>
<b>Chapitre 4 : <i>Miscanthus</i> clones for cellulosic bioethanol production: relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition .....</b> <b>115</b>	
<b>Abstract .....</b>	<b>117</b>
<b>4.1       Introduction .....</b>	<b>118</b>
<b>4.2       Materials and methods .....</b>	<b>120</b>
4.2.1   Experimental site and climatic conditions.....	120
4.2.2   Experimental design .....	121
4.2.3   Management of the trial.....	122
4.2.4   Measurements and observations .....	122
4.2.5   Chemical analyses of the biomass composition .....	125
4.2.6   Statistical analysis.....	127

<b>4.3</b>	<b>Results.....</b>	<b>131</b>
4.3.1	The year or clone mainly affected biomass production traits, while the harvest date mainly impacted biomass composition traits .....	131
4.3.2	High biomass production, height, stem diameter, and late flowering were associated with high cellulose and lignin contents.....	134
4.3.3	The relationships between the biomass production and the biomass composition were consistent over the harvest dates and years .....	136
4.3.4	The variations of the biomass composition were explained by differential contributions of the leaves and stems.....	138
4.3.5	The most productive clones displayed high cellulose and lignin contents but low hemicellulose, soluble, and ash contents .....	141
<b>4.4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>141</b>
4.4.1	Our results can be explained from a physiological viewpoint .....	142
4.4.2	Impact of our results on the production and process of cellulosic ethanol .....	143
4.4.3	Impact on genetic improvement .....	144
<b>4.5</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>146</b>
<b>Acknowledgements.....</b>		<b>146</b>
<b>References .....</b>		<b>147</b>
<b>Supplemental data.....</b>		<b>150</b>
<b>Chapitre 5 : Qualité technologique des clones de miscanthus : aptitude à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération .....</b>		<b>155</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>157</b>
<b>5.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>158</b>
5.2.1	Matériel végétal.....	158
5.2.2	Réalisation des essais au pilote FUTUROL.....	159
5.2.3	Analyses statistiques.....	166
<b>5.3</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>166</b>
5.3.1	Prétraitement.....	166
5.3.2	Hydrolyse enzymatique.....	168
5.3.3	Potentiels et rendements en éthanol .....	172
5.3.4	Situation du miscanthus par rapport à d'autres biomasses potentiellement intéressantes pour la production de bioéthanol 2 <sup>ème</sup> génération.....	175
<b>5.4</b>	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>176</b>
<b>5.5</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>178</b>

<b>Chapitre 6 : Développement d'outils de sélection adaptés au miscanthus dans un objectif de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération .....</b>	<b>179</b>
<b>Chapitre 6-1 : Early prediction of <i>Miscanthus</i> biomass production and composition based on the first six years of cultivation.....</b>	<b>181</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>183</b>
<b>6.1      Introduction .....</b>	<b>184</b>
<b>6.2      Materials and methods .....</b>	<b>186</b>
6.2.1    Experimental site and climatic conditions.....	186
6.2.2    Experimental design .....	186
6.2.3    Trial management.....	188
6.2.4    Measurements and calculations.....	188
6.2.5    Chemical analyses of the biomass composition .....	189
6.2.6    Statistical analysis.....	190
<b>6.3      Results.....</b>	<b>191</b>
6.3.1    Some of the biomass production-related traits increased gradually up to the fourth year, while all of the biomass composition-related traits were consistent throughout the years .....	191
6.3.2    The adult aboveground biomass production and its related traits were well predicted from the younger years of cultivation, in particular from the third year.....	195
6.3.3    The aboveground biomass production and its related traits were highly correlated between the autumn and the winter harvests, particularly from the third year of growth .....	199
6.3.4    The canopy height and aboveground plant volume index were the most reliable predictors of the adult aboveground biomass production, especially from the third year.....	201
6.3.5    The biomass composition-related traits displayed lower and more variable inter-annual correlation coefficients than the aboveground biomass production-related traits.....	204
<b>6.4      Discussion .....</b>	<b>205</b>
6.4.1    The potential to predict biomass production and its related traits in <i>Miscanthus</i> from the young stages of the crop.....	206
6.4.2    Easy-to-measure traits that are related to the biomass production and an index combining several of these traits were reliable predictors of the biomass production .....	206
6.4.3    Breeding implications for the early selection of interesting <i>Miscanthus</i> clones .....	208
<b>6.5      Conclusions .....</b>	<b>209</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>209</b>
<b>References .....</b>	<b>210</b>
<b>Supplemental data.....</b>	<b>212</b>
<b>Chapitre 6-2 : Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus.....</b>	<b>217</b>
<b>6.1      Introduction .....</b>	<b>219</b>

<b>6.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>222</b>
6.2.1	Site expérimental.....	222
6.2.2	Description du dispositif expérimental .....	223
6.2.3	Evaluation de la composition de biomasse aérienne.....	225
6.2.4	Analyses statistiques des données .....	228
<b>6.3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>231</b>
6.3.1	Répartition des individus analysés.....	231
6.3.2	Comparaison des modèles obtenus après transformations mathématiques des spectres bruts.....	231
<b>6.4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>236</b>
6.4.1	Comparaison de la calibration des modèles et de la validation croisée .....	236
6.4.2	Améliorations de la calibration des modèles et de leur qualité de prédiction.....	239
<b>6.5</b>	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>241</b>
<b>6.6</b>	<b>Références .....</b>	<b>242</b>
<b>Chapitre 7 : Conclusions et perspectives .....</b>		<b>245</b>
<b>7.1</b>	<b>Intérêts et limites de la démarche expérimentale adoptée .....</b>	<b>247</b>
7.1.1	Dispositif expérimental .....	247
7.1.2	Caractères étudiés .....	249
<b>7.2</b>	<b>Principaux résultats et acquis : vers la définition d'idéotypes et la proposition de pistes en sélection.....</b>	<b>250</b>
7.2.1	Variabilité existante pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de la biomasse chez le miscanthus.....	250
7.2.2	Relations entre les caractères associés à la production et à la composition de biomasse chez les clones de miscanthus .....	251
7.2.3	Aptitude de différents clones de miscanthus à être transformés au cours du procédé de production de bioéthanol de 2 <sup>ème</sup> génération .....	252
7.2.4	Développement d'outils de phénotypage adaptés au miscanthus.....	253
<b>7.3</b>	<b>Apports et perspectives de la thèse par rapport aux enjeux de la filière bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération .....</b>	<b>254</b>
7.3.1	Enjeux pour la filière bioéthanol de 2 <sup>ème</sup> génération .....	255
7.3.2	Propositions d'idéotypes de miscanthus et de critères de sélection au vu de nos résultats et des enjeux de la filière .....	256
7.3.3	Perspectives en sélection : proposition de stratégies et d'outils de sélection à développer ...	256
<b>Bibliographie.....</b>		<b>261</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>271</b>
<b>Annexe 1 : Suivi des reliquats azotés pendant l'expérimentation.....</b>		<b>273</b>

<b>Annexe 2 : Protocole d'analyse chimique de la composition de la biomasse utilisé par le laboratoire LANO .....</b>	<b>275</b>
<b>Annexe 3 : Spectroscopie proche infra-rouge : corrélations entre les valeurs mesurées par analyses chimiques et les valeurs prédictes pour les différents constituants de la biomasse étudiés chez le miscanthus .....</b>	<b>279</b>

## Liste des figures

### Chapitre 1 : Contexte et enjeux de la thèse

Figure 1-1 : Schéma du procédé de conversion de la biomasse en biocarburant de 1 <sup>ère</sup> génération (IFPEN, 2014) .....	27
Figure 1-2 : Schéma du procédé de conversion de la biomasse en biocarburant de 2 <sup>ème</sup> génération (IFPEN, 2014) .....	29
Figure 1-3 : La structure de la lignocellulose (Rubin, 2008).....	30
Figure 1-4 : Organisation du manuscrit et intégration dans la filière bioéthanol de 2 <sup>ème</sup> génération .....	40

### Chapitre 2 : A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding

Figure 2-1: Phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability in miscanthus for above-ground biomass production (a), canopy height (b), stem number per plant (c), and stem diameter (d) based on the crop age, from the first to third year of cultivation .....	56
Figure 2-2: <i>M. x giganteus</i> above-ground biomass production during the winter harvest for several successive years from Christian et al. (2008), Gauder et al. (2012), and Cadoux et al. (2014).....	58
Figure 2-3: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus biomass production based on the harvest date (autumn and winter harvests) during the second and third years of cultivation .....	61
Figure 2-4: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus biomass production (a), canopy height (b), stem number per plant (c), and stem diameter (d) among and within the three <i>Miscanthus</i> species <i>M. x giganteus</i> , <i>M. sacchariflorus</i> , and <i>M. sinensis</i> for the first three years of cultivation .....	64
Figure 2-5: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus ash content based on the crop age from the first to third year during the winter harvest based on Clifton-Brown and Lewandowski (2002) .....	68
Figure 2-6: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus cellulose content (a), hemicellulose content (b), lignin content (c), and ash content (d) between the autumn and winter harvests during the third year of cultivation.....	69
Figure 2-7: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability in miscanthus among and within the three <i>Miscanthus</i> species <i>M. x giganteus</i> , <i>M. sacchariflorus</i> and <i>M. sinensis</i> for cellulose content (a), hemicellulose content (b), lignin content (c), and ash content (d) in the above-ground biomass during winter harvest in the third year of cultivation.....	71

### Chapitre 3 : Cadre expérimental, matériel et méthodes

Figure 3-1 : Diagrammes ombrothermiques des années (a) 2007 (1 <sup>ère</sup> année de culture), (b) 2008 (2 <sup>ème</sup> année de culture), (c) 2009 (3 <sup>ème</sup> année de culture), (d) 2010 (4 <sup>ème</sup> année de culture), (e) 2011 (5 <sup>ème</sup> année de culture), et (f) 2012 (6 <sup>ème</sup> année de culture) .....	90
--	----

Figure 3-2 : Cycle du miscanthus .....	94
Figure 3-3 : Plan de l'essai .....	96
Figure 3-4 : Schéma de deux parcelles élémentaires (petites parcelles) adjacentes de deux clones différents (en noir, parcelles 1 et 2) entourées de part et d'autre par les deux lignes de bordure (B) du clone <i>M. sinensis</i> Malepartus.....	96
Figure 3-5 : Répartition des prélèvements de sol effectués pour évaluer les quantités de reliquats d'azote minéral pour les dates de prélèvement (a) en individualisant les sous-blocs de février 2007 à mars 2010 inclus et (b) en ne les individualisant pas par la suite, de novembre 2010 à février 2013.....	100
Figure 3-6 : Quantité d'azote minéral total dans le sol sur une profondeur de 0 - 90 cm en sortie d'hiver au démarrage de chaque année de culture et pour chacune des deux modalités de récolte, automnale (histogrammes verts) et hivernale (histogrammes oranges).....	101
Figure 3-7 : Schéma des différentes étapes de la méthode Van Soest .....	107

#### **Chapitre 4 : *Miscanthus* clones for cellulosic bioethanol production: relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**

Figure 4-1: (a) Principal component analysis (PCA) plot of variables that are related to the aboveground biomass production and biomass composition according to the first and the second principal components (PC 1 and PC 2, respectively); (b) Plot illustrating the repartition of the individuals (15 <i>Miscanthus</i> clones) according to PC 1 and PC 2.....	134
Figure 4-2: Relationships between the aboveground biomass production and the cellulose (a-c), hemicellulose (d-f), and lignin (g-i) contents in the total aboveground biomass of miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date.....	137
Figure 4-3: Relationships between the aboveground biomass production and the VS soluble (a-c) and ash (d-f) contents in the total aboveground biomass of miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date.....	137
Figure 4-4: Relationships between the composition of the stems and of the leaves in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date for the cellulose (a-c), hemicellulose (d-f), and lignin (g-i) contents .....	139
Figure 4-5: Relationships between the composition of the stems and of the leaves in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date for the VS soluble (a-c) and ash (d-f) contents.....	139
Figure 4-6: Relationships between the leaf/stem ratio in the autumn harvest and the leaf/stem ratio in the winter harvest in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date.....	140

#### **Chapitre 5 : Qualité technologique des clones de miscanthus : aptitude à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

Figure 5-1 : Etapes du procédé de production de bioéthanol 2 <sup>ème</sup> génération développé au sein du projet FUTUROL (Source : projet FUTUROL, Procéthol 2G).....	159
Figure 5-2 : Technologie d'explosion à la vapeur en continu (Source : Andritz).....	160

Figure 5-3 : Principales analyses réalisées au cours des étapes du procédé testées : le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique .....	162
Figure 5-4 : Relation entre le xylose potentiellement disponible et le xylose libre après le prétraitement pour les 5 clones de miscanthus testés.....	167
Figure 5-5 : Cinétique de rendement en glucose obtenu lors de l'hydrolyse enzymatique pour les 5 clones de miscanthus testés .....	168
Figure 5-6 : Relations entre le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique et les teneurs en (a) lignines, et en (b) cellulose de la biomasse native chez 5 clones de miscanthus testés .....	171
Figure 5-7 : Relation entre le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique et le xylose libre après le prétraitement chez les 5 clones de miscanthus testés.....	171
Figure 5-8 : Relations entre le potentiel en éthanol de la biomasse et les teneurs en (a) lignines, (b) cellulose, et (c) hémicelluloses de la biomasse native (biomasse récoltée) chez les 5 clones de miscanthus testés .....	174

## **Chapitre 6 : Développement d'outils de sélection adaptés au miscanthus dans un objectif de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

### **Chapitre 6-1 : Early prediction of *Miscanthus* biomass production and composition based on the first six years of cultivation**

Figure 6-1: Average aboveground biomass production of 19 <i>Miscanthus</i> clones harvested in autumn and winter of the second to the sixth year of cultivation.....	191
Figure 6-2: Contribution of the individual <i>Miscanthus</i> clones to the inter-annual correlations between the third and fourth years of cultivation (a), the third and fifth years (b), and the third and sixth years (c) for the aboveground biomass production in the winter harvest.....	198
Figure 6-3: Pairwise plots of traits between the aboveground biomass production of the third, fourth, fifth, and sixth years and the aboveground plant volume index of the third year for untransformed (a, b, c, d) and log-transformed (e, f, g, h) data; data collected in the winter harvest.....	202
Figure 6-4: Contribution of the individual <i>Miscanthus</i> clones to the inter-annual correlations between the third and fourth years of cultivation (a), and the third and fifth years of cultivation (b) for the cellulose content observed in the winter harvest.....	205

### **Chapitre 6-2 : Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus**

Figure 6-5 : Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique (d'après Dalibart and Servant (2000)).	220
Figure 6-6 : Principales étapes de la mise au point d'une équation de calibration SPIR (CIRAD) .....	221
Figure 6-7 : Schéma des différentes étapes de la méthode Van Soest .....	226
Figure 6-8 : Représentation du premier minimum local du PRESS .....	229
Figure 6-9 : Analyse en composantes principales des données spectrales des individus de miscanthus en récolte automnale (a) et des individus de miscanthus en récolte hivernale (b) .....	231
Figure 6-10 : Transformations mathématiques des données spectrales des individus de miscanthus en récolte automnale (a,b,c,d,e,f,g,h) et des individus de miscanthus en récolte hivernale (i,j,k,l,m,n,o,p) .....	232

## **Annexes**

Figure A 1-1 : Quantités moyennes de NH<sub>4</sub> et NO<sub>3</sub> restant dans le sol en octobre/novembre et en sortie d'hiver pour chacune des deux modalités de récolte, automnale et hivernale, et pour les années d'expérimentation 1 (2007) à 7 (2013) ..... 274

Figure A 3-1 : Corrélations entre les valeurs mesurées par analyses chimiques et les valeurs prédictes par les modèles sélectionnés pour les teneurs des différents constituants de la biomasse étudiés..... 280

## Liste des tables

### **Chapitre 2 : A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding**

Table 2-1: Description of the scientific references collected for the present review reporting data on above-ground miscanthus biomass production, canopy height, stem number per plant, and stem diameter.....	51
Table 2-2: Description of the scientific references collected for the present review reporting data on the miscanthus biomass composition for the above-ground biomass: cellulose, hemicellulose, lignin, and ash content.....	54
Table 2-3: Summary of the requirements expected in the industry for lignocellulosic crop biomass production and composition for each biomass conversion process to produce bioenergy (a) and <i>Miscanthus</i> species characteristics relevant to biomass production and composition based on the observations in this review (b).	76

### **Chapitre 3 : Cadre expérimental, matériel et méthodes**

Table 3-1 : Températures moyennes et somme des précipitations durant les années d'expérimentation.....	89
Table 3-2 : Présentation des 21 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, et leur provenance .....	92
Table 3-3 : Synthèse des analyses statistiques réalisées au sein des différents chapitres de la thèse avec les détails des variables, des organes de la plante considérés, des facteurs de variation et des modalités de chaque facteur.....	112

### **Chapitre 4 : *Miscanthus* clones for cellulosic bioethanol production: relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**

Table 4-1: Temperature and rainfall that are recorded during the years of experimentation, from 2007 to 2013 .....	120
Table 4-2: Description of the 21 <i>Miscanthus</i> clones that were studied during the experiment, including species, ploidy level, name, code and acquisition .....	121
Table 4-3: List of the studied traits with the details of the years of cultivation, the blocks of the trial, the harvest dates, and the parts of the plant that were used for each trait .....	123
Table 4-4: Linear modeling analyses of repeated data using 21 <i>Miscanthus</i> clones for the aboveground biomass production, its components, and the developmental stages .....	132
Table 4-5: Linear modeling analyses of repeated data using 21 <i>Miscanthus</i> clones for the total aboveground biomass, stems, and leaves composition .....	133

### **Supplemental data**

Table A 4-1: Mean values of each of the 21 <i>Miscanthus</i> clones tested at two harvest dates over three years for the aboveground biomass production, its components, and developmental stages.....	150
--	-----

Table A 4-2: Mean values of each of the 21 <i>Miscanthus</i> clones tested at two harvest dates over three years for the total aboveground biomass composition.....	152
---	-----

## **Chapitre 5 : Qualité technologique des clones de miscanthus : aptitude à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

Table 5-1 : Description des 5 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, leur rendement et leur composition de biomasse à la récolte (février 2014) ..	158
Table 5-2: Xylose potentiellement disponible et libre après l'étape de prétraitement chez les 5 clones de miscanthus testés .....	166
Table 5-3 : Glucose cellulosique potentiellement disponible après l'étape de prétraitement chez les 5 clones de miscanthus testés au regard de la cellulose contenue dans la biomasse native .....	167
Table 5-4 : Rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique chez les 5 clones de miscanthus testés .....	169
Table 5-5 : Potentiels et rendements en éthanol obtenus chez les 5 clones de miscanthus testés .....	172
Table 5-6 : Comparaison de la production d'éthanol à l'hectare du clone de miscanthus « Flo » avec d'autres cultures (Martel, communication personnelle).....	175

## **Chapitre 6 : Développement d'outils de sélection adaptés au miscanthus dans un objectif de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

### **Chapitre 6-1 : Early prediction of *Miscanthus* biomass production and composition based on the first six years of cultivation**

Table 6-1: Description of the 21 <i>Miscanthus</i> clones studied in the experiment, including the species, ploidy level, name, code and acquisition .....	187
Table 6-2: Description of the dataset of the <i>Miscanthus</i> clones grown in Northern France and harvested on two harvest dates (autumn and winter) from the second to the sixth year of cultivation for the traits related to the biomass production (a) and composition (b) .....	193
Table 6-3: Inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation in the winter harvest for the aboveground biomass production (a) and its related traits: the flowering date (b), canopy height (c), stem diameter (d), stem number per plant (e), and aboveground plant volume index (f) of 19 <i>Miscanthus</i> clones .....	197
Table 6-4: Correlations between the two harvest dates, <i>i.e.</i> , the autumn and winter harvest within and between the second, third, fourth, fifth, and sixth year of cultivation for the traits related to the aboveground biomass production from 19 <i>Miscanthus</i> clones: (a) aboveground biomass production, (b) flowering date, (c) canopy height, (d) stem diameter, (e) stem number per plant, and (f) aboveground plant volume index .....	200
Table 6-5: Correlations between the aboveground biomass production (predicted variable) of the second, third, fourth, fifth and sixth years of cultivation using the following predictors: the flowering date, canopy height, stem diameter, stem number, and aboveground plant volume index using untransformed and log-transformation data observed in the second, third, and fourth years of cultivation; these correlations were performed using 19 <i>Miscanthus</i> clones observed during the winter harvest .....	201

Table 6-6: Inter-annual correlations among the third, fourth, and fifth years of cultivation in the winter harvest for the traits related to the biomass composition from 19 <i>Miscanthus</i> clones: (a) the cellulose, (b) hemicellulose, (c) lignin, (d) soluble and (e) ash contents .....	204
---	-----

#### **Supplemental data**

Table A 6-1: Inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation in the autumn harvest for the aboveground biomass production (a) and its related traits: the flowering date (b), canopy height (c), stem diameter (d), stem number per plant (e), and aboveground plant volume index (f) of 19 <i>Miscanthus</i> clones.....	212
--	-----

Table A 6-2: Predictive capability assessed by a cross-validation, which compared the means of the blocks 1 and 3 of the trial (a) and the values of the block 2 of the trial (b): inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation for the aboveground biomass production of 19 <i>Miscanthus</i> clones .....	213
---	-----

Table A 6-3: Correlations between the aboveground biomass production (predicted variable) of the second, third, fourth, fifth and sixth years of cultivation using the following predictors: the flowering date, canopy height, stem diameter, stem number, and aboveground plant volume index using untransformed and log-transformation data observed in the second, third, and fourth years of cultivation; these correlations were performed using 19 <i>Miscanthus</i> clones observed during autumn harvest.....	214
--	-----

Table A 6-4: Inter-annual correlations among the third, fourth, and fifth years of cultivation in the autumn harvest for the traits related to the biomass composition from 19 <i>Miscanthus</i> clones: (a) the cellulose, (b) hemicellulose, (c) lignin, (d) soluble and (e) ash contents.....	215
--	-----

#### ***Chapitre 6-2 : Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus***

Table 6-7 : Présentation des 21 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, et leur provenance .....	223
--	-----

Table 6-8 : Meilleurs modèles obtenus pour la prédiction de la teneur en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles et cendres chez le miscanthus en récoltes automnale (a) et hivernale (b).....	235
--	-----

Table 6-9 : Comparaison de différents paramètres de modèles de calibration obtenus dans notre étude et dans la littérature .....	237
--	-----

## Chapitre 1

### Contexte et enjeux de la thèse



## 1.1 La production d'énergies à partir de ressources renouvelables : une nécessité

### 1.1.1 L'approvisionnement énergétique, le changement climatique et l'émission de gaz à effet de serre : de réels enjeux

On entend couramment parler aujourd’hui de réchauffement climatique, d’augmentation des gaz à effet de serre (GES), ou encore d’épuisement des énergies fossiles (gaz, pétrole, charbon). En effet, depuis ces dernières décennies, le changement climatique, et l’approvisionnement énergétique constituent les enjeux majeurs du XXI<sup>ème</sup> siècle au niveau mondial.

La prise de conscience de la réalité d'un changement climatique d'origine humaine a d'abord été le fait de la communauté scientifique internationale. Elle a été ensuite relayée lors du Sommet de la Terre en 1992 dans le cadre de la Convention Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques (CCNUCC). Cette Convention a reconnu l'effet des activités humaines sur l'augmentation des GES dans l'atmosphère, en particulier le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), le protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), et le méthane (CH<sub>4</sub>). En 2007, le rapport du Groupement Intergouvernemental des Experts sur le Climat (GIEC) met également en avant l'implication de l'augmentation des émissions de GES d'origine anthropique dans le réchauffement climatique observé depuis la moitié du XX<sup>ème</sup> siècle (Pachauri and Reisinger, 2007).

Les émissions de GES sont aujourd’hui en rapide augmentation : en 2013, le niveau de CO<sub>2</sub> présent dans l'atmosphère a dépassé 400 parties par million (ppm) pour la première fois depuis plusieurs centaines de milliers d'années (IEA, 2013). Or il s'avère que la combustion d'énergies, et plus particulièrement d'énergies fossiles, constitue l'une des principales sources d'émission de GES au niveau mondial : avec plus de 80% de la consommation mondiale d'énergie basée sur les combustibles fossiles, le secteur énergétique représente près des deux tiers des émissions de GES (IEA, 2013).

Différentes études et scénarios proposés pour le futur proche (Agence Internationale de l'Energie (AIE), Union Européenne (UE), modèle « POLES 2005 » (Prospective Outlook on Long-term Energy Systems pour POLES)) s'accordent à dire que la demande mondiale en énergie va rester soutenue pour les prochaines décennies, avec une augmentation de l'ordre de 2 à 3 % par an. Cette hausse est associée à l'augmentation modérée mais continue de la population mondiale, mais également, à l'évolution des modes de vie conduisant à une hausse de la demande en énergie. Parallèlement à cette augmentation de demande énergétique mondiale, une diminution voire un épuisement des

stocks d'énergies fossiles, qui, par définition, sont finis, est à prévoir pour les décennies à venir. Au rythme actuel de consommation, le pétrole pourrait arriver à épuisement d'ici une cinquantaine d'années, le gaz naturel conventionnel d'ici un peu plus de 100 ans, et le charbon d'ici 150 à 200 ans, selon les différents scénarios proposés en 2013-2014 par l'Agence Internationale de l'Energie (AIE), l'IFP Energies Nouvelles (IFPEN), ou encore par EDF (Électricité de France). Selon l'AIE, le gaz de schiste s'ajoute à ces ressources et pourrait représenter 4 fois les réserves de gaz naturel conventionnel.

**Pour assurer un approvisionnement énergétique optimal au niveau mondial dans les années à venir, il apparaît aujourd'hui nécessaire de développer des solutions alternatives à l'utilisation de ressources fossiles en développant la production d'énergies à partir de ressources renouvelables moins émettrices de GES et plus respectueuses de l'environnement.**

### **1.1.2 Les actions gouvernementales menées à travers le monde pour promouvoir les énergies renouvelables**

Depuis les années 90, les gouvernements entreprennent régulièrement différentes actions au niveau mondial pour promouvoir la production d'énergies à partir de ressources renouvelables (énergies éolienne et solaire, biomasse,...) : nous pouvons notamment citer le Sommet de la Terre à Rio en 1992, le Protocole de Kyoto en 1997, le Sommet du développement durable à Johannesburg en 2002, ou encore la Conférence des Nations Unies sur le développement durable à Rio en 2012.

Des stratégies basées sur la bioéconomie ont également été développées pour faire face à l'augmentation de la population mondiale, à l'épuisement inéluctable des ressources fossiles, aux pressions environnementales accrues et au changement climatique. Ces stratégies bioéconomiques visent notamment à « faciliter l'avènement d'une société plus innovante, plus économique en ressources, et plus compétitive, qui concilie la sécurité alimentaire et l'utilisation durable des ressources à des fins industrielles tout en garantissant la protection de l'environnement » (Commission Européenne, 2012). Ainsi, les Etats-Unis et l'Europe détaillent les enjeux, les objectifs, et le plan d'action de leurs stratégies bioéconomiques dans deux rapports intitulés respectivement « National Bioeconomy Blueprint » et « L'innovation au service d'une croissance durable : une bioéconomie pour l'Europe » (Commission Européenne, 2012; Office of Science and Technology Policy, 2012).

L'un des enjeux de l'Union Européenne consiste à être moins dépendante des ressources fossiles pour s'affranchir de l'épuisement de ces réserves et de l'instabilité géopolitique des

approvisionnements (Commission Européenne, 2012). Dans ce cadre, la Commission européenne a mis en place plusieurs directives visant à fixer un cadre commun relatif à la production et à la promotion d'énergie à partir de sources renouvelables (directives 2003/30/CE, 2009/28/CE, et 2009/30/CE). A travers ces directives, l'Europe s'est orientée plus particulièrement vers le développement de biocarburants. En effet, le secteur des transports fait partie des secteurs les plus consommateurs d'énergies fossiles, les carburants étant constitués à 98% de pétrole. De plus, le parc de véhicules a augmenté de plus de 60% ces 20 dernières années et les distances parcourues de 70% dans les pays membres de l'OCDE (IEA, 2013). L'Agence Internationale de l'Energie estime également que la demande en pétrole devrait continuer à augmenter du fait notamment d'usages spécifiques difficilement substituables tels que la pétrochimie ou les transports (IEA, 2013). Ainsi, la directive 2009/28/CE se veut d'établir un cadre commun d'utilisation des énergies provenant des sources renouvelables afin de limiter les émissions de GES et de promouvoir un transport plus propre. Cette directive fixe notamment l'objectif d'atteindre une part d'énergie produite à partir de sources renouvelables dans le secteur des transports égale à au moins 10 % de la consommation finale d'énergie dans ce secteur d'ici à 2020 (Journal officiel de l'Union Européenne, JO L 140 du 5.6.2009). La directive 2009/30/CE sur la qualité des carburants fixe, quant à elle, des objectifs de réduction d'émission des GES pour les biocarburants de 60% à partir de 2018 (Journal officiel de l'Union européenne, JO L 140 du 5.6.2009). En 2012, l'Union Européenne a fait de nouvelles propositions d'amendement concernant ces directives. Deux points principaux ont été proposés : (i) la prise en compte de l'origine de la ressource renouvelable de façon différente, selon qu'elle provienne de cultures alimentaires ou non alimentaires, et (ii) une part de biocarburants issus des cultures alimentaires ne dépassant pas 5 % dans les 10 % d'énergies renouvelables à produire dans le secteur des transports d'ici à 2020. Ces propositions devraient être actées d'ici fin 2014.

Le gouvernement français s'est fixé des objectifs plus contraignants par rapport à ceux annoncés dans les précédentes directives au niveau européen en accélérant la mise en œuvre du développement des biocarburants. En France, il faut savoir que le secteur des transports constitue la première source d'émissions de GES avec plus de 138 millions de tonnes d'équivalent CO<sub>2</sub> émises en 2011, soit près de 27% des émissions totales de CO<sub>2</sub> nationales (DGEC, 2013). De plus, les émissions de GES liées au transport et plus particulièrement au transport routier ont connu une forte hausse depuis 1960 : +480% entre 1960 et 2011 et +9% entre 1990 et 2011. Cette hausse s'explique en grande partie par l'augmentation du trafic routier : +716% entre 1960 et 2011 et +31% entre 1990 et 2011 (CITEPA, 2013).

Pour contribuer à atteindre les objectifs fixés d'incorporation d'énergies renouvelables dans les transports, le supercarburant SP95-E10 est commercialisé en France depuis le 1<sup>er</sup> avril 2009. Ce

nouveau carburant présente des caractéristiques similaires au carburant Sans Plomb 95 (SP 95), à l'exception d'une teneur en éthanol qui peut atteindre jusqu'à 10 % en volume d'éthanol, contre moins de 5 % pour le carburant Sans Plomb.

**Pour développer la production d'énergies renouvelables, l'un des enjeux majeurs en France consiste à développer la production de biocarburants.**

## 1.2 La production de biocarburants

### 1.2.1 La biomasse comme ressource énergétique renouvelable

Pendant de nombreuses années, la biomasse, qui désigne l'ensemble de la matière organique d'origine animale et végétale, fut la source d'énergie la plus exploitée par l'homme. Son utilisation remonte à la maîtrise du feu, il y a environ 450 000 ans. Plus tard, lors de la révolution industrielle au XIX<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation du charbon et du pétrole prirent le pas sur l'utilisation de la biomasse. Aujourd'hui, la biomasse connaît un regain d'intérêt dans une optique de valorisation énergétique. En effet, la production d'énergie à partir de la biomasse apparaît comme une solution prometteuse car elle contribue non seulement à l'indépendance énergétique mais aussi à la limitation des émissions de gaz à effet de serre : son bilan carbone est, en théorie, favorable vis à vis de l'effet de serre car le gaz carbonique émis dans l'atmosphère sous forme de CO<sub>2</sub> n'est autre que celui absorbé par la plante lors de sa croissance *via* la photosynthèse. L'utilisation de cette biomasse constitue en outre un nouveau débouché pour l'agriculture et renforce l'image de cette dernière à travers des filières respectueuses de l'environnement.

Ainsi, différents programmes de recherche visant à promouvoir l'utilisation de la biomasse à des fins énergétiques ont été mis en place en France ces dix dernières années. Nous pouvons citer le programme CARTOPAILLES mis en place de 2004 à 2007 et porté par la Fédération Régionale des Coopératives Agricoles de Picardie. L'objectif de ce programme était d'anticiper la demande émergente en biomasse en évaluant la ressource en paille en Picardie ainsi que les conséquences sur la fertilité des sols. Nous pouvons également citer le Programme National de la Recherche pour les Bioénergies (PNRB) mis en place de 2005 à 2007 et financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce programme a ensuite été suivi par le programme Bioénergies (BIO-E), de 2008 à 2011, puis par le programme Bio-Matières et Energies (BIO-ME), de 2012 à 2013, également financés par l'ANR. L'objectif de ces programmes consistait à soutenir des projets sur la biomasse visant notamment à développer des filières de production de biocarburants dits de 2<sup>ème</sup> génération à partir de biomasse. Enfin, plus particulièrement, le projet « Picardie Espèces Ligno-cellulosiques » (PEL), financé par

l'ANR et mis en place en 2007 et 2008, avait pour objectif l'introduction d'espèces valorisant la plante entière pour la production de bioénergie en Picardie, *via* une analyse comparée et une évaluation de la variabilité génotypique. Dans le cadre de ce projet, un dispositif expérimental au champ comprenant 21 clones de miscanthus a notamment été mis en place à l'INRA d'Estrées-Mons. C'est ce dispositif qui a été utilisé pour ce travail de thèse.

### 1.2.2 Les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération et de 2<sup>ème</sup> génération

Deux générations de biocarburants sont actuellement développés, en cours de développement, ou à l'état de recherche : les biocarburants dits de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération.

Les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération sont synthétisés à partir de cultures telles que la canne à sucre, la betterave, les céréales à paille, le colza, le tournesol, le maïs, ou encore le soja. Deux types de carburants sont produits : le biodiesel, synthétisé à partir d'oléagineux (tournesol, colza, soja,...) et l'éthanol, synthétisé à partir de plantes sucrières (betterave, canne à sucre,...) ou de plantes amylacées (maïs, blé,...). Pour la production de biodiesel, l'huile extraite des cultures est transformée en esters d'huiles végétales, aux propriétés voisines de celles des gazoles, pour être utilisée en mélange dans le gazole. L'éthanol, quant à lui, est produit à partir de la fermentation des sucres contenus dans les plantes. Il peut être utilisé pur ou transformé en Ethyl Tertio Butyl Ether (ETBE) pour être mélangé à l'essence. L'ETBE présente l'avantage de pouvoir être mélangé plus facilement et en plus grande quantité à l'essence. La figure 1-1 décrit le procédé de conversion de la biomasse en biocarburant 1<sup>ère</sup> génération.

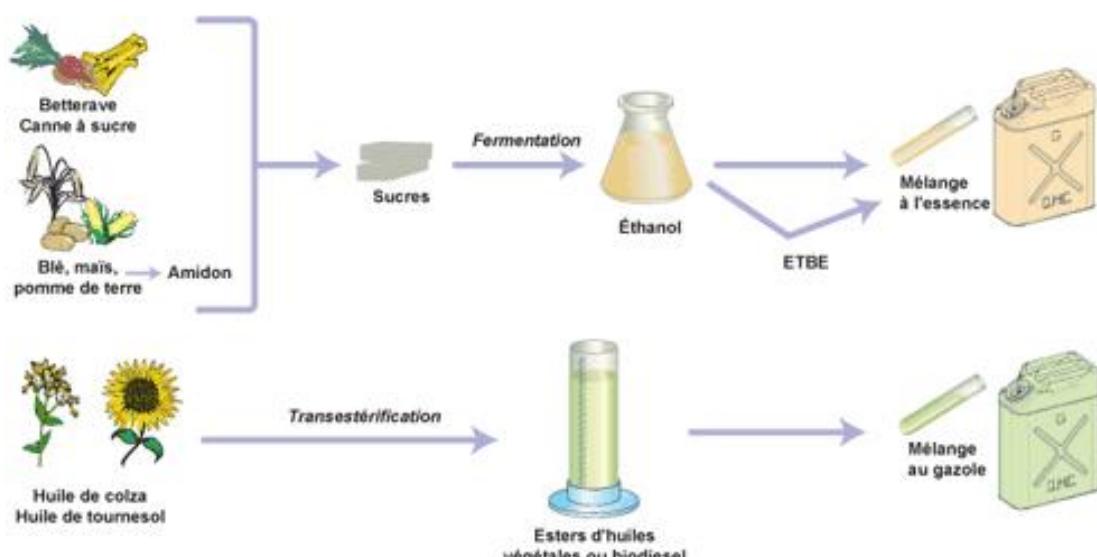


Figure 1-1 : Schéma du procédé de conversion de la biomasse en biocarburant de 1<sup>ère</sup> génération (IFPEN, 2014)

La 1<sup>ère</sup> génération de biocarburants s'appuie essentiellement sur les organes de réserve (graines de céréales ou oléagineux, racines, tubercules) ou les cannes qui sont également utilisés pour l'alimentation humaine. Aujourd'hui, les procédés de fabrication de ces biocarburants 1<sup>ère</sup> génération sont maîtrisés et ils sont produits à l'échelle industrielle.

Cependant, face à la diminution des surfaces agricoles cultivées et à l'accroissement de la population, la production de ces biocarburants 1<sup>ère</sup> génération ne peut qu'être limitée dans la mesure où cet usage entre directement en concurrence avec l'alimentaire. En effet, selon l'IFPEN, en Europe et aux États-Unis, la substitution de 10 % des consommations d'essence et de gazole par les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération nécessiterait de consacrer 20 % à 25 % des terres arables à la production de carburants. De plus, en Europe, on estime que la concurrence avec la production alimentaire pour l'usage des terres agricoles apparaît au-delà d'un seuil d'incorporation de 7 % de biocarburants 1<sup>ère</sup> génération dans les carburants (IFPEN, 2014).

En outre, même s'ils contribuent à l'atténuation des émissions de GES par rapport aux carburants d'origine fossile, ce gain est moindre si l'on prend en compte le changement d'affectation des sols (De Cara et al., 2012; Gabrielle et al., 2014a). Cette concurrence entre usages est donc un point critique pour les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération.

Ainsi, une 2<sup>ème</sup> génération de biocarburants est à l'étude pour pallier ces inconvénients. Cette 2<sup>ème</sup> génération de biocarburants ne se base plus sur une seule partie de la plante pour les cultures à vocation alimentaire mais sur l'ensemble de la plante. On s'intéresse en particulier à la partie lignocellulosique, présente dans la paroi des végétaux, et composée de lignines, de cellulose, et d'hémicelluloses.

Différents types de biomasse peuvent ainsi être valorisés : des déchets agricoles, des résidus forestiers, ou encore des cultures dédiées à la production de biomasse, appelées couramment « cultures dédiées », telles que des cultures annuelles, pluriannuelles, ou encore des arbres à croissance rapide (TCR pour Taillis à Courte Rotation, ou TTCR pour Taillis à Très Courte Rotation).

Les procédés de fabrication de ces biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération concernent à la fois la production de biodiesel et de bioéthanol. Par rapport aux biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération, le biodiesel et le bioéthanol vont être produits avec des technologies différentes et plus élaborées, adaptées au type de biomasse utilisé, qui est différent de celui utilisé pour les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération. Deux types de procédés sont proposés : un procédé thermochimique (ou voie thermochimique) et un procédé biochimique (ou voie biochimique). La voie thermochimique permet d'aboutir, soit à la production d'un gaz de synthèse permettant de produire des hydrocarbures qui pourront être mélangés au gazole, soit à la production de bio-oil puis d'hydrocarbures qui pourront

être mélangés à l'essence ou au gazole. La voie biochimique passe par une fermentation des sucres contenus dans la plante pour produire de l'éthanol qui pourra être mélangé à l'essence (Figure 1-2).

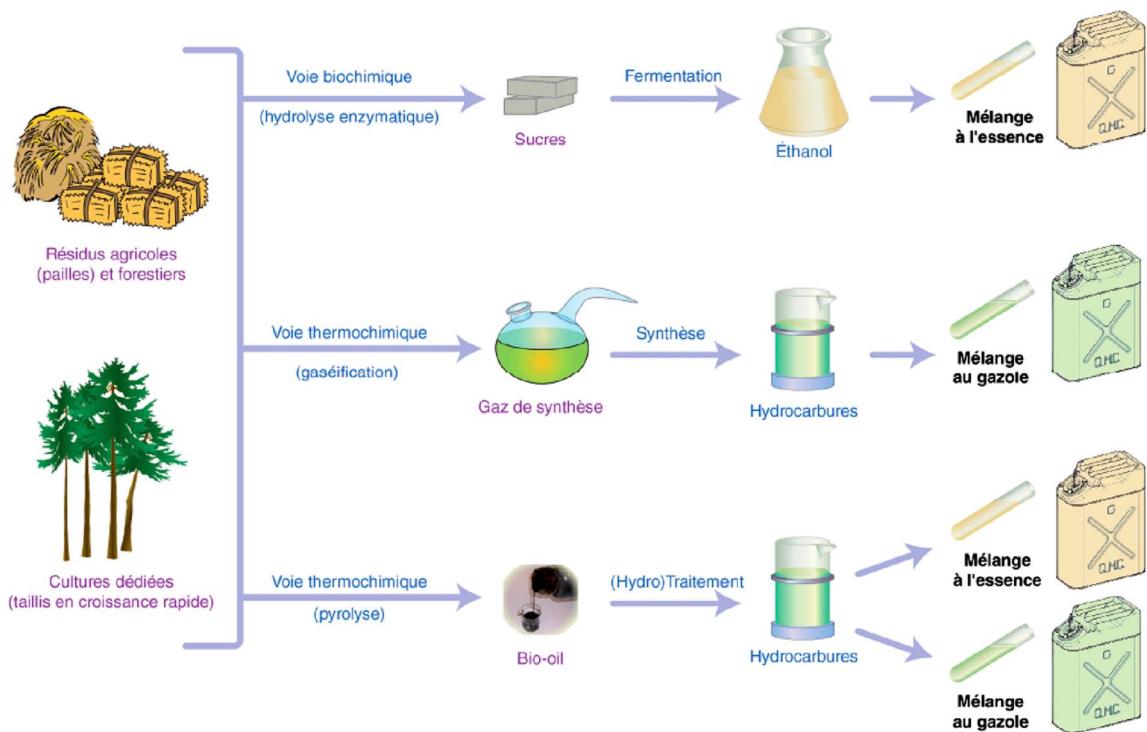


Figure 1-2 : Schéma du procédé de conversion de la biomasse en biocarburant de 2<sup>ème</sup> génération (IFPEN, 2014)

L'avantage de ces biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération par rapport à ceux de la 1<sup>ère</sup> génération réside dans le fait que l'on limite la concurrence d'usages entre alimentaire et non alimentaire en valorisant des parties de plantes non utilisables pour l'alimentaire (résidus agricoles et forestiers), ou en utilisant des plantes dédiées, préconisées pour être implantées dans des zones peu propices pour les cultures à vocation alimentaire. Ces biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération sont également moins émetteurs en GES que les biocarburants de 1<sup>ère</sup> génération et que les carburants classiques (Gabrielle et al., 2014a). Ces atouts, réduction de la compétition avec les cultures à vocation alimentaire et moindre émission de GES, font de cette 2<sup>ème</sup> génération de biocarburants des biocarburants prometteurs.

**Les technologies de transformation de la biomasse, et plus particulièrement de la lignocellulose, sont encore à l'état de recherche pour produire ces biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération. Un certain nombre de verrous technologiques reste encore à lever pour pouvoir proposer une filière de production de biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération qui soit durable et respectueuse de l'environnement.**

### 1.2.3 La production de biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération : des verrous technologiques à lever

Les biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération n'ont pas encore atteint le stade industriel et sont au stade de recherche et développement avec des verrous technologiques forts à lever, en particulier pour la production de biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération par voie biochimique (DGEC, 2010).

La production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération par voie biochimique à partir de la lignocellulose contenue dans la biomasse nécessite quatre étapes successives qu'il faut encore optimiser : une étape de prétraitement de la biomasse, une hydrolyse enzymatique de la biomasse prétraitée, une fermentation alcoolique des sucres extraits de la biomasse, et, une distillation pour récupérer l'alcool produit, ici l'éthanol.

Pour produire du biocarburant de 2<sup>ème</sup> génération par voie biochimique, le challenge réside dans la difficulté à transformer la lignocellulose présente dans la paroi végétale, qui est une structure complexe constituée de trois composants majeurs : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines.

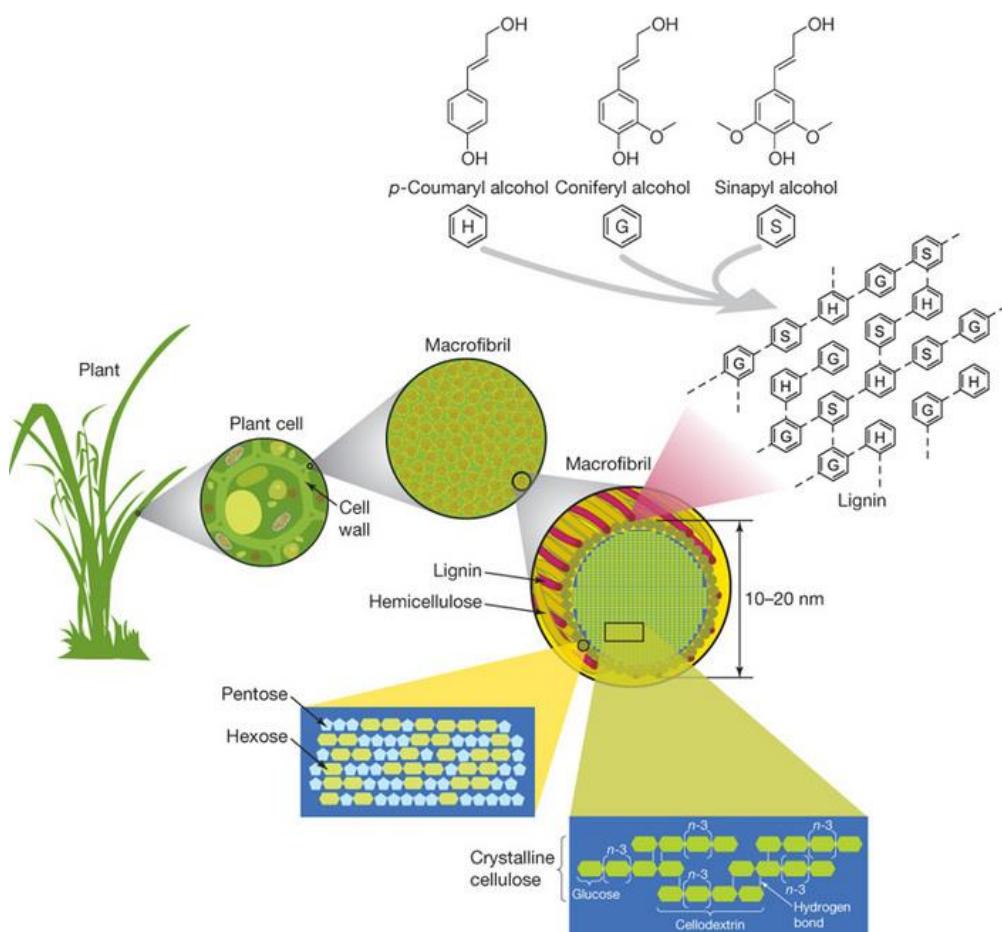


Figure 1-3 : La structure de la lignocellulose (Rubin, 2008)

L'organisation structurelle de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines, ainsi que les teneurs de ces constituants dans la paroi végétale varient selon la biomasse considérée. Au sein du règne végétal, les teneurs peuvent ainsi aller de 15 à 40 % de la matière sèche pour la cellulose, de 20 à 40 % pour les hémicelluloses, et de 10 à 30 % pour les lignines (Colonna, communication personnelle).

Les propriétés physico-chimiques de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines ainsi que leur enchevêtrement dans la paroi végétale de la biomasse lignocellulosique constituent des freins à la transformation :

- La cellulose est un polymère constitué de chaîne de glucoses reliés par des liaisons glucosidiques  $\beta$ -1,4. Les fibrilles de cellulose s'assemblent en macro- et micro-fibrilles reliées par des liaisons hydrogènes pour constituer le squelette de la paroi végétale lui conférant ses propriétés mécaniques (Figure 1-3). L'arrangement des micro-fibrilles peut conférer à la cellulose un fort degré de cristallinité qui pourrait constituer un frein dans l'étape d'hydrolyse enzymatique de la cellulose, cette dernière conduisant à l'obtention de sucres monomères à 6 atomes de carbone (C6) qui seront ensuite fermentés pour produire l'éthanol (Chabbert, communication personnelle).

- Les hémicelluloses sont les constituants de la paroi les plus importants après la cellulose. Ces molécules contribuent au renforcement de la paroi par leur interaction avec la cellulose et la lignine (Figure 1-3). Leur hydrolyse produit des sucres en C5 (à 5 atomes de carbone) et en C6 potentiellement valorisables en tant que sucres fermentescibles pour produire de l'éthanol. Les hémicelluloses présentent cependant l'inconvénient d'être particulièrement insolubles, créant une barrière hydrophobe autour de la cellulose, et rendant ainsi plus difficile l'accès à la cellulose. De plus, lors du prétraitement, la grande sensibilité des unités en C5 des hémicelluloses engendre la production de composés inhibiteurs ou toxiques (tels que l'acide acétique, le furfural ou le 5-hydroxyméthyl-furfural) qui peuvent inhiber l'action des enzymes ou des levures dans les étapes d'hydrolyse et de fermentation (Colonna, communication personnelle).

- Les lignines sont particulièrement complexes. Cette complexité provient de l'association de 3 monolignols (les alcools coumarylique (H), coniférylique (G) et sinapyllique (S)) reliés par différentes liaisons chimiques sans caractère ordonné ni répétitif pour former un polymère amorphe et hydrophobe (Figure 1-3). Elles sont extrêmement résistantes à la dégradation : en formant des liaisons à la fois avec la cellulose et les hémicelluloses, les lignines créent une barrière à toutes les solutions ou enzymes, empêchant ainsi la pénétration des enzymes au sein de la structure lignocellulosique lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique. De plus, les lignines sont sensibles aux températures qui peuvent être mises en œuvre dans le procédé, ce qui peut conduire à la formation de composés très inhibiteurs lors de l'étape de fermentation.

- Enfin, d'autres composés mineurs rentrent dans la composition de la paroi, tels que des éléments minéraux, des sucres solubles, des polyphénols, ou encore des acides phénoliques. Lors du prétraitement, les sucres solubles sont majoritairement dégradés aboutissant parfois à la formation de composés inhibiteurs de la fermentation.

Un des enjeux majeurs de la transformation de la lignocellulose contenue dans la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération consiste donc à rendre accessible la cellulose et les hémicelluloses contenues dans la paroi végétale lors du prétraitement. La complexité de la lignocellulose nécessite également une optimisation des étapes d'hydrolyse et de fermentation pour maximiser l'efficacité du procédé de transformation. Ainsi, lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique, la complexité de la lignocellulose nécessite l'utilisation d'un cocktail enzymatique comportant de nombreuses enzymes pour hydrolyser les polysaccharides jusqu'au stade monomère, C5, ou C6 : à côté des cellulases, utilisées pour hydrolyser la cellulose en sucres C6, le cocktail enzymatique doit comporter d'autres enzymes telles que les xylanases, les xylosidases, les arabinofuranosidases, les mannanases, les galactannases et les carbohydrate estérases, qui sont nécessaires pour dépolymériser tous les polysaccharides (Colonna, communication personnelle). L'inconvénient majeur de cette étape d'hydrolyse est le coût des enzymes : celui des cellulases, mais aussi celui des enzymes précitées. Pour l'étape de fermentation, il s'agit de mettre au point des micro-organismes qui soient les plus efficaces possibles pour fermenter les sucres extraits de la biomasse.

Ainsi, 3 enjeux principaux émergent pour produire de façon efficace des biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération par voie biochimique :

- L'identification de biomasse lignocellulosique possédant une composition adaptée pour le procédé (en particulier pour la cellulose, les hémicelluloses et les lignines),
- La mise au point d'un procédé efficace d'extraction des sucres fermentescibles contenus dans la biomasse permettant de minimiser le coût des enzymes et de maximiser leur efficacité lors de l'étape d'hydrolyse, et,
- L'utilisation de micro-organismes capables de fermenter un maximum de sucres en C5 et en C6 pour améliorer l'étape de fermentation.

### 1.2.4 Le projet FUTUROL : vers une production industrielle de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération en France

Le projet FUTUROL vise à mettre au point et valider un procédé de production d'éthanol par voie biologique, dit de seconde génération, à partir de la lignocellulose issue de coproduits agricoles, forestiers, de résidus ou de cultures dédiées.

Prévu sur 8 ans, le projet vise à mettre en place une installation pilote puis un prototype, parallèlement aux travaux de R&D. L'installation pilote est située sur le site agro-industriel de Pomacle-Bazancourt (Marne). Des procédés, des technologies et des produits seront développés au cours de ce projet. L'unité industrielle, dont la finalisation est prévue pour 2016, devrait avoir une capacité de production comprise entre 50 et 180-200 millions de litres d'éthanol par an (Martel, communication personnelle).

Ce projet s'inscrit dans une démarche de développement durable sur l'ensemble de la chaîne de production, du champ à la roue. Soutenu par OSEO et labellisé par le Pôle de Compétitivité Industries et Agro-Ressources, le projet FUTUROL dispose d'un budget de plus de 76,4 millions d'Euros. Les partenaires du projet (11 leaders des secteurs de la R&D, de l'industrie, et de la finance) se sont associés dans une structure nommée PROCETHOL 2G qui porte plus spécifiquement ce projet.

Les résultats visés sont les suivants :

- Produire de l'éthanol à un prix compétitif grâce à une matière première diversifiée.
- Développer des technologies d'extraction de la cellulose, sélectionner des enzymes et des levures et mettre au point des procédés d'hydrolyse et de fermentation les mieux adaptés.
- Obtenir les meilleurs bilans énergétiques et les plus faibles émissions de GES possibles.
- S'inscrire dans une logique de développement durable tout au long de la filière.

**Le projet FUTUROL devrait ainsi répondre aux enjeux posés et lever les verrous technologiques identifiés pour produire des biocarburants de 2<sup>ème</sup> génération par voie biochimique.**

Ce projet est ainsi divisé en modules selon les différentes étapes du procédé. Ce travail de thèse s'inscrit dans le module « Ressources », qui a pour objectif de proposer des cultures lignocellulosiques qui soient adaptées pour alimenter le procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Il se place en particulier dans une action spécifiquement conduite sur le miscanthus (action R1b).

### 1.3 Le miscanthus, un candidat prometteur pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération

Au vu du contexte actuel, les cultures lignocellulosiques adaptées à un usage bioénergétique, et plus particulièrement ici, à un usage en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, doivent combiner de façon durable :

- (i) une forte production de biomasse à l'hectare afin de maximiser les quantités de cellulose et d'hémicelluloses, et ce pour une gamme variée de pédo-climats,
- (ii) une composition de biomasse adaptée aux procédés industriels de conversion de la biomasse et,
- (iii) une empreinte environnementale positive.

Différentes cultures candidates sont intéressantes pour une valorisation en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération. Outre les résidus de récolte ou les déchets forestiers, plusieurs cultures dédiées sont citées dans la littérature (Karp and Shield, 2008; Sanderson and Adler, 2008; Rabelo et al., 2011; Vermerris, 2011; Cadoux et al., 2014; Dillen et al., 2013; Nissim et al., 2013; Zegada-Lizarazu et al., 2013) :

- des cultures annuelles :
  - en C4 comme le sorgho à fibre (*Sorghum bicolor L.*) ;
  - en C3 comme le triticale (*Triticum sativum*) ou la luzerne (*Medicago sativa*) ;
- des cultures pluriannuelles et pérennes :
  - en C4 comme le miscanthus (*Miscanthus sp.*), le switchgrass (*Panicum virgatum*) ou la canne à sucre (*Saccharum officinarum L.*) ;
  - en C3 telles que le phalaris (*Phalaris arundinacea L.*), la canne de Provence (*Arundo donax L.*), ou encore des arbres à croissance rapide comme le peuplier (*Populus sp.*) ou le saule (*Salix sp.*).

Parmi ces cultures candidates, il s'avère que les cultures en C4, et plus particulièrement les cultures pérennes en C4, sont en général préférables pour une valorisation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération par rapport aux cultures en C3 : ces cultures en C4 sont globalement plus productives et présentent de meilleures efficiencies d'utilisation en azote et en eau que les cultures en C3. Par rapport aux cultures annuelles, les cultures pérennes en C4, notamment le miscanthus et le switchgrass semblent également préférables pour un usage bioénergétique car elles contribuent à de plus faibles impacts sur l'environnement (Cadoux et al., 2014). De plus, ces cultures pérennes

présentent un avantage car elles peuvent être implantées sur des terres à usage non alimentaire où les cultures annuelles ne peuvent produire de façon durable (Wagoner, 1990), ce qui permet de limiter la compétition d'usage des terres entre des cultures à vocation alimentaire et non alimentaire.

Parmi ces cultures pérennes, le miscanthus, et plus particulièrement l'espèce *M. x giganteus*, un hybride triploïde stérile issu d'un croisement entre *M. sacchariflorus* et *M. sinensis* (Hodkinson et al., 2002b), apparaît comme un candidat prometteur pour la production de bioénergies, et plus particulièrement de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération :

- Cette espèce est capable de produire une quantité de biomasse importante avec de faibles exigences en intrants grâce à son rhizome permettant un recyclage efficace des nutriments, en particulier de l'azote (Strullu et al., 2011).
- Cette espèce présente un bilan environnemental particulièrement favorable en termes d'émission de GES (Hastings et al., 2008 ; Cadoux et al., 2014; Drewer et al., 2012).

Cependant, dans l'objectif d'un usage en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération, cette espèce *M. x giganteus* est encore peu connue et peut présenter certains inconvénients :

- Cette espèce, étudiée depuis les années 1990 en Europe, commence à être bien connue en termes de potentialités agronomiques (Christian and Haase, 2001; Clifton-Brown et al., 2001b; Zub and Brancourt-Hulmel, 2010; Cadoux et al., 2014), mais elle est encore peu connue en termes de génétique, d'amélioration des plantes ou encore de composition de sa biomasse. La composition de la biomasse de cette espèce, en particulier sa composition parietale, jusqu'alors beaucoup moins étudiée que sa production de biomasse, nécessite d'être approfondie, et ce, pour pouvoir évaluer son adéquation avec les procédés de transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. De plus, le procédé de transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération n'étant pas encore développé à l'échelle industrielle, on ne connaît pas encore l'aptitude de l'espèce *M. x giganteus* à être transformée à cette échelle par un tel procédé.
- Par ailleurs, cette espèce est actuellement cultivée en France avec un seul clone et dispose d'une très faible diversité génétique ce qui peut être risqué, notamment par rapport à sa sensibilité vis-à-vis des pathogènes (Zub and Brancourt-Hulmel, 2010).
- Enfin, cette espèce n'est pas forcément adaptée à de larges gammes de climats étant donné qu'elle est sensible au gel (Zub et al., 2012a) et au manque d'eau (Cosentino et al., 2007).

Le genre *Miscanthus* regroupe d'autres espèces que l'espèce *M. x giganteus*, environ une vingtaine, qui proviennent de régions géographiques de climats variés (Greef and Deuter, 1993).

Même si ces espèces sont encore peu explorées, plusieurs études montrent le fort potentiel de production de certains clones appartenant à l'espèce *M. x giganteus*, mais également de clones appartenant aux espèces *M. sinensis* et *M. sacchariflorus* (Clifton-Brown et al., 2001a; Clifton-Brown et al., 2001b; Lewandowski and Heinz, 2003; Zub et al., 2011). Quelques études mettent aussi en avant l'importance de caractères associés à la production de biomasse tels que la hauteur de la plante, le nombre de tiges par plante, le diamètre des tiges, ou encore la floraison (Jezowski, 2008; Jezowski et al., 2011; Zub et al., 2011). Enfin, des études récentes mettent en évidence des différences en termes de composition pariétale entre les espèces *M. sinensis*, *M. sacchariflorus*, et *M. x giganteus* (Hodgson et al., 2010b; Allison et al., 2011).

Ces résultats nous laissent penser que d'autres espèces de miscanthus présentent des caractéristiques plus favorables que l'espèce *M. x giganteus* en termes de production et de composition de biomasse pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

## 1.4 Les objectifs et la stratégie de recherche de la thèse

### 1.4.1 Les objectifs de recherche

Les objectifs de cette thèse consistent à proposer des espèces ou variétés de miscanthus adaptées à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, c'est-à-dire, qui produisent une quantité importante de biomasse à l'hectare sous différents types de climats, et, dont la composition de biomasse est adaptée à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Cela permettra (i) d'élargir l'offre variétale à d'autres espèces que *M. x giganteus* pour s'affranchir des risques liés aux pressions des pathogènes et (ii) de développer la filière bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

A travers ce travail de thèse, nous allons donc **explorer d'autres espèces de miscanthus, en plus de l'espèce *M. x giganteus*, afin (i) d'identifier s'il existe des espèces/variétés combinant une forte production de biomasse à l'hectare et une composition de la biomasse adaptée à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, et ce, afin (ii) de proposer des pistes en sélection pour créer des variétés de miscanthus adaptées à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.**

Cette thèse contribuera ainsi (i) à la définition d'idéotypes de miscanthus valorisables pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, c'est-à-dire, de clones combinant des caractères à l'état favorable, et contribuera également (ii) à proposer des perspectives en sélection chez miscanthus pour ce débouché.

### 1.4.2 La stratégie de recherche

Nous développerons une stratégie en 4 points, essentiels pour répondre aux objectifs de cette thèse :

**1** - Nous évaluerons tout d'abord la **variabilité existante au sein du genre *Miscanthus* pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de la biomasse** afin d'explorer les différentes espèces du genre *Miscanthus* et afin de développer des programmes de sélection chez miscanthus.

**2** - Dans un second temps, nous nous attacherons à étudier les **relations entre les caractères associés à la production et à la composition de biomasse chez les clones de miscanthus**, relations qui n'ont pas encore été étudiées mais qui doivent être cependant prises en compte si l'on veut pouvoir développer des espèces et variétés de miscanthus combinant à la fois une forte production de biomasse à l'hectare et une composition adaptée pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

**3** - Par la suite, nous évaluerons également **l'aptitude des clones de miscanthus à la transformation au cours du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération** en cours de développement au sein du projet FUTUROL.

**4** - Enfin, dans l'objectif de développer un programme de sélection de miscanthus pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, nous nous attacherons à **proposer des outils de sélection adaptés au miscanthus**.

### 1.4.3 L'organisation de la thèse

La thèse est organisée en 7 chapitres, dont la présente introduction, en constitue le premier chapitre.

Le second chapitre est dédié à **l'évaluation de la variabilité existante au sein du genre *Miscanthus* pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de la biomasse**. Nous explorons cette variabilité à travers une revue bibliographique par l'analyse de données issues de la littérature concernant ces caractères au sein du genre *Miscanthus*. Plus précisément, nous explorons la variabilité phénotypique pour ces caractères en décomposant cette variabilité en variabilité environnementale et génotypique, et ce, à travers différents facteurs de variation pouvant influencer les caractères d'intérêt. A la lumière de la variabilité génotypique

observée, nous discutons également des conséquences pour l'amélioration du miscanthus dans le cadre de la production de bioénergies, et notamment de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Le troisième chapitre présente le **cadre expérimental, le matériel et les méthodes** utilisées dans la suite de ce travail.

Le quatrième chapitre concerne l'étude des **relations entre les caractères associés à la production et à la composition de biomasse chez les clones de miscanthus**. Cette étude est réalisée à travers les données expérimentales acquises sur le dispositif mis en place pour ce travail (description en chapitre 3). Après avoir décrit la variabilité obtenue pour les caractères associés à la production et à la composition de biomasse au sein des 21 clones de miscanthus implantés sur notre dispositif, nous nous attachons notamment à déterminer, à l'aide d'analyses en composantes principales (ACP) et de corrélations, (i) s'il existe des caractères antagonistes pour la production et la composition de biomasse dont il faudrait tenir compte dans un programme de sélection, (ii) quels caractères privilégier dans une démarche de sélection, et, (iii) quels clones de miscanthus semblent les plus intéressants dans un objectif de sélection pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Le cinquième chapitre de ce travail apporte des éléments concernant **la qualité technologique des clones de miscanthus** et plus particulièrement **leur aptitude à être transformés en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**. Ce chapitre s'attache en particulier à mettre en évidence si des clones de miscanthus contrastés pour leur composition de biomasse se comportent différemment ou non au cours du procédé de transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Pour ce faire, 5 clones, choisis parmi les 21 étudiés dans ce travail comme étant contrastés pour leur composition de biomasse, ont été testés au sein du pilote FUTUROL situé sur le site de Pomacle-Bazancourt. Nous exploitons les résultats de ces essais afin de (i) déterminer s'il existe des différences lors du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération pour les clones testés et afin de (ii) déterminer quels clones semblent les plus adaptés à cette transformation si des différences entre clones sont mises en évidence au cours du procédé. Ces premiers résultats nous permettront également de proposer des pistes pour l'amélioration du miscanthus par l'identification de critères à prendre en compte en sélection pour la conversion de la biomasse de miscanthus en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Le sixième chapitre concerne le **développement d'outils de sélection adaptés au miscanthus** dans un souci de pouvoir **prédire, dès les stades jeunes de la culture, les clones potentiellement intéressants en termes de production et de composition de biomasse pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**. Dans un premier temps, nous étudions les corrélations existantes entre les différentes années d'étude pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la

composition de biomasse, et ce, afin de déterminer si les prédictions dès les stades jeunes de la culture sont possibles. Dans un second temps, nous nous attachons à mettre au point sur miscanthus la technique de spectroscopie proche infra-rouge afin de pouvoir prédire rapidement la composition de biomasse. Cette technique est couramment utilisée sur d'autres cultures pour prédire la composition de la biomasse car elle permet de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons et elle est également plus simple et moins onéreuse que les analyses chimiques classiques. Elle nécessite cependant une mise au point sur miscanthus avec, notamment, l'établissement de courbes de calibration adaptées à cette plante pour chacun des constituants de la biomasse à analyser. Cette étape constitue la première étape essentielle pour pouvoir ensuite prédire de façon fiable et robuste les caractères d'intérêt par cette technique NIRS. Pour établir ces courbes, nous comparons les données de composition de biomasse issues des analyses chimiques classiques et les mesures au spectromètre proche infra-rouge qui ont été réalisées sur plusieurs centaines d'échantillons issus de notre dispositif.

Enfin, le septième chapitre apporte une conclusion générale à ce travail. Ce chapitre amène également des perspectives, notamment en termes de pistes de sélection pour créer de nouvelles variétés de miscanthus adaptées à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Le schéma ci-dessous (Figure 1-4) présente l'organisation du manuscrit intégré dans la filière de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

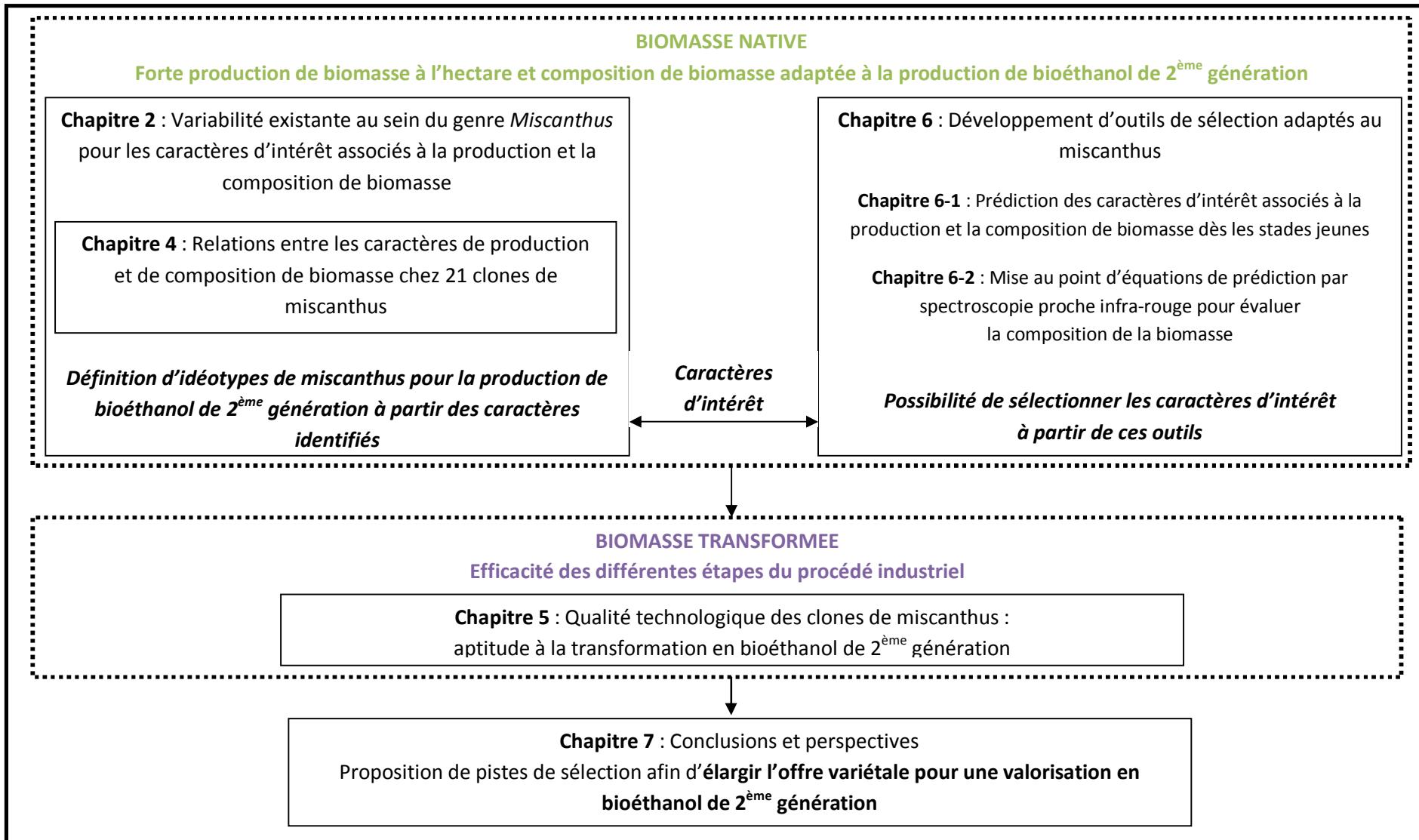


Figure 1-4 : Organisation du manuscrit et intégration dans la filière bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération

## 1.5 Références bibliographiques

- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of Miscanthus. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.-M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., and Mary, B. 2014.** Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6:425-438.
- Christian, D.G., and Haase, E. 2001.** Agronomy of miscanthus, in: Jones, M.B., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 21-45.
- CITEPA, 2013.** Dioxyde de carbone - CO<sub>2</sub>. <http://www.citepa.org/fr/pollution-et-climat/polluants/effet-de-serre/dioxyde-de-carbone> (Access date: 14/04/2014).
- Clifton-Brown, J., Long, S.P., and Jorgensen, U. 2001a.** Miscanthus productivity, in: Jones, M., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 46-67.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Commission Européenne, 2012.** L'innovation au service d'une croissance durable: une bioéconomie pour l'Europe, Communication de la Commission au Parlement Européen, au Conseil, au Comité économique et social Européen et au Comité des régions. 11 p.
- Cosentino, S.L., Patane, C., Sanzone, E., Copani, V., and Foti, S. 2007.** Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25:75-88.
- De Cara, S., Goussebaile, A., Grateau, R., Levert, F., Quemener, J., and Vermont, B. 2012.** Revue critique des études évaluant l'effet des changements d'affectation des sols sur les bilans environnementaux des biocarburants, Rapport final. 96 p.
- DGEC, 2010.** L'industrie des énergies décarbonées en 2010, 1 : Biocarburants, Définitions et technologies. 13 p.
- DGEC, 2013.** Rapport de la France, Au titre du paragraphe 2 de l'article 3 de la décision n°280/2004/CE du Parlement européen et du Conseil du 11 février 2004, Extrait thématique, Actualisation 2013. 16 p.
- Dillen, S.Y., Djomo, S.N., Al Afas, N., Vanbeveren, S., and Ceulemans, R. 2013.** Biomass yield and energy balance of a short-rotation poplar coppice with multiple clones on degraded land during 16 years. *Biomass and Bioenergy* 56:157-165.
- Drewer, J., Finch, J.W., Lloyd, C.R., Baggs, E.M., and Skiba, U. 2012.** How do soil emissions of N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> from perennial bioenergy crops differ from arable annual crops? *Global Change Biology Bioenergy* 4:408-419.
- Gabrielle, B., Gagnaire, N., Massad, R.S., Dufosse, K., and Bessou, C. 2014a.** Environmental assessment of biofuel pathways in Ile de France based on ecosystem modeling. *Bioresource Technology* 152:511-518.
- Greef, J.M., and Deuter, M. 1993.** SYNTAXONOMY OF MISCANTHUS-X-GIGANTEUS GREEF-ET-DEU. *Angewandte Botanik* 67:87-90.
- Hastings, A., Clifton-Brown, J., Wattenbach, M., Stampfl, P., Mitchell, C.P., and Smith, P. 2008.** Potential of Miscanthus grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 28:465-472.
- Hodgson, E.M., Lister, S.J., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J., and Donnison, I.S. 2010.** Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of Miscanthus in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass & Bioenergy* 34:652-660.

- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., and Renvoize, S.A. 2002.** Characterization of a genetic resource collection for Miscanthus (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany* 89:627-636.
- IEA, 2013.** Redrawing the energy-climate map, World Energy Outlook Special Report, Executive Summary.  
[http://www.iea.org/media/freepublications/2013pubs/WEO2013\\_Climate\\_Excerpt\\_ES\\_WEB.pdf](http://www.iea.org/media/freepublications/2013pubs/WEO2013_Climate_Excerpt_ES_WEB.pdf)  
(Access date: 13/04/2014) 8 p.
- IFPEN, 2014.** La fabrication des biocarburants : 3 générations.  
<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/espace-decouverte/les-grands-debats/quel-avenir-pour-les-biocarburants/la-fabrication-des-biocarburants-3-generations> (Access date: 09/03/2014).
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of Miscanthus in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Jezowski, S., Glowacka, K., and Kaczmarek, Z. 2011.** Variation on biomass yield and morphological traits of energy grasses from the genus Miscanthus during the first years of crop establishment. *Biomass & Bioenergy* 35:814-821.
- Karp, A., and Shield, I. 2008.** Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179:15-32.
- Lewandowski, I., and Heinz, A. 2003.** Delayed harvest of miscanthus - influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19:45-63.
- Nissim, W.G., Pitre, F.E., Teodorescu, T.I., and Labrecque, M. 2013.** Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. *Biomass & Bioenergy* 56:361-369.
- Office of Science and Technology Policy, 2012.** National Bioeconomy Blueprint. 48 p.
- Pachauri, R.K., and Reisinger, A. 2007.** Bilan 2007 des changements climatiques, Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. 103 p.
- Rabelo, S.C., Carrere, H., Filho, R.M., and Costa, A.C. 2011.** Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 102:7887-7895.
- Rubin, E.M. 2008.** Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454:841-845.
- Sanderson, M.A., and Adler, P.R. 2008.** Perennial forages as second generation bioenergy crops. *International Journal of Molecular Sciences* 9:768-788.
- Strullu, L., Cadoux, S., Preudhomme, M., Jeuffroy, M.H., and Beaudoin, N. 2011.** Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by Miscanthus x giganteus as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research* 121:381-391.
- Vermerris, W. 2011.** Survey of Genomics Approaches to Improve Bioenergy Traits in Maize, Sorghum and SugarcaneFree Access. *Journal of Integrative Plant Biology* 53:105-119.
- Wagoner, P. 1990.** PERENNIAL GRAIN DEVELOPMENT - PAST EFFORTS AND POTENTIAL FOR THE FUTURE. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9:381-408.
- Zegada-Lizarazu, W., Parrish, D., Berti, M., and Monti, A. 2013.** Dedicated crops for advanced biofuels: Consistent and diverging agronomic points of view between the USA and the EU-27. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 7:715-731.
- Zub, H.W., and Brancourt-Hulmel, M. 2010.** Agronomic and physiological performances of different species of Miscanthus, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30:201-214.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different Miscanthus species at two harvest dates. *Biomass & Bioenergy* 35:637-651.
- Zub, H.W., Arnoult, S., Younous, J., Lejeune-Hénaut, I., and Brancourt-Hulmel, M. 2012a.** The frost tolerance of Miscanthus at the juvenile stage: Differences between clones are influenced by leaf-stage and acclimation. *European Journal of Agronomy* 36:32-40.

## Chapitre 2

# A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding

Stéphanie Arnoult<sup>1, 2</sup> and Maryse Brancourt-Hulmel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1281 SADV, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>2</sup> (Current address) INRA, UE0972 GCIE Picardie, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>3</sup> INRA, UR1158 AgroImpact, Site d'Estrées-Mons, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

### **Keywords:**

*Miscanthus*

*Phenotypic and genotypic variability*

*Biomass production*

*Biomass composition*

*Breeding*

*Bioenergy use*

Ce chapitre a été publié dans le journal *BioEnergy Research*

1-25, DOI 10.1007/s12155-014-9524-7 (2014)



## Abstract

The lignocellulosic C4 perennial crop miscanthus and, more particularly, one of its species, *M. x giganteus*, are especially interesting for bioenergy production because they combine high biomass production with a low environmental impact. However, few varieties are available, which is risky due to disease susceptibility.

Gathering worldwide references, this review shows a high genotypic and environmental variability for traits of interest related to miscanthus biomass production and composition, which may be useful in breeding programs for enhancing the availability of suitable clones for bioenergy production.

The *M. x giganteus* species and certain clones in the *M. sinensis* species seem particularly interesting due to high biomass production per hectare. Although the industrial requirements for biomass composition have not been fully defined for the different bioenergy conversion processes, the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species, which show high lignin contents, appear more suitable for thermochemical conversion processes. In contrast, the *M. sinensis* species and certain *M. x giganteus* clones with low lignin contents were interesting for biochemical conversion processes. The *M. sacchariflorus* species is also interesting as a progenitor for breeding programs, due to its low ash content, which is suitable for the different bioenergy conversion processes. Moreover, mature miscanthus crops harvested in winter seem preferred by industry to enhance efficiency and reduce the expense of the processes.

This investigation on miscanthus can be extrapolated to other monocotyledons and perennial crops, which may be proposed as feedstocks in addition to miscanthus.

## Abbreviations

DM, dry matter

ha, hectare

Gig, *M. x giganteus* species

Sacc, *M. sacchariflorus* species

Sin, *M. sinensis* species

t, ton

## 2.1 Introduction

Currently, climate change and fossil fuel resource depletion are major, global concerns. To limit climate change, reduce greenhouse gas emissions, and replace fossil fuel resources, renewable energy sources must be developed. Many reports have shown that biomass crops are significant contributors as bioenergy sources for heat, electricity, or biofuels production through thermochemical or biochemical processes (IEA/OECD, 2006; ECF, 2010; EREC, 2010; Eurelectric, 2011; Greenpeace, 2013).

Currently, a wide range of crops are biomass production candidates for bioenergy use: perennial C4 crops, such as miscanthus (*Miscanthus*), switchgrass (*Panicum virgatum*), or sugarcane (*Saccharum officinarum* L.); perennial C3 crops, such as reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) or giant reed (*Arundo donax* L.), short-rotation poplar coppices (*Populus*) or willow (*Salix*); annual C4 crops, such as fiber sorghum (*Sorghum bicolor* L.) or maize (*Zea mays*); or annual C3 crops, such as triticale (*Triticum sativum*) (Hastings et al., 2008; Karp and Shield, 2008; Sanderson and Adler, 2008; Rabelo et al., 2011; Vermerris, 2011; Dillen et al., 2013; Nissim et al., 2013; Zegada-Lizarazu et al., 2013; Cadoux et al., 2014; Souza et al., 2014).

Among the few studies that have compared several such crops, the C4 perennial crops have been highlighted as advantageous for sustainable biomass feedstock (Cadoux et al., 2014).

For sustainable crops dedicated to producing bioenergy, the following must be combined: (i) high biomass production per hectare in various climates, (ii) suitable biomass composition for various bioenergy conversion processes, and (iii) positive environmental footprint (lowest water requirement, lowest N, P, and K fertilization, low greenhouse gas emissions, low invasiveness, etc.). For these requirements, C4 crops appear more promising as bioenergy crops than C3 crops because they are more productive and exhibit efficient water and nitrogen use (Heaton et al., 2008) and efficient sunlight interception (Dohleman and Long, 2009). Among these C4 crops, C4 perennial crops such as miscanthus and switchgrass are particularly interesting because they yield a better environmental footprint than annual crops (Cadoux et al., 2014). Moreover, perennial crops could be used to cover marginal lands for biomass production where annual crops are not suitable (Wagoner, 1990). In comparison with switchgrass, miscanthus produces a higher biomass (Heaton et al., 2008; Arundale et al., 2014b) and also displays a larger solar energy conversion efficiency (Dohleman et al., 2009). It is considered one of the most promising perennial bioenergy crops (Clifton-Brown et al., 2004; Lewandowski and Schmidt, 2006; Hastings et al., 2008; Cadoux et al., 2010). More particularly, *Miscanthus x giganteus*, which is a triploid sterile hybrid descendent of a cross between *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* (Hodkinson et al., 2002) is particularly interesting because it

combines high biomass production per hectare with a low environmental impact (Cadoux et al., 2014). However, *M. x giganteus* also has certain disadvantages: (i) this species cannot produce high quantities of biomass under various climates because it is sensitive to heavy frost (Zub et al., 2012a) and a lack of water (Cosentino et al., 2007). Further, (ii) *Miscanthus x giganteus*, which has been the most commonly cultivated species until now, has only few clones (Greef et al., 1997; de Cesare et al., 2010), which could be risky due to disease susceptibility (Zub and Brancourt-Hulmel, 2010).

Considering these disadvantages, developing miscanthus as suitable feedstock for bioenergy will enhance the miscanthus varieties available for cultivation. Therefore, miscanthus breeding programs must be developed to propose a range of miscanthus varieties that can produce high quantities of biomass per hectare under various climatic conditions. Other *Miscanthus* species could also be sought for breeding because the genus *Miscanthus* contains more than 20 species that originate from a broad geographical area (Greef and Deuter, 1993). Certain species, such as *M. sinensis*, show high genetic diversity compared with *M. x giganteus* (Greef et al., 1997; de Cesare et al., 2010).

In addition to the above requirements for biomass production, using miscanthus as a feedstock for bioenergy requires that the biomass composition is adapted to various bioenergy conversion processes. This suitability remains a difficult challenge and constitutes a major bottleneck to proposing suitable lignocellulosic crops for bioenergy use.

First, the industrial requirements for lignocellulosic crop biomass composition have not been fully defined for the various bioenergy conversion processes. For instance, the most favorable balance between lignins, cellulose, and hemicelluloses in the cell wall for producing biofuels from biochemical conversion processes has not been defined (Jakob et al., 2009). In recent years, several global projects have been launched to precisely define these requirements and develop industrial-scale tests for several bioenergy conversion processes. The results from these projects should precisely define the industrial requirements for lignocellulosic crop biomass composition in bioenergy production.

Second, biomass composition can influence bioenergy conversion process efficiency. For instance, high lignin content is positive for thermochemical processes (Hodgson et al., 2010a; Hodgson et al., 2010b), while it is negative for biochemical processes (Boudet et al., 2003; Klimiuk et al., 2010; Monlau et al., 2013). Regardless of the process, ash can be problematic because it deposits on the heat surfaces, which causes slagging and fouling (Lewandowski and Kicherer, 1997; Lewandowski et al., 2003a).

Third, the methods used to assess the biomass components and, more particularly, the cell wall components differ and are not reliable. Standardized methods have not been established for either

miscanthus or other crops. This complicates the definition of the most suitable biomass composition for each bioenergy conversion process.

These observations demonstrate that biomass composition must be better understood and considered in miscanthus breeding programs to develop miscanthus as a suitable feedstock for bioenergy use.

Developing such breeding programs also requires consideration of interesting traits related to biomass production and composition as well as the factors of variation influencing such traits.

For the traits of interest, above-ground biomass production must be considered first. In addition, canopy height, stem number or stem diameter, which are the main components that contribute to biomass production, must also be investigated (Jezowski, 2008; Zub et al., 2011; Gauder et al., 2012); Cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents are the main traits considered in biomass composition.

For the factors of variation, studies on miscanthus have reported effects of species, clone, and ploidy level on biomass production and certain biomass production components (Clifton-Brown et al., 2001b; Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Clifton-Brown et al., 2008; Jezowski, 2008; Zub et al., 2011; Gauder et al., 2012) or biomass composition (Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Lewandowski et al., 2003a; Kalembasa et al., 2005; Hodgson et al., 2010b; Allison et al., 2011; Hodgson et al., 2011). Furthermore, these traits appear influenced by other factors, such as geographical area, climate conditions, or crop management practices, which can influence the conversion processes (Lewandowski and Kicherer, 1997; Clifton-Brown et al., 2001b; Lewandowski and Heinz, 2003; Hodgson et al., 2010b; Le Ngoc Huyen et al., 2010; Mos et al., 2013).

Therefore, it is essential to consider the traits together with the factors of variation that can influence these traits in developing suitable miscanthus for bioenergy production.

Breeding program development requires knowing the genotypic variability related to the traits of interest (Jakob et al., 2009). As the genotypic variability related to biomass production and biomass composition has not been well-studied for miscanthus, it is crucial to explore the variability in this genus for biomass production and composition.

Therefore, the present paper reviews worldwide references about the phenotypic variability in the *Miscanthus* genus for the following traits related to biomass production and biomass composition: above-ground biomass production, canopy height, stem number per plant, stem diameter, cellulose content, hemicellulose content, lignin content, and ash content. The phenotypic variability was deconstructed into environmental variability and genotypic variability to highlight the genotypic variability contribution that may be used in breeding programs. This paper gathered the

available data for the three most studied *Miscanthus* species: *M. x giganteus*, *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*.

This paper is presented in four sections. The first section describes the data set used in the present review and collected from scientific literature. A second section investigates the phenotypic variability of the traits of interest related to miscanthus biomass production and biomass composition. In this section, environmental and genotypic variability are investigated with a focus on the factors of variation that are most studied in the literature. Given the miscanthus genotypic variability for biomass production and composition, in the third section, we discuss the miscanthus breeding implications for bioenergy use considering the industrial requirements for bioenergy conversion processes. Finally, we provide certain proposals in the fourth section.

## 2.2 Database description and compilation

A literature search was conducted using the Thomson Reuters Web of Knowledge electronic database for several traits of interest related to miscanthus biomass production and biomass composition.

The first observation is that the studies reporting data on these traits are relatively recent, with publication dates mainly ranging from 1997 to 2014. Certain miscanthus traits have not been thoroughly studied. Traits related to biomass production studied in literature mainly concern above-ground biomass production, canopy height, stem number, and stem diameter. Among these traits, fewer studies have considered canopy height, stem number, and stem diameter than above-ground biomass production. Fewer studies have considered traits related to miscanthus biomass composition than miscanthus biomass production. For the present review, we will focus on traits related to cell wall components (cellulose content, hemicellulose content, and lignin content) and ash content, which are interesting traits for industrial bioenergy production.

A second observation is that the studies differed.

First, the data from each publication were not comparable for a given trait; certain publications indicate individual values for each factor of variation (year, harvest date, nitrogen, location, genotype, etc.), and others reported only a mean value for a given trait. Therefore, to investigate the traits of interest related to miscanthus biomass production and biomass composition in this review, we selected publications that allowed us to collect individual data for each trait. Therefore, each individual data has the same weight and was comparable between publications.

Secondly, different factors of variation for such traits in the literature were discussed. In this review, we focus on the factors related either to crop age, climate conditions, geographical area,

crop management practices (harvest date, nitrogen fertilization, irrigation, or plant density), species, clones, or ploidy level, which were the most commonly studied factors in the literature. For the crop age, most studies reported data for the first three years of cultivation. Therefore, we focus on these first three years to investigate the influence of crop age on these traits. In addition, only three *Miscanthus* species have been investigated in the literature for traits related to biomass production and composition: *M. x giganteus*, *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*. Moreover, the clone number and genetic background in the literature differed between the three species. Therefore, to compare the publications based on the *Miscanthus* species, we categorized the genotypes into 3 groups: (i) interspecific *M. x giganteus*-type hybrids that correspond to *M. x giganteus* clones or *M. sacchariflorus* x *M. sinensis* clones, (ii) *M. sinensis* species that correspond to *M. sinensis* clones or intra-specific hybrids between *M. sinensis* clones, and (iii) *M. sacchariflorus* species that correspond to *M. sacchariflorus* clones or intra-specific hybrids between *M. sacchariflorus* clones.

Third, the method used to determine the values for traits related to biomass composition differed between studies. The cellulose, hemicellulose, and lignin contents were determined using several chemical analysis methods, such as the Van Soest method, the KS M 7044 method to determine cellulose content, or the Klason method to determine lignin content (Amougou et al., 2011; Kim et al., 2012). Based on the method used, the cellulose, hemicellulose or lignin contents differed and may be under- or overestimated (Brigitte Chabbert, personal communication). Therefore, to ensure reliable comparisons for such contents between publications, we focused only on the publications that used the Van Soest method as the method of reference (Van Soest, 1967) because it was most commonly used (Hodgson et al., 2010b; Van Hulle et al., 2010; Allison et al., 2011; Hulle et al., 2012; Qin et al., 2012).

Herein, tables 2-1 and 2-2 gather the publications which reported data on the miscanthus phenotypic variability for the traits of interest. For each study, we provide information related to the factors of variation, experimental design construction, and statistical indices.

To investigate each trait, we selected in tables 2-1 and 2-2 the studies for which individual data were available (in bold in the tables). We represented these individual data using box-plots (Figures 2-1, 2-3 to 2-7). Two types of box-plots were constructed for each illustration: a first type of box-plot shows the phenotypic variability that combines both environmental and genotypic variability, and a second type shows the part of the phenotypic variability due only to the genotype. This genotype effect ( $\alpha_i$ ) was calculated in each collected environment according to the following additive model including the studied factors:

$$E(Y_i) = \mu + \alpha_i + \text{other factor effects}$$

In addition, the range of variation was calculated for each trait.

**Chapitre 2** - A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use:  
genotypic and environmental variability and implications for breeding

Finally, the remaining references of the tables 2.1 and 2.2 are cited in the text to support the discussion.

(Following page)

**Table 2-1: Description of the scientific references collected for the present review reporting data on above-ground miscanthus biomass production, canopy height, stem number per plant, and stem diameter**

Gig, *M. x giganteus* species; Sacc, *M. sacchariflorus* species, Sin: *M. sinensis* species.

Std, standard deviation; CV, coefficient of variation; SED, standard error of difference; LSD, least significant difference; MSD, minimum significant difference.

\* According to the authors, *M. floridulus* clone belongs to the *M. x giganteus* species.

Data written in italics were calculated in addition to the initial paper.

The LSD values from Zub et al. (2011) were calculated using Dagnelie (1969).

In bold: all the references reported individual data which were used in the Figures 2-1, 2-3 to 2-7.

Trait	Reference	Factors of variation							Experimental design				Statistical data			
		Crop age	Country (Number of sites)	Harvest date	Nitrogen fertilization (kg/ha)	Irrigation	Plant density (pl/m <sup>2</sup> )	Number of <i>Miscanthus</i> species (Name of species)	Number of clones	Number of replicated plots	Plot surface (m <sup>2</sup> )	Sampling area (m <sup>2</sup> )	Std (min - max)	CV (%)	LSD (min - max)	MSD (min - max)
	Clifton-Brown et al. (2001b)	1, 2, 3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn			2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	25	2.5			0.6 - 17.1	
	Lewandowski et al. (2003a)	3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn and Winter			2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	49	2			2.5 - 18.0	
	Christian et al. (2008)	1 to 14	United Kingdom (1 site)	Winter	0, 160, 120 (3 levels)		4	1 (Gig)	1	3	100	36			0.3 - 1.0	
	Jezowski (2008)	1, 2, 3	Poland (1 site)	Winter			1	2 (Gig, Sin)	6	3	20	10				
	Angelini et al. (2009)	1 to 12	Italy (1 site)	Autumn			2	1 (Gig)	1	4	100	10				
	Mantino et al. (2009)	1 to 5	Italy (1 site)	Winter	50, 100 (2 levels)	75, 25% Etm (2 levels)	2	1 (Gig)	1		24					
	Jezowski et al. (2011)	1, 2, 3	Poland (2 sites)	Winter			1	2 (Gig, Sin)	6	3	20	10				
	Amougou et al. (2011)	2, 3	France (1 site)	Autumn and Winter (2 levels)	0, 120		1.5	1 (Gig)	1	3	360	4			4.9 - 9.6	
	Strullu et al. (2011)	2, 3	France (1 site)	Autumn and Winter (2 levels)	0, 120		1.5	1 (Gig)	1	3	360	4				
Above-ground biomass production (t DM/ha)	Zub et al. (2011)	2, 3	France (1 site)	Autumn and Winter			2	3 (Gig, Sacc, Sin) *	21	3	16	16	1.2 - 4.5	19	1.8	
	Behnke et al. (2012)	2, 3	United States, Illinois (1 site)	Winter	0, 60, 120 (3 levels)			1 (Gig)	1	3	100		0.7 - 2.9			
	Dohleman et al. (2012)	5, 6, 7	United States, Illinois (1 site)	Summer, Autumn, and Winter			1	1 (Gig)	1	4	100	0.38				
	Gauder et al. (2012)	1 to 14	Germany (1 site)	Autumn			2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3	25	1 to 4				
	Arundale et al. (2014b)	3 to 10	United States, Illinois (7 sites)	Winter			1	1 (Gig)	1	4	25	0.38				
	Arundale et al. (2014a)	3 to 9	United States, Illinois (7 sites)	Winter	0, 67, 134, 202 (4 levels)		1	1 (Gig)	1	4	25	0.19				
	Haines et al. (2014)	1, 2, 3	United States, North Carolina (2 sites)	Winter	0, 45, 90, 135 (4 levels)		1	1 (Gig)	1	4	16	4				
	Larsen et al. (2014)	1 to 20	Denmark (2 sites)	Autumn and Winter	0 N, NPK 75 N, Slurry 75N, Slurry 150 N (4 levels)	0, irrigated (2 levels)	1.8, 1.1 (2 levels)	2 (Gig, Sin)	2	3	160	22 and 37				
	Palmer et al. (2014)	1 to 4	United States, North Carolina (2 sites)	Winter	0, 34, 67, 134 (4 levels)		1	2 (Gig, Sin)	2	1	25	9				

**Chapitre 2 - A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use:  
genotypic and environmental variability and implications for breeding**

**Table 2-1 (continued)**

Trait	Reference	Factors of variation						Experimental design				Statistical data				
		Crop age	Country (Number of sites)	Harvest date	Nitrogen fertilization (kg/ha)	Irrigation	Plant density (pl/m <sup>2</sup> )	Number of <i>Miscanthus</i> species (Name of species)	Number of clones	Number of replicated plots	Plot surface (m <sup>2</sup> )	Sampling area (m <sup>2</sup> )	Std (min - max)	CV (%) (min - max)	LSD (min - max)	MSD (min - max)
Canopy height (cm)	Jezowski (2008)	1, 2, 3	Poland (1 site)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20			14 - 46		
	Jezowski et al. (2011)	1, 2, 3	Poland (2 sites)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20	10				
	Zub et al. (2011)	2, 3	France (1 site)				2	3 (Gig, Sacc, Sin) *	21	3	16	16	17 - 25	6	3	
Stem number per plant	Christian et al. (2008)	1 to 14	United Kingdom (1 site)	0, 160, 120 (3 levels)			4	1 (Gig)	1	3	100	1.25			2 - 4	
	Jezowski (2008)	1, 2, 3	Poland (1 site)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20			7 - 19		
	Jezowski et al. (2011)	1, 2, 3	Poland (2 sites)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20	10				
	Zub et al. (2011)	2, 3	France (1 site)				2	3 (Gig, Sacc, Sin) *	21	3	16	16	15 - 49	17	3	
	Gauder et al. (2012)	1 to 14	Germany (1 site)				2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3	25	1 to 4				
Stem diameter (mm)	Jezowski (2008)	1, 2, 3	Poland (1 site)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20					
	Jezowski et al. (2011)	1, 2, 3	Poland (2 sites)				1	2 (Gig, Sin)	6	3	20	10				
	Zub et al. (2011)	2, 3	France (1 site)				2	3 (Gig, Sacc, Sin) *	21	3	16	16	1.9 - 2.4	6	1.2	
	Gauder et al. (2012)	1 to 14	Germany (1 site)				2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3	25	1 to 4				

**Table 2-2: Description of the scientific references collected for the present review reporting data on the miscanthus biomass composition for the above-ground biomass: cellulose, hemicellulose, lignin, and ash content**

Trait	Reference	Factors of variation				Experimental design				Statistical data			
		Crop age	Country (Site number)	Harvest date	Nitrogen fertilization (kg/ha)	Plant density (pl/m <sup>2</sup> )	Number of Miscanthus species (Name of species)	Number of clones	Number of replicated plots	Plot surface (m <sup>2</sup> )	Sampling area (m <sup>2</sup> )	Std (min - max) (0,05)	LSD (min - max) (0,05)
Cellulose (% DM)	Hodgson et al. (2010b) *	3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn and Winter	2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	49	2		1.2 - 6.8	0.6 - 2.6
Hemicellulose (% DM)	Hodgson et al. (2010b) *	3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn and Winter	2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	49	2		1.0 - 5.1	0.4 - 2.0
Lignin (% DM)	Hodgson et al. (2010b) *	3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn and Winter	2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	49	2		0.3 - 2.6	0.1 - 1.0
	Hayes (2013) **	1, 2, 3, 13	Ireland (6 sites)	Autumn, Winter, and Spring		1 (Gig)	1						
	Clifton-Brown and Lewandowski (2002)	1, 2, 3	Germany (1 site)	Autumn and Winter	2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3	25				0.8 - 4.2
	Lewandowski et al. (2003a)	3	Sweden, Denmark, England, Germany, Portugal (5 sites)	Autumn and Winter	2	3 (Gig, Sacc, Sin)	15	3, only 2 in Portugal	49	2			0.5 - 3.2
Ash (% DM)	Baxter et al. (2012)	3, 4	United Kingdom (1 site)	Autumn and Winter		1 (Gig)	1	3					
	Hayes (2013)	1, 2, 3, 13	Ireland (6 sites)	Autumn, Winter, and Spring	0, 100, 250 (3 levels)	1 (Gig)	1						
	Meehan et al. (2013)	15, 16	Ireland (1 site)	Autumn, Winter, and Spring		1 (Gig)	1	4			0.38		

Gig, *M. x giganteus* species; Sacc, *M. sacchariflorus* species; Sin, *M. sinensis* species.

SED, standard error of difference; LSD, least significant difference; MSD, minimum significant difference.

\* The cellulose, hemicellulose, and lignin contents were determined using the Van Soest method as the method of reference.

\*\* Lignin content was determined using the Klason method.

In bold: all the references reported individual data which were used in the Figures 2-1, 2-3 to 2-7.

## **2.3 The phenotypic variability for the traits of interest**

### **2.3.1 The phenotypic variability for aboveground biomass production and biomass components**

#### **a. The influence of crop age**

Miscanthus is a perennial crop that can be cultivated for up to 25 years (Lewandowski et al., 2003b), during which miscanthus biomass is produced in two phases: a yield-building phase, where the biomass gradually increases, and an adult phase often described as a plateau phase, where the biomass production is maintained (Clifton-Brown et al., 2001a; Clifton-Brown et al., 2008; Zub and Brancourt-Hulmel, 2010).

Most studies in the literature have reported data on miscanthus above-ground biomass production and components for the first three years of cultivation, which correspond to the yield-building phase (Table 2-1). Data on these traits for subsequent years were less frequent in the literature and only concern the *M. x giganteus* species, which is the most commonly studied species (Lewandowski and Kicherer, 1997; Christian et al., 2008; Mantineo et al., 2009; Cadoux et al., 2014).

Therefore, below, we describe the influence of crop age on the above-ground biomass and its components based on the two biomass production phases. We better detail the first three cultivation years because more information is available in literature.

- **The first years: the yield-building phase**

The first year of cultivation corresponds to the year that the crop is established (Zub and Brancourt-Hulmel, 2010). The biomass production is generally low during the first year with a 5.9 t dry matter/ha (DM/ha) average from experiments using irrigated or rainfall conditions (Figure 2-1 a).

During the two years that follow, the miscanthus biomass gradually increases: biomass production reaches 8.3 and 13.0 t DM/ha on average during the second and third years, respectively, under irrigated or rainfall conditions (Figure 2-1 a).

Biomass components, such as canopy height and stem number per plant, also clearly increase from the first to third year; on average, the canopy height increases from 66 to 176 cm, and the stem number per plant increases from 21 to 53 (Figure 2-1). However, with mean values between 4.2 and 5.2 mm, the stem diameter was more consistent than the biomass production, canopy height, and stem number during the first three years (Figure 2-1).

These observations confirmed that, for miscanthus, the first three years correspond to a yield-building phase, where the biomass production and its components, such as canopy height and stem number per plant, gradually increase.

The range of variation was large within each of the first three years of cultivation for each trait. This range of variation was generally smaller during the first year of cultivation compared with the second and third years (Figure 2-1). In addition, the data scattering for biomass production, stem number, canopy height, and stem diameter, to a lesser extent, increased each year during the first three years; minimum values were consistent among the years, but the maximum values increased each year (Figure 2-1). Similarly, genotypic variability was more visible in the second and third years than the first year for each trait studied; the higher variability in second and third years was certainly due to the most productive genotypes, which began to display their potential during the second year.

Finally, among the traits studied, stem number and above-ground biomass production appeared to be the most variable traits (301 % and 242 %, respectively, in the third year) compared with canopy height and stem diameter, which seemed less variable (163 % and 158 %, respectively, in the third year) (Figure 2-1). This large observed range of variation for the traits related to biomass production was particularly interesting in breeding programs to select the best genotypes and achieve maximum biomass production.

(Following page)

**Figure 2-1: Phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability in miscanthus for above-ground biomass production (a), canopy height (b), stem number per plant (c), and stem diameter (d) based on the crop age, from the first to third year of cultivation**

Phenotypic variability corresponds to the mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to the phenotypic variability corresponds to genotypic variability.

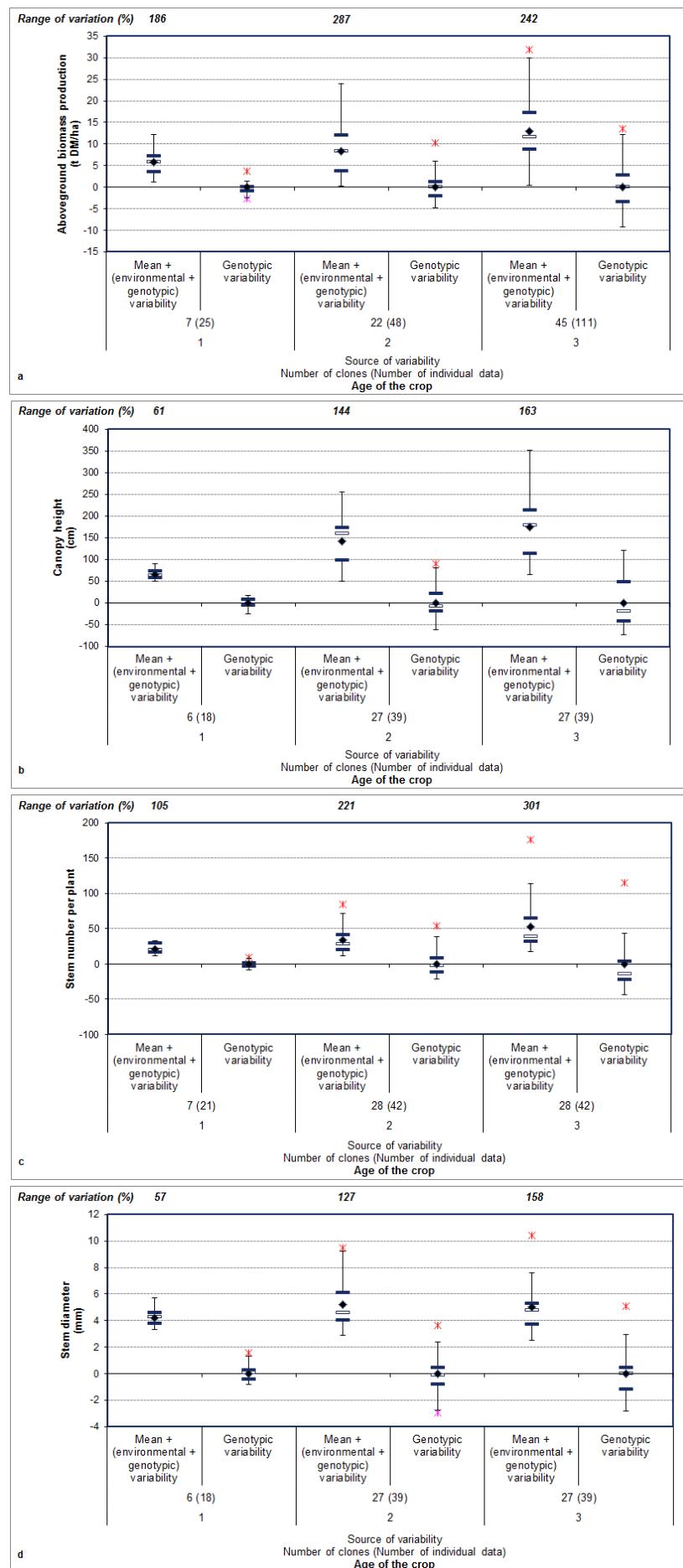
The above-ground biomass production was assessed for the winter harvest; the canopy height, stem number per plant, and stem diameter were obtained at the end of the growing season.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and is expressed as a percentage of the mean.

*References used in figure 2-1:* (a) Christian et al. (2008) Clifton-Brown et al. (2001b), Lewandowski et al. (2003a), Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Mantineo et al. (2009), Amougou et al. (2011), Zub et al. (2011); (b) Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011); (c) Jezowski (2008), Christian et al. (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011); (d) Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011).

**Chapitre 2 - A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding**



- The subsequent years: the adult phase and decline

Several studies have reported data on miscanthus biomass production, canopy height, stem number, or stem diameter in long-term experiments. They mainly concerned long-term biomass production which was reported for the *M. x giganteus* species in Europe (France (Cadoux et al., 2014), United Kingdom (Christian et al., 2008), Germany (Gauder et al., 2012), Italy (Angelini et al., 2009), Denmark (Knoll et al., 2013)) and in United States (Illinois (Dohleman et al., 2012; Yoon et al., 2013)). The winter harvest date corresponded to the harvest date commonly used by farmers. From the available individual data, we assume that the *M. x giganteus* biomass production crop reached a first peak at variable time: at 3 years in the study of Gauder et al. (2012), at 6 years in the study of Christian et al. (2008), and this first peak was not reached after 4 years of cultivation in the study of Cadoux et al. (2014) (Figure 2-2). Clifton-Brown et al. (2008) in United Kingdom and Miguez et al. (2008) in United States showed that biomass production plateaued after two to five years for *M. x giganteus* depending on the environmental conditions and crop management practices. Larsen et al. (2014) reported in Denmark an increase of the *M. x giganteus* biomass production during the first years, optimum yields after 7 and 8 years, and a decrease to a lower level which remained relatively constant from year 11 to 20. In addition, Gauder et al. (2012) found even more variable yields from the 3<sup>rd</sup> to the 14<sup>th</sup> years of cultivation.

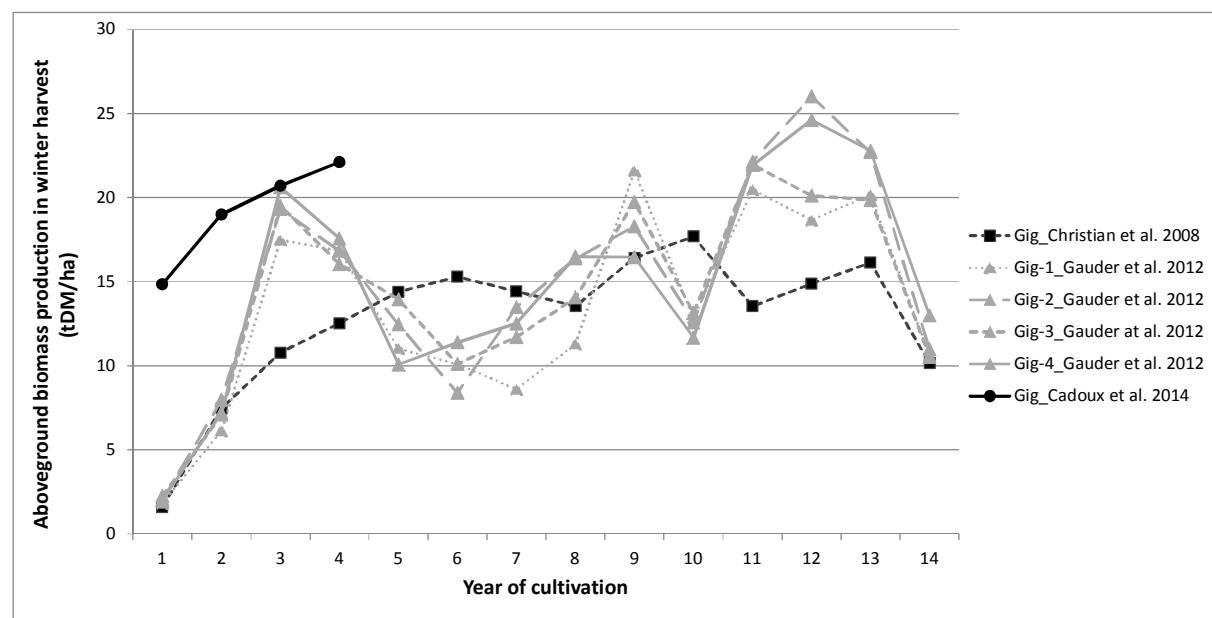


Figure 2-2: *M. x giganteus* above-ground biomass production during the winter harvest for several successive years from Christian et al. (2008), Gauder et al. (2012), and Cadoux et al. (2014)

In summary, based on the long-term experimental data published, it is difficult to estimate the time of the first peak of production and the length of time that miscanthus maintains biomass production. It seems also that the yields during the plateau phase are variable. Lastly, the time that biomass production begins to decline is also variable. This variability during the plateau phase and the variability of the time of the decline depend on possible causes such as the soil and climate conditions as well as crop management practices (Miguez et al., 2008). In addition, the biomass production decline depends itself on soil compaction and pest and disease pressure (Arundale et al., 2014b).

### **b. The influence of climate conditions**

Climate conditions, such as temperature, affect miscanthus biomass production more during the first year of crop establishment. For instance, a severe frost that occurs immediately after establishment can cause plant death in *M. x giganteus* and irreversibly damage biomass production (Zub et al., 2012a). In addition, low temperatures during the first winter after planting can damage miscanthus biomass production. For instance, *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* clones died the first winter after planting in Sweden and Denmark, whereas *M. sinensis* clones survived (Clifton-Brown et al., 2001b). The authors explained the plant death by the winter soil temperatures, which fell below -4.5°C during the first year after planting in these countries.

During subsequent years of cultivation, Jezowski et al. (2011) concluded that climate conditions significantly effected miscanthus biomass production based on the experiment location by comparing two sites in Poland during the first three years of cultivation. Clifton-Brown et al. (2001b) also concluded that biomass production varied based on the trial location; they showed that biomass production was generally higher in Central and Southern Europe than Northern Europe over the first three years of cultivation. Moreover, Clifton-Brown et al. (2001b) concluded that the clone and country significantly interacted; clones that produced the highest yields in Sweden and Denmark were among clones that produced the lowest yields in Portugal and Germany. Despite this interaction, the authors showed that certain *M. sinensis* hybrids can be found for a wide range of climate conditions in Europe. Gauder et al. (2012) and Heaton et al. (2004) also reported that climate parameters, such as rainfall and temperature, were important in miscanthus biomass accumulation. More particularly, in Germany, Gauder et al. (2012) reported a strong correlation between the rainfall level during plant growth and miscanthus biomass production for a winter harvest.

Therefore, climate conditions can irreversibly damage biomass production during the first year of cultivation, which corresponds to the establishment year. This observation implies that climate

conditions should be considered during the first year, as it was the most critical phase for biomass production (Christian and Haase, 2001). Variations in climate conditions, such as rainfall and temperature, can also influence biomass production during the subsequent years of cultivation. Therefore, to maximize biomass production, *Miscanthus* genotypes have to be selected based on their climate condition requirements because an interaction between location and genotype was observed for biomass production (Clifton-Brown et al., 2001b).

**c. The influence of crop management practices**

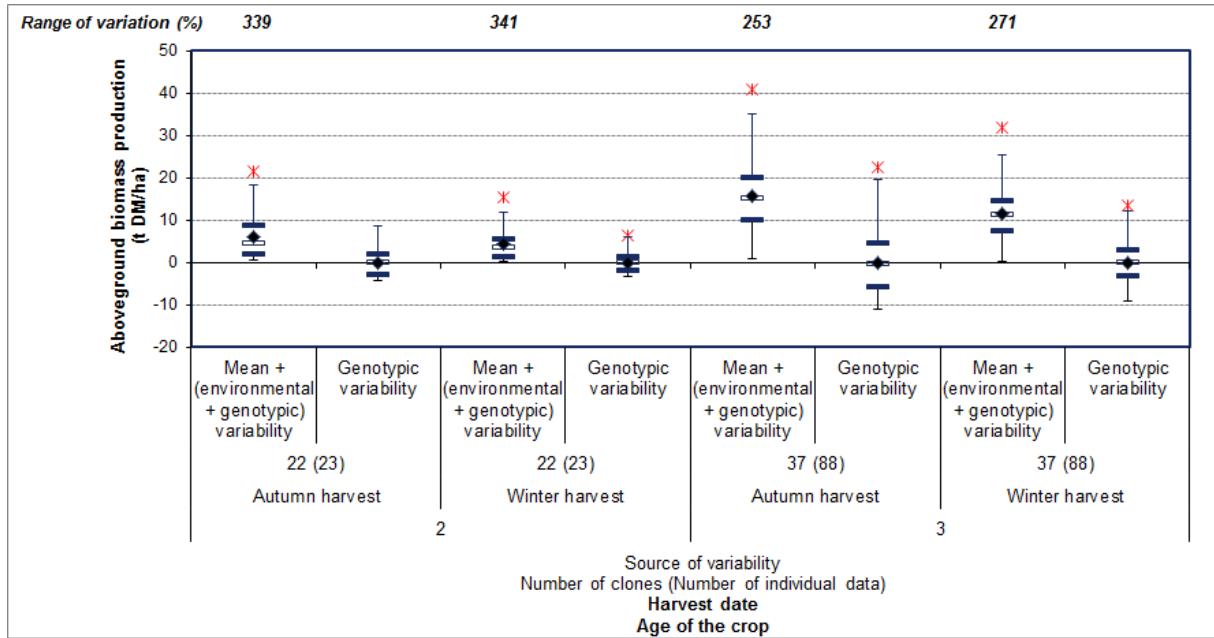
▪ **The influence of harvest date**

On average, 1.8 t DM/ha (29 %) and of 4.2 t DM/ha (26 %) decreases were observed between the autumn and winter harvests for the second and third years, respectively (Figure 2-3). For each growing season, maximum biomass productions were obtained during autumn at flowering (Cosentino et al., 2007) then declined during winter mainly due to leaf loss, senescence and assimilate translocation (Beale et al., 1996; Himken et al., 1997; Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Zub et al., 2011).

With variations ranging from 253 % to 341 %, biomass production was highly variable during each year and each harvest date (Figure 2-3). Interestingly, the data appeared more scattered during the autumn harvests than winter harvests (Figure 2-3).

Finally, the genotype contribution to the phenotypic variability was high for above-ground biomass production and more visible during the third than second year for both harvest dates (Figure 2-3).

In addition, Strullu et al. (2011) showed on *M. x giganteus* an interaction of the harvest date with the nitrogen fertilization: in winter harvest, there was no effect of the nitrogen treatment whereas in autumn harvest, the biomass production increased with the nitrogen fertilization.



**Figure 2-3: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus biomass production based on the harvest date (autumn and winter harvests) during the second and third years of cultivation**

The phenotypic variability corresponds to the mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to the phenotypic variability corresponds to the genotypic variability.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation and harvest date. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation and harvest date. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and is expressed as a percentage of the mean.

References used in figure 2-3: Lewandowski et al. (2003a), Zub et al. (2011), Amougou et al. (2011).

- **The influences of nitrogen fertilization and irrigation**

Most studies investigated the effects of nitrogen input levels and irrigation on *M. x giganteus* biomass production until now, excepting the study of Palmer et al. (2014).

In a review, Cadoux et al. (2012) concluded that the effect of nitrogen fertilization on above-ground *M. x giganteus* biomass production varied. Certain studies reported no effect from nitrogen fertilization on above-ground *M. x giganteus* biomass production (Danalatos et al., 2007; Christian et al., 2008; Mantineo et al., 2009; Amougou et al., 2011; Behnke et al., 2012). Other studies have reported a positive effect on the above-ground biomass for nitrogen input ranging from 0 to 200 kg N/ha (Ercoli et al., 1999; Acaroglu and Aksoy, 2005; Cosentino et al., 2007; Arundale et al., 2014a; Cadoux et al., 2014). More recently, variable effects for nitrogen fertilization were even observed on the biomass production between years (Haines et al., 2014).

As reported by Cadoux et al. (2012), the effect from nitrogen fertilization on above-ground *M. x giganteus* biomass production was generally limited but the effect was amplified with irrigation. For

instance, during the third year of cultivation, Mantineo et al. (2009) observed maximum *M. x giganteus* biomass production with the highest nitrogen fertilization level (100 kg N/ha) and under the best soil water content conditions (75 % water restoration in the soil with maximum evapotranspiration). Moreover, Ercoli et al. (1999) concluded that the effect of irrigation on *M. x giganteus* biomass production increased with the nitrogen level, whereas irrigation did not affect biomass production without nitrogen fertilization. With 100 kg N/ha, irrigation increased the biomass production by 3.7 t DM / ha, and with 200 kg N/ha, irrigation increased the biomass production by 9.8 t DM/ha compared with the rainfed treatment over the first four years of cultivation.

These observations suggest that high *M. x giganteus* yields could be obtained with low nitrogen input levels because biomass production increases recorded with 0 and 200 kg N/ha were moderate or insignificant. However, because the irrigation and nitrogen level influenced *M. x giganteus* biomass production in the interaction, it would be interesting to perform a more detailed investigation of the miscanthus capacity to produce high biomass under low nitrogen input and low irrigation levels with other *Miscanthus* species than *M. x giganteus*. Identifying clones that can produce a high biomass with the lowest environmental footprint (lowest water requirement and nitrogen fertilization levels) is necessary for improving miscanthus growth for bioenergy use.

- **The influence of plant density**

Different plant densities were used in miscanthus experiments (0.6 to 4 plants/m<sup>2</sup>, see Tables 2-1 and 2-2) but only a few studies reported the effect of plant density on miscanthus biomass production. Danalatos et al. (2007) observed that a 1- and 2-plants-per-m<sup>2</sup> density improved miscanthus biomass production compared with 0.67 plants-per-m<sup>2</sup> in central Greece. Based on this result, we suggest that the higher plant density increased biomass production. Based on this observation, two hypotheses can be formulated for the evolution of miscanthus biomass production over several years: (i) at higher plant density, biomass production will plateau more rapidly, and (ii) a higher plant density will yield higher biomass production levels during the plateau phase. More investigation is necessary to confirm these hypotheses and select an optimal plant density to maximize above-ground miscanthus biomass production. In addition, this choice should also depend on the cost of the miscanthus rhizomes because the expense of establishing the rhizome remains high.

Producing plantlets through vitro culture or producing seed-propagated varieties may be good alternatives for combining high plant densities, high biomass production, and lower establishment costs. Nevertheless, the environmental footprint, such as non-invasiveness, must also be preserved. For example, sterility must be obtained for seed-propagated varieties.

**d. The influence of species and ploidy level**

First, the *Miscanthus* species differed in biomass production and biomass components. With the average values 12 and 18 t DM / ha for the winter harvest during the second and third years, respectively, *M. x giganteus* seemed the best biomass producer compared with the *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* species (Figure 2-4 a). The *M. x giganteus* species also seemed better than the *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* species. Moreover, the *M. sinensis* species seemed smaller than the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species (Figure 2-4 b). During the third year, the *M. x giganteus* species reached 231 cm on average, whereas the *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* species reached 185 and 132 cm, respectively (Figure 2-4 b). For stem number per plant, the *M. sinensis* and *M. x giganteus* species appeared to produce more stems than the *M. sacchariflorus* species. For example, the *M. sinensis* and *M. x giganteus* species produced 49 and 58 stems per plant on average, respectively, during the third year compared with the *M. sacchariflorus* species, which produced 26 stems (Figure 2-4 c). Finally, for stem diameter, the *M. sacchariflorus* and *M. x giganteus* species showed the highest values compared with the *M. sinensis* species for the second and third years of cultivation (Figure 2-4 d). For example, during the third year, the *M. sacchariflorus* and *M. x giganteus* species showed the mean stem diameters 7.2 and 5.6 mm on average, respectively, compared with *M. sacchariflorus* species, which exhibited the stem diameter 4.4 mm (Figure 2-4 d).

The range of variation within species was higher for *M. sinensis* than both the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species, particularly for biomass production and stem number per plant (Figure 2-4 a, c). For example, during the third year, the range of variation for above-ground biomass production and stem number per plant in the *M. sinensis* species reached 324 % and 276 % on average, respectively, (Figure 2-4 a, c). In contrast, the range of variation for canopy height and stem diameter appeared similar among the three *Miscanthus* species (Figure 2-4 b, d).

For each trait, the genotype contribution to the phenotypic variability was high. This genotypic variability was more visible in the second and third years than the first year (Figure 2-4). Moreover, this genotypic variability was generally more visible for the *M. sinensis* species than the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species (Figure 2-4). This trend confirmed that the genotypic diversity among miscanthus is relatively high, particularly among the *M. sinensis* species (Greef et al., 1997).

Second, certain *Miscanthus* clones exhibited high biomass production and biomass component values and, thus, appeared suitable for biomass production in contrast to other clones that exhibited low values.

Interestingly, certain *M. sinensis* clones produced more biomass than certain *M. x giganteus* clones. Based on the studies shown in Figure 2-4 a, the maximum biomass production 31.9 t DM/ha was recorded for a hybrid composed of two *M. sinensis* clones (EMI n°7) in Portugal with irrigation compared with a 30.6 t DM/ha maximum for a *M. x giganteus* clone (Greef et Deu.) in Italy with irrigation as well as 100 kg N/ha from a winter harvest during the third year of cultivation. Although a higher above-ground biomass production of 49 t DM / ha was recorded for a *M. x giganteus* clone in France under irrigated conditions (Tayot et al., 1995), based on these observations, we suggest that specific *M. sinensis* clones can produce more biomass than certain *M. x giganteus* clones under specific climate conditions and locations. This suggestion was confirmed by the results from Clifton-Brown et al. (2001b). In addition, certain studies have reported the superiority of certain *Miscanthus* hybrids for biomass production compared with non-hybrids. For example, Clifton-Brown et al. (2001b) observed that *M. sinensis* hybrids (EMI n° 6, 7, 8, 9, and 10) produced 31 % more biomass on average than non-hybrid *M. sinensis* clones (EMI n° 11, 12, 13, 14, and 15) during a winter harvest in the third year of cultivation.

Considering the biomass components, two *M. sinensis* clones tested in Northern France (Zub et al., 2011) showed a high stem number per plant: *M. sinensis* Herman Müssel reached 85 stems during the second year of cultivation, and *M. sinensis* Silberspinne reached 176 stems during the third year of cultivation (Figure 2-4 c). One *M. x giganteus* clone (Flo) that was also tested in Northern France (Zub et al., 2011) showed a high stem diameter, reaching 9.8 mm in the third year (Figure 2-4 d).

(Following page)

**Figure 2-4: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus biomass production (a), canopy height (b), stem number per plant (c), and stem diameter (d) among and within the three *Miscanthus* species *M. x giganteus*, *M. sacchariflorus*, and *M. sinensis* for the first three years of cultivation**

The phenotypic variability corresponds to the mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to phenotypic variability corresponds to genotypic variability.

The above-ground biomass production was assessed for the winter harvest; the canopy height, stem number per plant, and stem diameter were obtained at the end of the growing season.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

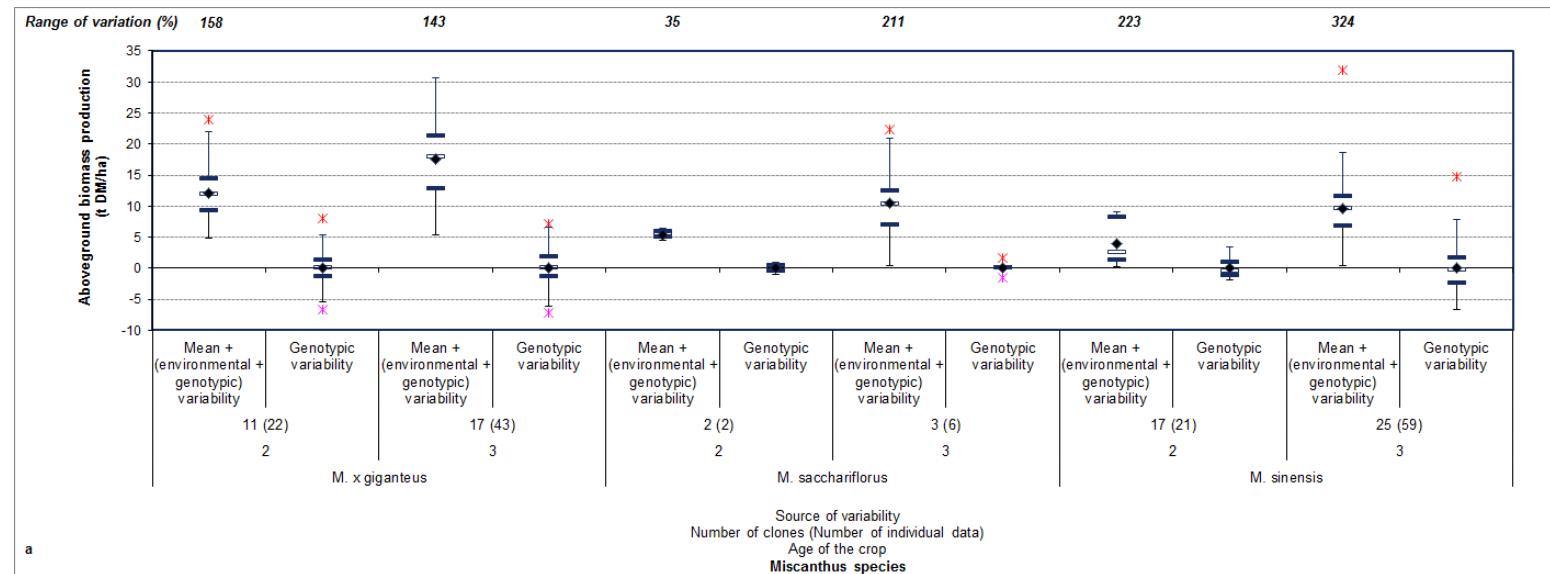
The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and was been expressed as a percentage of the mean.

For each trait, genotypic variability in the *M. sacchariflorus* species during the second year was the same as the phenotypic variability; the two *M. sacchariflorus* genotypes were observed in a single environment.

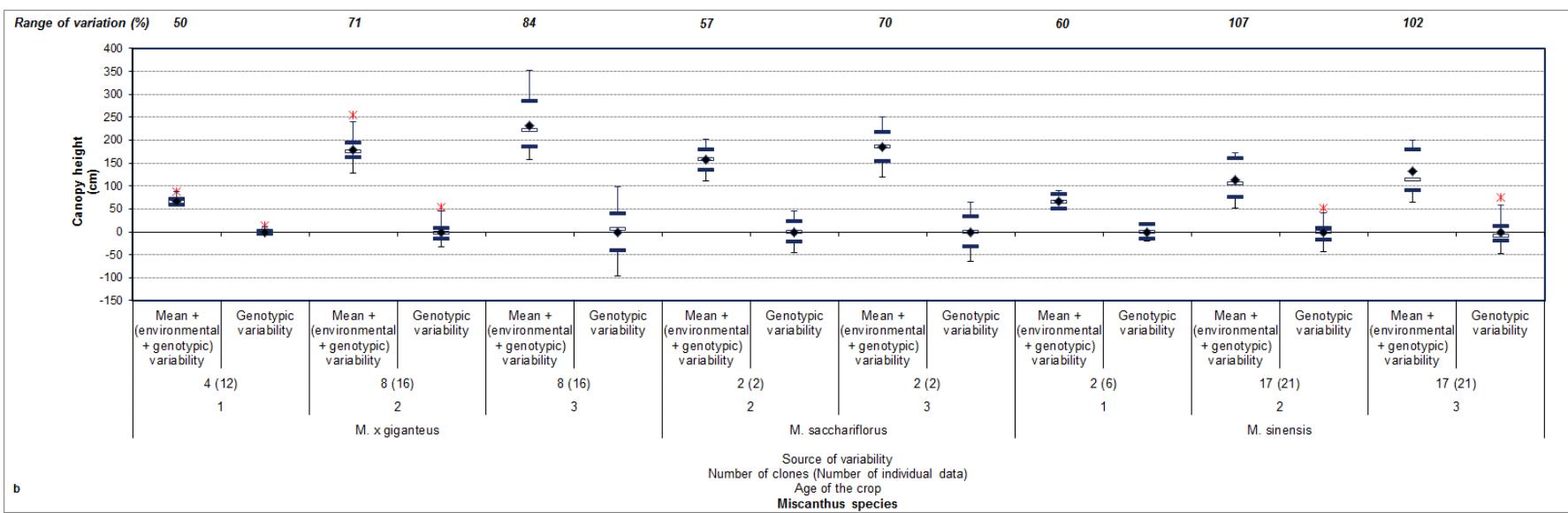
No data were available for canopy height (b), stem number per plant (c), and stem diameter (d) on the first year of cultivation for the *M. sacchariflorus* species in the literature.

*References used in figure 2-4:* (a) Christian et al. (2008), Lewandowski et al. (2003a), Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Mantineo et al. (2009), Amougou et al. (2011), Zub et al. (2011); (b) Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011); (c) Christian et al. (2008), Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011); (d) Jezowski (2008), Jezowski et al. (2011), Zub et al. (2011).

**Chapitre 2 - A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use:  
genotypic and environmental variability and implications for breeding**



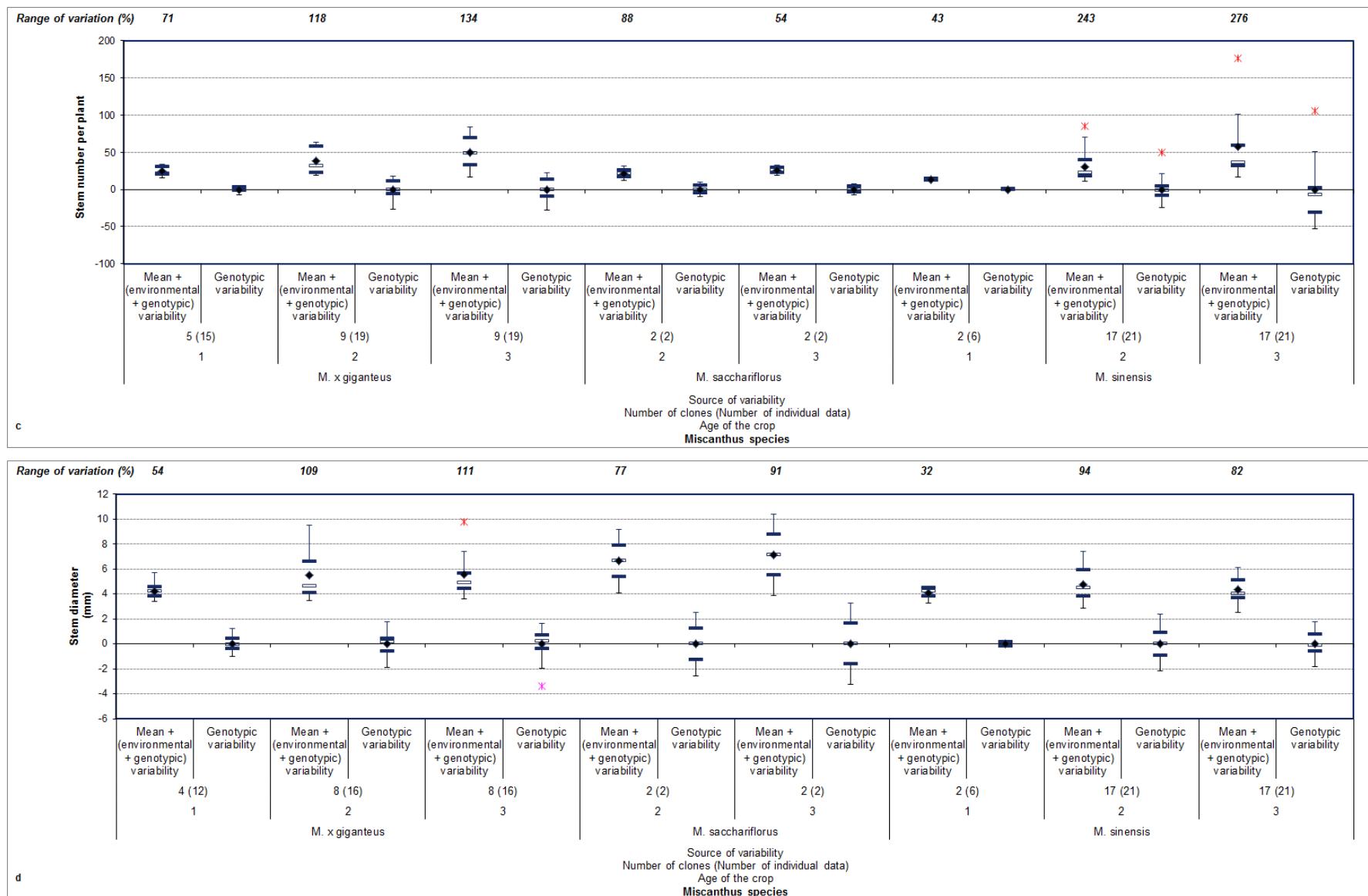
a



b

(Figure 2-4 continued overleaf)

Figure 2-4 (continued)



Finally, ploidy level influenced the biomass production and its components. Glowaka et al. (2010) observed significant but contrasting effects on biomass production and its components from increasing the ploidy level, depending on the genotype. Interestingly, the authors generated polyploid forms for certain genotypes, which showed more dry matter, higher plants, or a greater stem diameter compared with the corresponding controls. The results from Zub et al. (2011) suggest that the miscanthus tetraploid or triploid forms were more productive than the diploid forms, and although the miscanthus forms studied were from distinct backgrounds, they reinforced the results from Glowaka et al. (2010). These results show that a greater ploidy level can improve biomass production.

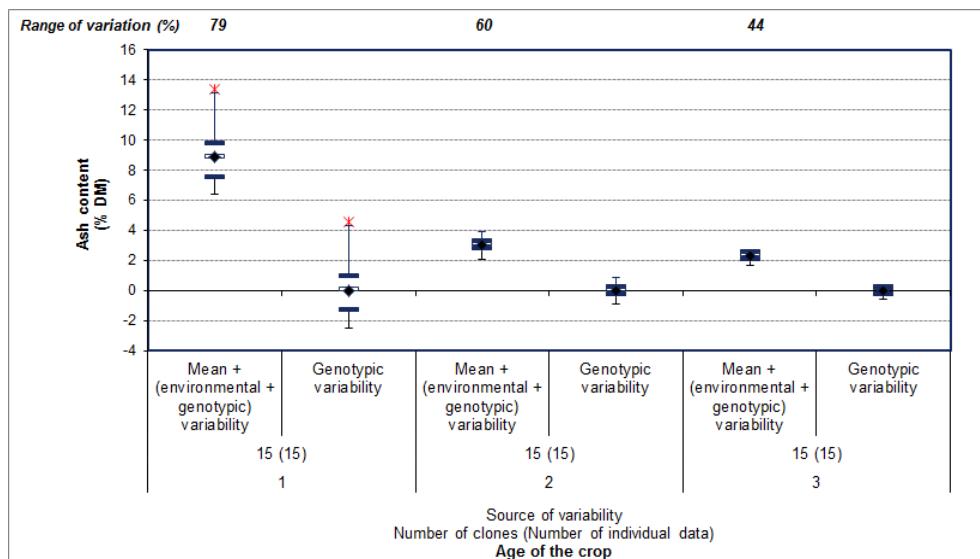
Despite these encouraging results, this investigation must be considered in its context for several reasons. First, the species compared from various environments did not have the same genetic background. Second, the number of clones used differed between the three *Miscanthus* species studied: fewer clones were observed for the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species than the *M. sinensis* species; this could partially explain the lower variability in the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species. Finally, the effect of ploidy level on biomass production and its components seemed to differ based on the genotype.

### **2.3.2 The phenotypic variability for the traits related to biomass composition**

#### **a. The influence of crop age**

Allison et al. (2011) studied the effect of year of cultivation on cellulose, hemicellulose, and lignin contents in miscanthus. Based on their experiments, the authors suggested that miscanthus biomass composition remained relatively consistent over the successive second, third, and fourth years.

Clifton-Brown and Lewandowski (2002) compared several miscanthus clones for ash content in above-ground biomass during the first three years of cultivation. They observed that this content decreased from 8.9 to 2.3 % DM on average between the first and third years during the winter harvest (Figure 2-5). Moreover, with a 79 % range of variation during the first year, the ash content appeared more variable during the first year compared with the second and third years (Figure 2-5).



**Figure 2-5: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus ash content based on the crop age from the first to third year during the winter harvest based on Clifton-Brown and Lewandowski (2002)**

The phenotypic variability corresponds to the mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to the phenotypic variability corresponds to genotypic variability.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and is as a percentage of the mean.

For each of the three years, the genotypic variability equaled the phenotypic variability; the fifteen genotypes were observed in a single environment.

### b. The influence of geographical area

By studying the biomass compositions of 15 *Miscanthus* genotypes in five European locations during the third year of cultivation, Lewandowski et al. (2003a) showed that the ash content in the above-ground biomass varied based on the experiment location. Hodgson et al. (2010b) also highlighted a significant effect from location on cellulose and hemicellulose contents in the above-ground biomass. In contrast, these authors showed that this effect was not significant for lignin content in the above-ground biomass.

The influence of location on biomass composition could be partly explained by climatic conditions. The rainfall differences between locations could cause mineral leaching. Wind force differences between locations could affect the composition due to leaf loss (Lewandowski and Kicherer, 1997).

These observations demonstrated that miscanthus biomass composition differed based on location. However, in contrast to biomass production, for which clear trends between Northern Europe countries and Central/Southern Europe countries have been highlighted (Lewandowski et al., 2003a), no clear trends identified an area that is most suitable for miscanthus biomass composition.

**c. The influence of crop management practices**

▪ **The influence of harvest date**

The cellulose and lignin contents in the above-ground biomass increased from 40.6 to 46.4 % DM and 8.0 to 9.4 % DM on average between the autumn and winter harvests, respectively (Figure 2-6 a, c). In contrast, the hemicellulose content tended decreased between the two harvest dates with the averages 29.4 and 28.8 % DM during the autumn and winter harvests, respectively (Figure 2-6 b). These cellulose, hemicellulose, and lignin contents differences between the autumn and winter harvests could be due to leaf loss between the two harvest dates (Hayes, 2013).

Delaying the harvest time also significantly decreased the ash content (Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Lewandowski et al., 2003a; Baxter et al., 2012) as well as cutting the biomass and leaving it in the field (Meehan et al., 2013). For example, the ash content decreased from 3.9 to 2.5 % DM on average between the autumn and winter harvests during the third year of cultivation (Figure 2-6 d).

In addition, the genotype contribution to phenotypic variability was high for cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents in the above-ground biomass (Figure 2-6).

Finally, with variations ranging from 25 % to 213 % during the third year of cultivation, the cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents were highly variable traits (Figure 2-6). Interestingly, the highest ranges of variation for ash content (145 % and 213 %) showed that this trait was more variable than cellulose, hemicellulose, and lignin contents regardless of the harvest date (Figure 2-6).

(Following page)

**Figure 2-6: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability for above-ground miscanthus cellulose content (a), hemicellulose content (b), lignin content (c), and ash content (d) between the autumn and winter harvests during the third year of cultivation**

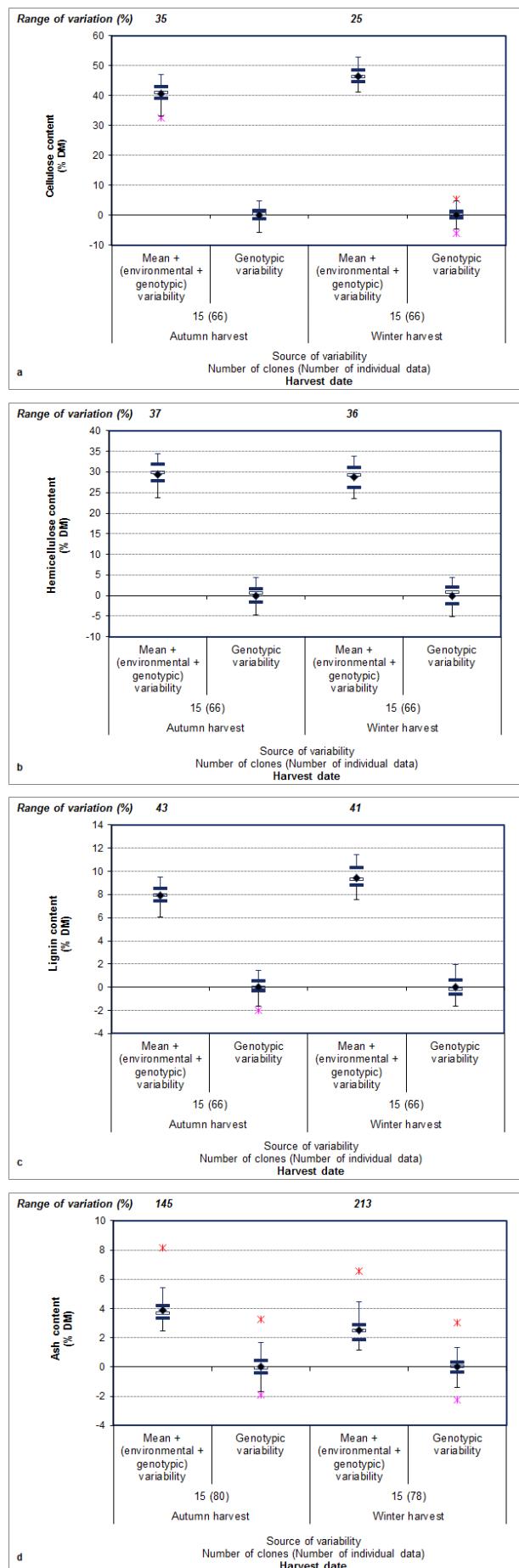
The phenotypic variability corresponds to the mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to phenotypic variability corresponds to the genotypic variability.

Cellulose, hemicellulose, and lignin contents were determined using the Van Soest method as the method of reference.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and is expressed as a percentage of the mean.

*References used in figure 2-6: (a), (b), and (c) Hodgson et al. (2010b); (d) Clifton-Brown and Lewandowski (2002), Lewandowski et al. (2003a).*



- **The influence of nitrogen fertilization**

Hodgson et al. (2010a) showed that the nitrogen input negatively impacted the *M. x giganteus* biomass quality; when nitrogen input increased, the cellulose, hemicellulose, and lignin contents in the above-ground biomass decreased, while ash increased. The authors concluded that low nitrogen fertilization yielded better quality biomass for thermochemical processes. These observations were encouraging as environmentally and economically beneficial and as contributor to cropping system sustainability.

**d. The influence of species**

Differences among *Miscanthus* species were highlighted for cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents during the winter harvest of the third year of cultivation (Figure 2-7).

(Following page)

**Figure 2-7: The phenotypic variability and genotype contribution to the phenotypic variability in miscanthus among and within the three *Miscanthus* species *M. x giganteus*, *M. sacchariflorus* and *M. sinensis* for cellulose content (a), hemicellulose content (b), lignin content (c), and ash content (d) in the above-ground biomass during winter harvest in the third year of cultivation**

The phenotypic variability corresponds to mean + (environmental + genotypic variability); the genotype contribution to the phenotypic variability corresponds to genotypic variability.

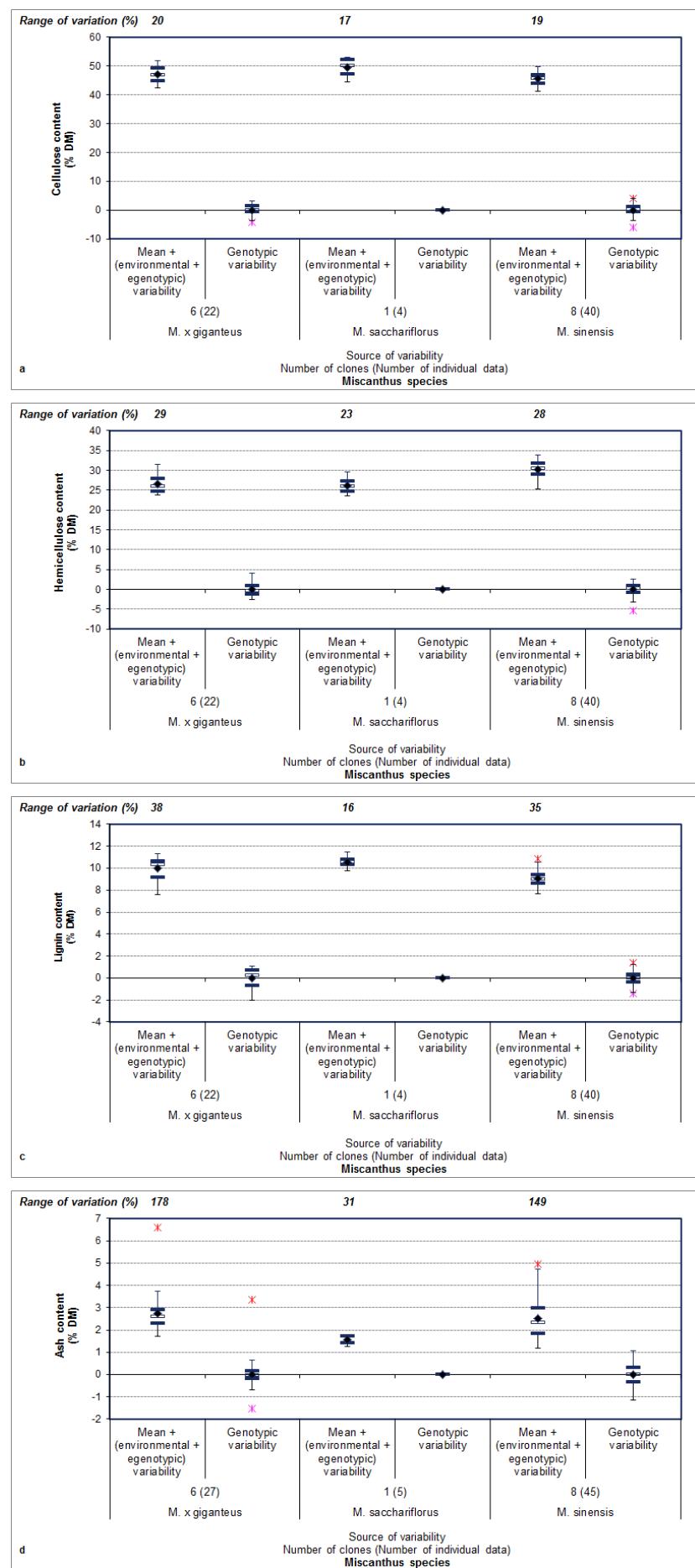
The cellulose, hemicellulose, and lignin content were determined using the Van Soest method as the method of reference.

The mean value (indicated by the black diamond) was calculated from the individual data collected in the literature for each year of cultivation. The ends of the vertical lines correspond to the minimum and maximum values, the black horizontal lines correspond to the upper and lower quartiles, and the white horizontal lines correspond to the median for each year of cultivation. The stars on both sides of the black horizontal lines correspond to the outlier values.

The range of variation corresponds to the difference between the maximum and minimum values and is expressed as a percentage of the mean.

For each trait, the genotypic variability of the *M. sacchariflorus* species equaled zero; only one *M. sacchariflorus* genotype was observed.

*References used in figure 2-7:* (a), (b), and (c) Hodgson et al. (2010b); (d) Clifton-Brown and Lewandowski (2002), Lewandowski et al. (2003a).



With the average values 47.3 and 49.4 % DM, respectively, the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species appeared to contain more cellulose than the *M. sinensis* species (Figure 2-7 a). Moreover, with the average values 10.0 and 10.6 % DM, respectively, the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species also seemed to exhibited higher lignin content than the *M. sinensis* species (Figure 2-7 c). In contrast, with the average value 30.2 % DM, the *M. sinensis* species exhibited higher hemicellulose content than the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species (Figure 2-7 b). Finally, with the average value 1.6 % DM, the *M. sacchariflorus* species exhibited lower ash content in the above-ground biomass than the *M. x giganteus* and *M. sinensis* species (Figure 2-7 d).

In addition, range of variation seemed variable based on the *Miscanthus* species and its traits. The range of variation for the cellulose and hemicellulose contents seemed to be the same as for the *M. x giganteus*, *M. sinensis*, and *M. sacchariflorus* species. In contrast, the range of variation for the lignin and ash contents appeared significantly lower for the *M. sacchariflorus* species than for the *M. x giganteus* and *M. sinensis* species. Among the traits studied, the ash content seemed the most variable trait with a range of variation of up to 178 % compared to the cellulose, hemicellulose, and lignin contents in the above-ground biomass (Figure 2-7).

Finally, for each trait, the portion of phenotypic variability due to the genotype was high, except for the *M. sacchariflorus* species, for which a single clone has been studied (Figure 2-7).

The biomass composition observations among the *Miscanthus* species can only be considered trends because only few clones were used in the studies reported in Figure 2-7, wherein only a single *M. sacchariflorus* clone, 6 *M. x giganteus* clones, and 8 *M. sinensis* clones were used.

Interestingly, certain *Miscanthus* clones showed high cellulose and hemicellulose contents, and low lignin and ash contents. Certain *M. sinensis* clones presented lower minimal ash content than *M. sacchariflorus* clones (Figure 2-7 d): Clifton-Brown and Lewandowski (2002) and Lewandowski et al. (2003a) identified two *M. sinensis* clones (Sin-11 and Sin-15) with the lowest ash content. Moreover, one *M. x giganteus* clone (EMI08) studied in England by Hodgson et al. (2010b) showed lower minimum lignin content than *M. sinensis* clones (Figure 2-7 c).

These observations suggest that certain *Miscanthus* species or clones are useful for breeding programs considering biomass composition. In addition, two papers reinforced the suggestions based on these data: the study by Allison et al. (2011) which did not indicate individual values, and the study by Hodgson et al. (2011) which concerned older crops that were nine years old.

### **2.3.3 Key points and conclusions on phenotypic variability for miscanthus biomass production and biomass composition**

The present review shows that the traits of interest related to biomass production and biomass composition were generally highly variable for miscanthus. Among these traits, above-ground biomass production and stem number per plant appeared more variable than canopy height and stem diameter with values up to 300 % during the third year, the range of variation for the above-ground biomass production and stem number per plant were approximately 2-fold greater than the range of variation for the canopy height and stem diameter. Interestingly, for the biomass composition, the ash content in the above-ground biomass appeared to be the most variable trait; with values that could reach over 200 %, the range of variation for ash content reached levels 5-fold greater than the range of variation for cellulose, hemicellulose, and lignin contents. Moreover, the genotype contribution to the phenotypic variability was high for each trait studied.

Therefore, the high phenotypic variability for the traits studied and high genotype contribution to the variability were important for enhancing miscanthus breeding for bioenergy.

In addition, most of the factors of variation investigated in this review influenced the traits related to biomass production and biomass composition and, therefore, must be considered in breeding programs.

Miscanthus biomass production and canopy height appeared to mainly be influenced by crop age. With the maximum mean up to 13.0 t DM/ha and 176 cm during the third year of cultivation, the biomass production and canopy height may be approximately 2.2- and 2.7-fold greater for a three-year-old crop than a one-year-old crop, respectively.

Similarly, the stem number per plant seemed mainly affected by the crop age and species. i) With the maximum mean at 53 stems per plant in a three-year-old crop, the stem number per plant increased 2.5-fold from the first to third year, and ii) in comparison, with the maximum mean 58 stems in the *M. sinensis* species, the stem number per plant was 2.2-fold greater in the *M. sinensis* species than in the *M. sacchariflorus* species, which showed the lowest mean in the third year of cultivation.

The stem diameter appeared to mainly be influenced by species; with the maximum mean 7.2 mm for the *M. sacchariflorus* species, the stem diameter was 1.6-fold greater than for the *M. sinensis* species, which showed the lowest mean during the third year of cultivation.

For biomass composition, the cellulose, hemicellulose, and lignin contents in the above-ground biomass appeared to be, at a same level, most affected by the harvest date and species, while it was not affected by crop age.

With a 46.4 % DM average during the winter harvest, the cellulose content was 1.1-fold greater during the winter harvest than the autumn harvest during the third year of cultivation. Similarly, with a 9.4 % DM average during the winter harvest, the lignin content was 1.2-fold higher during the winter harvest than the autumn harvest during the third year of cultivation. In contrast, with the mean 28.8 % DM during the winter harvest, the hemicellulose content was similar during the winter and autumn harvests in the third year of cultivation. In comparison, with means up to 49.4 % DM and 10.6 % DM in *M. sacchariflorus* species, the cellulose and lignin contents were, respectively, 1.1- and 1.2-fold greater in this species than in the *M. sinensis* species, which exhibited the lowest average values. With the maximum mean 30.2 % DM in the *M. sinensis* species, the hemicellulose content was 1.2-fold greater in this species than in the *M. sacchariflorus* species, which exhibited the lowest average value.

The ash content in the above-ground miscanthus biomass appeared mainly affected by the crop age. With the average 2.3 % DM in a three-year-old crop, the ash content can decrease by 3.9 from the first to the third year.

Therefore, developing miscanthus as sustainable feedstock for bioenergy required tackling such factors that influence traits related to biomass production and composition.

With bioenergy use as the breeding objective, the phenotypic variability, the genotype contribution to this variability, and the factors of variation investigated in the present review yielded guidelines (i) to select the traits for consideration in breeding programs, (ii) to propose the miscanthus species or clones that appear interesting as progenitors for breeding, and (iii) to select the optimal crop age, crop management practices, or geographical areas.

## **2.4 Implications for miscanthus breeding considering the industrial requirements for bioenergy use**

Few studies have investigated the ability to transform lignocellulosic crops through the different bioenergy conversion processes on an industrial scale. However, the researchers and industrial companies involved in recent bioenergy projects have begun to generate more precise requirements for optimizing lignocellulosic crop biomass production and composition.

**Table 2-3: Summary of the requirements expected in the industry for lignocellulosic crop biomass production and composition for each biomass conversion process to produce bioenergy (a) and *Miscanthus* species characteristics relevant to biomass production and composition based on the observations in this review (b)**

a

Biomass conversion process	Type of conversion	Bioenergy end-use	Trait				
			Aboveground biomass production per hectare	Cellulose content	Hemicellulose content	Lignin content	Ash content
Thermochemical	Combustion, pyrolysis, or gasification (syngas)	Heat, electricity, cogeneration, or biofuels	+	na	na	+	-
Biochemical	Fermentation, hydrolysis, or methanation (biogas)	Heat, electricity, cogeneration, or biofuels	+	+	+	-	-

b

Biomass conversion process	Type of conversion	Bioenergy end-use	Trait				
			Aboveground biomass production per hectare	Cellulose content	Hemicellulose content	Lignin content	Ash content
Thermochemical	Combustion, pyrolysis, or gasification (syngas)	Heat, electricity, cogeneration, or biofuels	+ : Gig, Sin (some clones) - : Sacc, Sin			+ : Gig, Sacc - : Sin, Gig (some clones)	+ : Gig, Sin - : Sacc, Sin (some clones)
Biochemical	Fermentation, hydrolysis, or methanation (biogas)	Heat, electricity, cogeneration, or biofuels	+ : Gig, Sin (some clones) - : Sacc, Sin	+ : Gig, Sacc - : Sin	+ : Sin - : Gig, Sacc	+ : Gig, Sacc - : Sin, Gig (some clones)	+ : Gig, Sin - : Sacc, Sin (some clones)

+ corresponded to high value; - corresponded to low value; na: data not available

First, for biomass production, the industry supports the notion that biomass production per hectare must be maximized under various climates with a lower environmental footprint for both biomass conversion processes: biochemical and thermochemical processes (Table 2-3 a).

Second, although the lignocellulosic crop biomass composition requirements have not been fully defined by the industry, data are available from several private partners or publications. These data concern cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents in above-ground biomass, which are considered the main traits that impact biomass conversion efficiency.

Lignin and ash content appear to be the main traits that affect thermochemical process efficiency. High lignin content is preferable for this process because high lignin content aids in improving calorific value (Fahmi et al., 2008; Hodgson et al., 2010a; Hodgson et al., 2010b) (Table 2-3 a). In contrast, low ash content is preferred, especially for combustion, as it implies a more efficient combustion processes, higher heating values, lower NOx emissions, and, thus, lower combustion costs (Lewandowski and Kicherer, 1997; Lewandowski et al., 2003a) (Table 2-3 a).

Cell wall composition and, more particularly, cellulose, hemicelluloses, and lignins appear to be the main traits that affect biochemical process efficiency. The cell wall composition and its digestibility must be optimized to ensure high sugar extraction efficiency in biochemical processes (Jakob et al., 2009; Zhao et al., 2012). Among cellulose, hemicelluloses, and lignins, lignins seem the main restrictive factors because they apparently limit microbial accessibility of fermentable sugars stored in the cell wall during fermentation (Boudet et al., 2003; Klimiuk et al., 2010; Monlau et al., 2013). Cellulose and hemicellulose contents also affect the efficiency of such processes during hydrolysis or fermentation (Jakob et al., 2009; Slavov et al., 2013). Based on these observations and the initial results from recent projects, the industry expects high cellulose and hemicellulose contents but low lignin and ash contents to enhance the efficiency of biochemical processes (Colonna, Dumas, personal communication, Monlau et al., 2012) (Table 2-3 a). However, a favorable balance between lignin, cellulose, and hemicellulose for this process has not been fully defined because (i) data for the influence of biomass composition on this process' efficiency have not been published, and (ii) the methods used to assess biomass cell wall components differ, are not standardized, and yield variable results (Jakob et al., 2009).

All these industrial requirements regarding biomass production and composition as well as the high genotypic variability described for these miscanthus traits herein aid in proposing guidelines for developing miscanthus breeding programs to produce bioenergy.

Firstly, the industry must maximize lignocellulosic crop biomass production for each bioenergy conversion process (Table 2-3 a). Based on the current investigation, breeding programs must include developing varieties that (i) reach their maximum production potential per hectare in a specific

environment and (ii) are adapted to a wide range of climates. Among the three *Miscanthus* species studied in this review, the *M. x giganteus* species and certain *M. sinensis* species clones appear particularly interesting because they produce a high quantity of biomass per hectare (Table 2-3 b). Although the *M. sacchariflorus* species and *M. sinensis* species produce lower biomass per hectare on average than the *M. x giganteus* species (Table 2-3 b), these species can offer progenitors for breeding programs because they are adapted to a wider range of climates than *M. x giganteus*. Moreover, breeding programs must consider nitrogen and water use efficiencies for a low environmental impact. In addition, traits such as canopy height, stem number per plant, or stem diameter must be considered in miscanthus breeding programs because these traits correlate with biomass production (Jezowski, 2008; Zub et al., 2011).

Secondly, although the industrial requirements for lignocellulosic crop biomass composition have not been fully defined, these requirements appear to contrast based on the conversion processes (Table 2-3 a). Therefore, currently, improving biomass composition is the most important challenge for bioenergy breeding programs to improve the efficiency and economic expense of conversion processes (Jakob et al., 2009). Based on the present review, we conclude that the species to consider may differ based on the conversion process. A given *Miscanthus* species may be suitable for one conversion process but not another. For thermochemical processes, such as combustion, pyrolysis, or gasification, the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species seemed better adapted than the *M. sinensis* species due to their high lignin content (Table 2-3 b). For biochemical processes, such as hydrolysis, fermentation, or methanation, the *M. x giganteus* and *M. sacchariflorus* species were also interesting because they had high cellulose content. However, these species also had high lignin content, which can reduce efficiency for these processes (Table 2-3 b); therefore, they were not entirely suitable. One *M. x giganteus* clone (EMI08) and the *M. sinensis* species showed lower lignin content and, therefore, may be particularly interesting for improving lignin content from biochemical processes in breeding programs (Table 2-3 b). As low ash content is more suitable for all of these processes (Table 2-3 a), it may also be interesting to consider the *M. sacchariflorus* species for improving this trait because this species contained less ash than the *M. x giganteus* and *M. sinensis* species (Table 2-3 b). The two *M. sinensis* clones (sin-11 and sin-15) also appeared interesting because they had the lowest ash content.

In addition to these guidelines, other factors that influence miscanthus biomass production and composition must be considered. The variability described in this reviews allow us to suggest that mature miscanthus crops are more suitable than younger crops for these processes due to (i) the maximum canopy height, stem number, and biomass production as well as (ii) the lower ash content. Moreover, for thermochemical processes and, more particularly, combustion, delaying the miscanthus harvest date from autumn to winter yielded a better biomass composition, which leads

to better combustion efficiency (Lewandowski and Kicherer, 1997). Hodgson et al. (2010b) also predicted that the winter harvest is more suitable for thermochemical processes because the calorific value of the winter-harvested biomass should increase. Finally, delaying the harvest date decreased the drying and transport expenses because the moisture content was lower for the winter harvest. Therefore, the winter miscanthus harvest appeared more economical than the autumn harvest for such conversion processes (Van den Heuvel, 1995; Huisman et al., 1997). Interestingly, the crop age and harvest date recommendations are consistent with recommendations from agronomical and environmental perspectives (Brancourt-Hulmel et al., 2014).

## 2.5 Prospects

The present review provides relevant information on genotypic and environmental variability for the biomass production and composition of the three *Miscanthus* species which gained most of the attention today. The broad genotypic variability in these traits shows that the potential for improving miscanthus as a bioenergy feedstock is great. However, miscanthus is a recent undomesticated crop; this review shows that little information on miscanthus biomass production and composition has been reported compared with major crops, and it must be genetically improved. Therefore, more information is necessary.

The relationships between the traits related to biomass production and composition that have not been studied for miscanthus until now must be investigated. It is important to improve the biomass composition while at least maintaining the biomass production. Moreover, little information about the heritability has been reported up to now. Heritability for these traits must be thoroughly investigated in the future. The present review showed extreme clones for many traits of interest, which can guide the breeder to create the relevant populations for assessing such estimates of heritability. In addition, miscanthus germplasm collections must be developed because the current collections do not cover the broad genetic diversity in the *Miscanthus* genus. Exploring *Miscanthus* species other than the three *Miscanthus* species discussed herein may be promising for assessing new and interesting variables for miscanthus breeding. In addition, the breeding considerations for biomass composition should be accompanied by a complete definition of the industrial requirements for the different bioenergy conversion processes.

Finally, the results from the present investigation on miscanthus can be extrapolated to other monocotyledons or perennial crops that are close to miscanthus from a taxonomic perspective; sugarcane, sorghum, or maize are also promising feedstock candidates for bioenergy production.

Enhancing other lignocellulosic crops is particularly interesting for the industry. The most sustainable scenario currently proposed includes developing crop areas close to local facilities. The most suitable feedstock for each facility will have to fulfil a continuous supply of the facility and will depend on the area's climatic and soil conditions. Therefore, this feedstock will be composed not only of a single crop but a set of several crops specifically adapted to the production area and harvested at different times throughout the year to continuously supply the facilities.

## **Acknowledgements**

The authors acknowledge the FUTUROL project, which supported this work. We particularly thank to Catherine Bastien for her helpful comments on the manuscript and for asking the relevant question that initiated this manuscript. We also thank Isabelle Lejeune-Hénaut, Catherine Giauffret, Marion Zapater, Jean Carpentier, and the anonymous reviewers for their valuable recommendations.

## **References**

- Acaroglu, M., and Aksoy, A.S. 2005.** The cultivation and energy balance of *Miscanthus x giganteus* production in Turkey. *Biomass & Bioenergy* 29:42-48.
- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of *Miscanthus*. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Amougou, N., Bertrand, I., Machet, J.M., and Recous, S. 2011.** Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization. *Plant and Soil* 338:83-97.
- Angelini, L.G., Ceccarini, L., Di Nassa, N.N.O., and Bonari, E. 2009.** Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass & Bioenergy* 33:635-643.
- Arundale, R., Dohleman, F., Voigt, T., and Long, S. 2014a.** Nitrogen Fertilization Does Significantly Increase Yields of Stands of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* in Multiyear Trials in Illinois. *Bioenergy Research*:1-9.
- Arundale, R.A., Dohleman, F.G., Heaton, E.A., McGrath, J.M., Voigt, T.B., and Long, S.P. 2014b.** Yields of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* decline with stand age in the Midwestern USA. *Global Change Biology Bioenergy* 6:1-13.
- Baxter, X.C., Darvell, L.I., Jones, J.M., Barraclough, T., Yates, N.E., and Shield, I. 2012.** Study of *Miscanthus x giganteus* ash composition - Variation with agronomy and assessment method. *Fuel* 95:50-62.
- Beale, C.V., Bint, D.A., and Long, S.P. 1996.** Leaf photosynthesis in the C-4-grass *Miscanthus x giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England. *Journal of Experimental Botany* 47:267-273.
- Behnke, G.D., David, M.B., and Voigt, T.B. 2012.** Greenhouse Gas Emissions, Nitrate Leaching, and Biomass Yields from Production of *Miscanthus x giganteus* in Illinois, USA. *Bioenergy Research* 5:801-813.
- Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., and Goffner, D. 2003.** Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8:576-581.
- Brancourt-Hulmel, M., Demay, C., Rosiau, E., Ferchaud, F., Bethencourt, L., Arnoult, S., Dauchy, C., Beaudoin, N., and Boizard, H. 2014.** *Miscanthus* Genetics and Agronomy for Bioenergy Feedstock, in: Karlen, D.L. (Ed.), *Cellulosic Energy Cropping Systems*. 2014 Wiley J & Sons, Ltd, United Kingdom, pp. 43-74.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.-M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., and Mary, B. 2014.** Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6:425-438.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Preudhomme, M., Demay, C., Fourdinier, E., Strullu, L., Mary, B., Machet, J.M., Boizard, H., and Gosse, G. 2010.** Production de biomasse et impacts environnementaux des cultures énergétiques, Colloque final du programme REGIX, Lyon, France, pp. 27-39.
- Cadoux, S., Riche, A.B., Yates, N.E., and Machet, J.-M. 2012.** Nutrient requirements of *Miscanthus x giganteus*: Conclusions from a review of published studies. *Biomass and Bioenergy* 38:14-22.
- Christian, D.G., and Haase, E. 2001.** Agronomy of miscanthus, in: Jones, M.B., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 21-45.
- Christian, D.G., Riche, A.B., and Yates, N.E. 2008.** Growth, yield and mineral content of *Miscanthus x giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops and Products* 28:320-327.

- Clifton-Brown, J., Long, S.P., and Jorgensen, U.** 2001a. Miscanthus productivity, in: Jones, M., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 46-67.
- Clifton-Brown, J.C., Chiang, Y.C., and Hodkinson, T.R.** 2008. Miscanthus: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production., in: Vermerris, W. (Ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, USA, pp. 273-294.
- Clifton-Brown, J.C., and Lewandowski, I.** 2002. Screening Miscanthus genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* 16:97-110.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F.** 2001b. Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Clifton-Brown, J.C., Stampfli, P.F., and Jones, M.B.** 2004. Miscanthus biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology* 10:509-518.
- Cosentino, S.L., Patane, C., Sanzone, E., Copani, V., and Foti, S.** 2007. Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25:75-88.
- Dagnelie, P.** 1969. Théorie et méthodes statistiques. Presses agronomiques, Gembloux, Belgique.
- Danalatos, N.G., Archontoulis, S.V., and Mitsios, I.** 2007. Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus x giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass & Bioenergy* 31:145-152.
- de Cesare, M., Hodkinson, T.R., and Barth, S.** 2010. Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for *Miscanthus*, *Saccharum* and related grasses (Panicoideae, Poaceae). *Molecular Breeding* 26:539-544.
- Dillen, S.Y., Djomo, S.N., Al Afas, N., Vanbeveren, S., and Ceulemans, R.** 2013. Biomass yield and energy balance of a short-rotation poplar coppice with multiple clones on degraded land during 16 years. *Biomass and Bioenergy* 56:157-165.
- Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Arundale, R.A., and Long, S.P.** 2012. Seasonal dynamics of above- and below-ground biomass and nitrogen partitioning in *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* across three growing seasons. *GCB Bioenergy* 4:534-544.
- Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Leakey, A.D.B., and Long, S.P.** 2009. Does greater leaf-level photosynthesis explain the larger solar energy conversion efficiency of *Miscanthus* relative to switchgrass? *Plant Cell and Environment* 32:1525-1537.
- Dohleman, F.G., and Long, S.P.** 2009. More Productive Than Maize in the Midwest: How Does *Miscanthus* Do It? *Plant Physiology* 150:2104-2115.
- ECF.** 2010. Roadmap 2050: A Practical Guide to a Prosperous, Low-Carbon Europe, Technical Analysis.100 p.
- Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., and Bonari, E.** 1999. Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of *Miscanthus*. *Field Crops Research* 63:3-11.
- EREC.** 2010. RE-thinking 2050, A 100% Renewable Energy Vision for the European Union.76 p.
- Eurelectric.** 2011. Power Choices Pathways to Carbon-Neutral Electricity in Europe by 2050, Full Report, Union of the Electricity Industry.100 p.
- Fahmi, R., Bridgwater, A., Donnison, I., Yates, N., and Jones, J.M.** 2008. The effect of lignin and inorganic species in biomass on pyrolysis oil yields, quality and stability. *Fuel* 87:1230-1240.
- Gauder, M., Graeff-Hönninger, S., Lewandowski, I., and Claupein, W.** 2012. Long-term yield and performance of 15 different *Miscanthus* genotypes in southwest Germany. *Annals of Applied Biology* 160:126-136.
- Glowacka, K., Jezowski, S., and Kaczmarek, Z.** 2010. In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Industrial Crops and Products* 32:88-96.

- Greef, J.M., and Deuter, M. 1993.** SYNTAXONOMY OF MISCANTHUS-X-GIGANTEUS GREEF-ET-DEU. *Angewandte Botanik* 67:87-90.
- Greef, J.M., Deuter, M., Jung, C., and Schondelmaier, J. 1997.** Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:185-195.
- Greenpeace. 2013.** Scénario de transition énergétique.27 p.
- Haines, S.A., Gehl, R.J., Havlin, J.L., and Ranney, T.G. 2014.** Nitrogen and Phosphorus Fertilizer Effects on Establishment of Giant *Miscanthus*. *Bioenergy Research*:1-11.
- Hastings, A., Clifton-Brown, J., Wattenbach, M., Stampfl, P., Mitchell, C.P., and Smith, P. 2008.** Potential of *Miscanthus* grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 28:465-472.
- Hayes, D.J.M. 2013.** Mass and compositional changes, relevant to biorefining, in *Miscanthus x giganteus* plants over the harvest window. *Bioresource Technology* 142:591-602.
- Heaton, E., Voigt, T., and Long, S.P. 2004.** A quantitative review comparing the yields of two candidate C-4 perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass & Bioenergy* 27:21-30.
- Heaton, E.A., Dohleman, F.G., and Long, S.P. 2008.** Meeting US biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. *Global Change Biology* 14:2000-2014.
- Himken, M., Lammel, J., Neukirchen, D., CzypionkaKrause, U., and Olfs, H.W. 1997.** Cultivation of *Miscanthus* under west European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant and Soil* 189:117-126.
- Hodgson, E.M., Fahmi, R., Yates, N., Barracough, T., Shield, I., Allison, G., Bridgwater, A.V., and Donnison, I.S. 2010a.** *Miscanthus* as a feedstock for fast-pyrolysis: Does agronomic treatment affect quality? *Bioresource Technology* 101:6185-6191.
- Hodgson, E.M., Lister, S.J., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J., and Donnison, I.S. 2010b.** Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass & Bioenergy* 34:652-660.
- Hodgson, E.M., Nowakowski, D.J., Shield, I., Riche, A., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J.C., and Donnison, I.S. 2011.** Variation in *Miscanthus* chemical composition and implications for conversion by pyrolysis and thermo-chemical bio-refining for fuels and chemicals. *Bioresource Technology* 102:3411-3418.
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Takahashi, C., Leitch, I.J., Bennett, M.D., and Renvoize, S.A. 2002.** The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany* 89:279-286.
- Huisman, W., Venturi, P., and Molenaar, J. 1997.** Costs of supply chains of *Miscanthus giganteus*. *Industrial Crops and Products* 6:353-366.
- Hulle, S., Waes, C., Vliegher, A., Baert, J., and Muylle, H. 2012.** Comparison of dry matter yield of lignocellulosic perennial energy crops in a long-term Belgian field experiment, in: Golinski, P., Warda, M., Stypinski, P. (Eds.), *Grassland - a European resource?* Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation, Lublin, Poland, 3-7 June 2012. Polskie Towarzystwo akarskie (Polish Grassland Society), Poznan, Poland, pp. 499-501.
- IEA/OECD. 2006.** Perspectives des Technologies de l'Energie, Scénarios et Stratégies à l'horizon 2050, Synthèse et Implications Stratégiques.15 p.
- Jakob, K., Zhou, F.S., and Paterson, A. 2009.** Genetic improvement of C4 grasses as cellulosic biofuel feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45:291-305.
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of *Miscanthus* in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Jezowski, S., Glowacka, K., and Kaczmarek, Z. 2011.** Variation on biomass yield and morphological traits of energy grasses from the genus *Miscanthus* during the first years of crop establishment. *Biomass & Bioenergy* 35:814-821.

- Kalembasa, D., Jezowski, S., Pude, R., and Malinowska, E. 2005.** The content of carbon, hydrogen and nitrogen in different development stage of some clones of Miscanthus. Polish Journal of Soil Science 38:169-177.
- Karp, A., and Shield, I. 2008.** Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. New Phytologist 179:15-32.
- Kim, S.J., Kim, M.Y., Jeong, S.J., Jang, M.S., and Chung, I.M. 2012.** Analysis of the biomass content of various Miscanthus genotypes for biofuel production in Korea. Industrial Crops and Products 38:46-49.
- Klimiuk, E., Pokoj, T., Budzynski, W., and Dubis, B. 2010.** Theoretical and observed biogas production from plant biomass of different fibre contents. Bioresource Technology 101:9527-9535.
- Larsen, S.U., Jorgensen, U., Kjeldsen, J.B., and Laerke, P.E. 2014.** Long-Term Miscanthus Yields Influenced by Location, Genotype, Row Distance, Fertilization and Harvest Season. Bioenergy Research 7:620-635.
- Le Ngoc Huyen, T., Rémond, C., Dheilly, R.M., and Chabbert, B. 2010.** Effect of harvesting date on the composition and saccharification of Miscanthus x giganteus. Bioresource Technology 101:8224-8231.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. Agronomy Journal 95:1274-1280.
- Lewandowski, I., and Heinz, A. 2003.** Delayed harvest of miscanthus - influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. European Journal of Agronomy 19:45-63.
- Lewandowski, I., and Kicherer, A. 1997.** Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of Miscanthus x giganteus. European Journal of Agronomy 6:163-177.
- Lewandowski, I., and Schmidt, U. 2006.** Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. Agriculture Ecosystems & Environment 112:335-346.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., and Christou, M. 2003b.** The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. Biomass & Bioenergy 25:335-361.
- Mantino, M., D'Agosta, G.M., Copani, V., Patane, C., and Cosentino, S.L. 2009.** Biomass yield and energy balance of three perennial crops for energy use in the semi-arid Mediterranean environment. Field Crops Research 114:204-213.
- Meehan, P.G., Finn, J.M., and Mc Donnell, K.P. 2013.** The effect of harvest date and harvest method on the combustion characteristics of Miscanthus x giganteus. Global Change Biology Bioenergy 5:487-496.
- Miguez, F.E., Villamil, M.B., Long, S.P., and Bollero, G.A. 2008.** Meta-analysis of the effects of management factors on Miscanthus x giganteus growth and biomass production. Agricultural and Forest Meteorology 148:1280-1292.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., and Carrere, H. 2013.** Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 43:260-322.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P., and Carrere, H. 2012.** Predictive Models of Biohydrogen and Biomethane Production Based on the Compositional and Structural Features of Lignocellulosic Materials. Environmental Science & Technology 46:12217-12225.
- Mos, M., Banks, S.W., Nowakowski, D.J., Robson, P.R.H., Bridgwater, A.V., and Donnison, I.S. 2013.** Impact of Miscanthus x giganteus senescence times on fast pyrolysis bio-oil quality. Bioresource Technology 129:335-342.

**Chapitre 2 - A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding**

- Nissim, W.G., Pitre, F.E., Teodorescu, T.I., and Labrecque, M. 2013.** Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. *Biomass & Bioenergy* 56:361-369.
- Palmer, I.E., Gehl, R.J., Ranney, T.G., Touchell, D., and George, N. 2014.** Biomass yield, nitrogen response, and nutrient uptake of perennial bioenergy grasses in North Carolina. *Biomass & Bioenergy* 63:218-228.
- Qin, J., Yang, Y., Jiang, J., Yi, Z., Xiao, L., Ai, X., and Chen, Z. 2012.** Comparison of lignocellulose composition in four major species of Miscanthus. *African Journal of Biotechnology* 11:12529-12537.
- Rabelo, S.C., Carrere, H., Filho, R.M., and Costa, A.C. 2011.** Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 102:7887-7895.
- Sanderson, M.A., and Adler, P.R. 2008.** Perennial forages as second generation bioenergy crops. *International Journal of Molecular Sciences* 9:768-788.
- Slavov, G., Allison, G., and Bosch, M. 2013.** Advances in the genetic dissection of plant cell walls: tools and resources available in Miscanthus. *Front. Plant Sci.* 4:217.
- Souza, A., Grandis, A., Leite, D.C., and Buckeridge, M. 2014.** Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *Bioenergy Research* 7:24-35.
- Strullu, L., Cadoux, S., Preudhomme, M., Jeuffroy, M.H., and Beaudoin, N. 2011.** Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by Miscanthus x giganteus as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research* 121:381-391.
- Tayot, X., Chartier, M., Varlet-Grancher, C., and Lemaire, G. 1995.** Potential above-ground dry matter production of miscanthus in north-central France compared to sweet sorghum, in: Chartier, P., Beenackers, A., Grassi, G. (Eds.), *Biomass for energy, environment, agriculture and industry*. Elsevier, Oxford, pp. 556-564.
- Van den Heuvel, E.M.J.T. 1995.** Pretreatment technologies for energy crops. Final Report of Novem Project 355300/0302:69 p.
- Van Hulle, S., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., and Muylle, H. 2010.** Comparison of Different Low-Input Lignocellulosic Crops as Feedstock for Bio-ethanol Production, in: Huyghe, C. (Ed.), *Proceedings of the Conference of the Eucarpia Fodder and Amenity Species Section: Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*, pp. 365-368.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 50:50-55.
- Vermerris, W. 2011.** Survey of Genomics Approaches to Improve Bioenergy Traits in Maize, Sorghum and SugarcaneFree Access. *Journal of Integrative Plant Biology* 53:105-119.
- Wagoner, P. 1990.** PERENNIAL GRAIN DEVELOPMENT - PAST EFFORTS AND POTENTIAL FOR THE FUTURE. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9:381-408.
- Zegada-Lizarazu, W., Parrish, D., Berti, M., and Monti, A. 2013.** Dedicated crops for advanced biofuels: Consistent and diverging agronomic points of view between the USA and the EU-27. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 7:715-731.
- Zhao, X., Zhang, L., and Liu, D. 2012.** Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 6:465-482.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different Miscanthus species at two harvest dates. *Biomass & Bioenergy* 35:637-651.
- Zub, H.W., Arnoult, S., Younous, J., Lejeune-Hénaut, I., and Brancourt-Hulmel, M. 2012a.** The frost tolerance of Miscanthus at the juvenile stage: Differences between clones are influenced by leaf-stage and acclimation. *European Journal of Agronomy* 36:32-40.



## Chapitre 3

### Cadre expérimental, matériel et méthodes



### 3.1 Caractéristiques pédo-climatiques du site experimental

Le site expérimental se situe dans le Nord de la France, sur le site INRA d'Estrées-Mons (49°53 N, 3°00 E). Ce site est caractérisé par un sol de type limon profond (Ortic Luvisol, FAO classification).

Tout au long de l'expérmentation, les données de température et de pluviométrie ont été enregistrées par une station météorologique située à une distance d'un kilomètre de l'essai.

Ces données sont synthétisées pour chaque année dans la Table 3-1 ci-dessous :

**Table 3-1 : Températures moyennes et somme des précipitations durant les années d'expérimentation**

Année de culture	Température moyenne (°C)			Somme des précipitations (mm)		
	Durant la phase de croissance a	Durant la période de dormance b	Annuelle	Durant la phase de croissance a	Durant la période de dormance b	Annuelle
1 (2007-08)	14,8	5,7	11,0	394	248	642
2 (2008-09)	14,5	3,9	10,1	490	163	653
3 (2009-10)	15,0	4,3	10,6	298	280	577
4 (2010-11)	14,4	4,5	10,3	365	224	589
5 (2011-12)	15,4	5,9	11,5	332	236	568
6 (2012-13)	14,3	3,9	10,0	453	224	677

<sup>a</sup> Au vu des conditions expérimentales sur notre dispositif, la période de croissance est comprise entre le 1<sup>er</sup> avril et le 31 octobre

<sup>b</sup> La période de dormance correspond à la période à laquelle le fonctionnement de la plante est ralenti et la mise en réserve des nutriments dans le rhizome est progressive ; cette période est définie entre le 1<sup>er</sup> novembre et le 31 mars au vu des conditions expérimentales sur notre dispositif.

Avec des valeurs comprises entre 10,0°C en 6<sup>ème</sup> année et 11,5°C en 5<sup>ème</sup> année, les températures moyennes annuelles sont similaires entre les différentes années d'expérimentation (Table 3-1). Les températures moyennes enregistrées durant la période de croissance et durant la période de dormance sont également assez proches pour les différentes années (Table 3-1).

Les précipitations annuelles sont variables entre années avec des valeurs comprises entre 568 mm en 5<sup>ème</sup> année et 677 mm en 6<sup>ème</sup> année (Table 3-1). Les précipitations durant la période de croissance sont également variables entre années avec des valeurs comprises entre 298 mm en 3<sup>ème</sup> année et 490 mm en 2<sup>ème</sup> année. A noter que les 3<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> années se démarquent des autres avec les plus faibles précipitations annuelles (577 et 568 mm respectivement) mais également avec les plus faibles précipitations durant la période de croissance (298 mm et 332 mm respectivement). Les différences entre années pour les précipitations durant la période de dormance sont moins marquées (Table 3-1).

Les variations mensuelles de température et de pluviométrie pour chaque année d'étude sont présentées dans la Figure 3-1 ci-dessous :

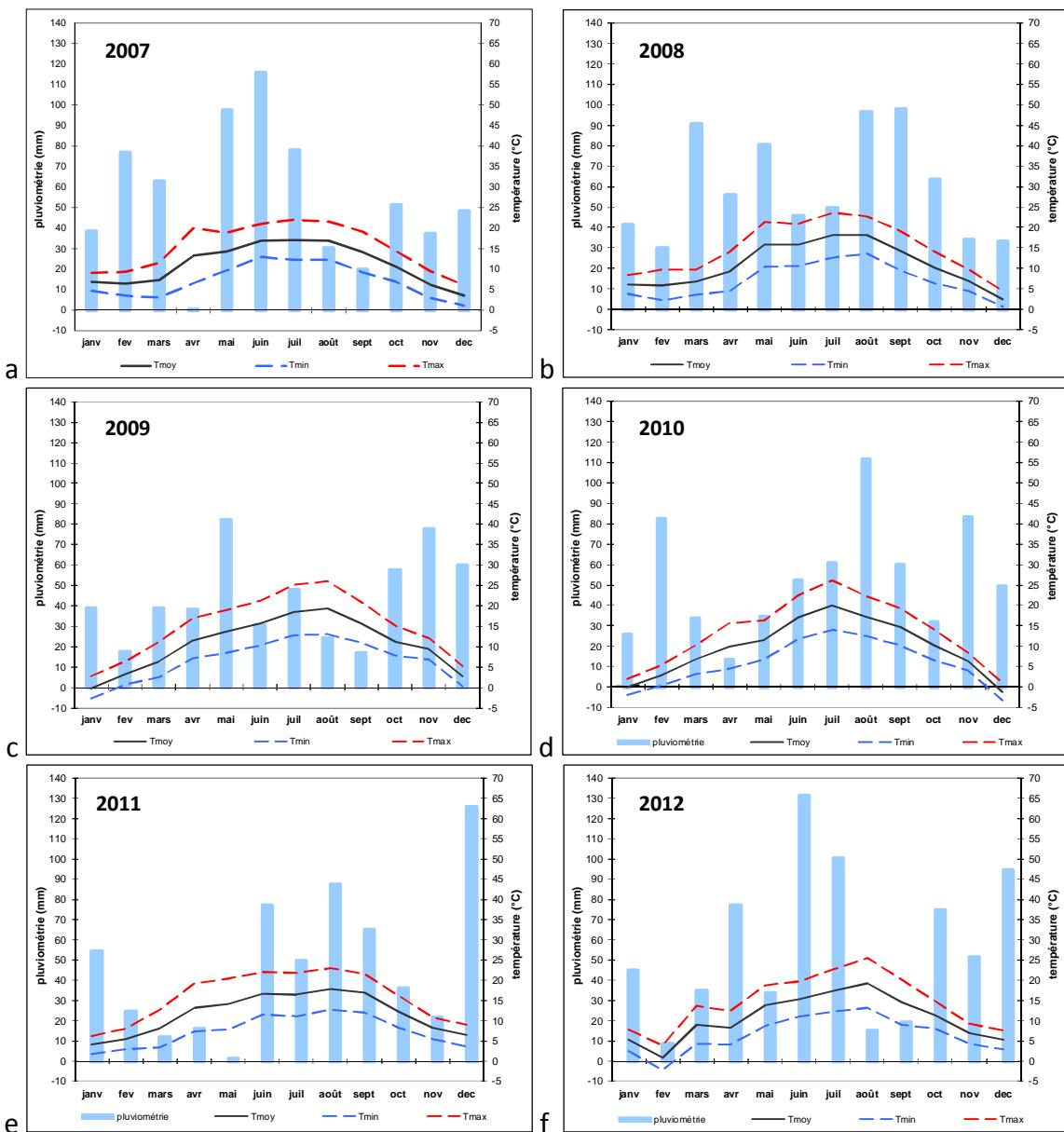


Figure 3-1 : Diagrammes ombrothermiques des années (a) 2007 (1<sup>ère</sup> année de culture), (b) 2008 (2<sup>ème</sup> année de culture), (c) 2009 (3<sup>ème</sup> année de culture), (d) 2010 (4<sup>ème</sup> année de culture), (e) 2011 (5<sup>ème</sup> année de culture), et (f) 2012 (6<sup>ème</sup> année de culture)

Ces diagrammes ombro-thermiques (Figure 3-1) nous permettent de mettre en évidence des périodes de sécheresse, définies par des précipitations (histogrammes bleus sur la Figure 3-1) se situant en dessous de la courbe des températures moyennes (courbes noires sur la Figure 3-1) :

- en 1<sup>ère</sup> année (2007), pendant les mois d'avril, d'août et de septembre avec une sécheresse assez marquée en avril
- en 3<sup>ème</sup> année (2009), pendant les mois d'aout et de septembre

- en 4<sup>ème</sup> année (2010), pendant le mois d'avril
- en 5<sup>ème</sup> année (2011), pendant les mois de mars, avril, et mai, avec une sécheresse particulièrement marquée en mai
- en 6<sup>ème</sup> année (2012), pendant les mois d'août et de septembre.

A noter qu'il n'y a eu aucune période de sécheresse au cours de la 2<sup>ème</sup> année (2008).

Certains mois ont également été particulièrement pluvieux. C'est notamment le cas :

- des mois de mai, juin et juillet de la 1<sup>ère</sup> année (2007),
- des mois d'août et septembre de la 2<sup>ème</sup> année (2008),
- du mois de mai de la 3<sup>ème</sup> année (2009),
- du mois d'août de la 4<sup>ème</sup> année (2010),
- du mois de décembre de la 5<sup>ème</sup> année (2011),
- et des mois de juin et juillet de la 6<sup>ème</sup> année (2012).

Enfin, l'hiver 2010 a été marqué par d'importantes chutes de neige au cours du mois de décembre.

## **3.2 Description et justification du dispositif expérimental**

### **3.2.1 Facteurs de variation**

A travers le dispositif expérimental mis en place, nous allons nous focaliser sur les principaux facteurs de variation qui ressortent dans l'étude bibliographique comme influençant les caractères d'intérêt associés à la production de biomasse et à sa composition (Cf Chapitre 2).

#### **a. Le clone**

Cette étude a pour objectif de contribuer à la définition d'idéotypes valorisables pour la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération et de donner des perspectives en sélection. La définition de ces idéotypes passe donc tout d'abord par l'identification de clones de miscanthus intéressants combinant les caractères de production et de composition de la biomasse à l'état favorable pour la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération.

Dans cet objectif, l'essai regroupe 21 clones de miscanthus répartis en 3 espèces (Table 3-2) :

- 4 clones appartenant à l'espèce *M. x giganteus*, dont le clone H8 que nous avons considéré comme de type *M. x giganteus* car c'est un hybride inter-spécifique entre *M. sacchariflorus* et *M. sinensis*, et le clone Flo, appartenant assurément à l'espèce *M. x giganteus*,

- 15 clones appartenant à l'espèce *M. sinensis* et,
- 2 clones appartenant à l'espèce *M. sacchariflorus*.

Trois clones ont été étudiés préalablement par Clifton-Brown et al. (2001b) et Lewandowski et al. (2003a) pour leur production de biomasse et leur qualité : H5, appartenant à l'espèce *M. sacchariflorus*, H6, appartenant à l'espèce *M. sinensis*, et H8, un hybride de type *M. x giganteus*.

**Table 3-2 : Présentation des 21 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, et leur provenance**

Code	Nom du clone	Espèce	Niveau de ploïdie <sup>a</sup>	Provenance
H8 <sup>b</sup>	Hybride 8	<i>M. x giganteus</i>	2x	Université d'Aarhus, Danemark
Flo	<i>M. x giganteus</i> Floridulus <sup>c</sup>	<i>M. x giganteus</i>	3x	Chombart, France
GiB	<i>M. x giganteus</i> Britannique	<i>M. x giganteus</i>	3x	ADAS, Royaume-Uni
GiD	<i>M. x giganteus</i> Danois	<i>M. x giganteus</i>	4x	Nordic Biomass, Danemark
Aug	<i>M. sinensis</i> August Feder	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Fer	<i>M. sinensis</i> Ferner Osten	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Fla	<i>M. sinensis</i> Flamingo	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Gra	<i>M. sinensis</i> Graziella	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Her	<i>M. sinensis</i> Herman Müssel	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Mal	<i>M. sinensis</i> Malepartus	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Pun	<i>M. sinensis</i> Punktchen	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Pur	<i>M. sinensis</i> Purpurescence	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Rot	<i>M. sinensis</i> Rotsilber	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Sil	<i>M. sinensis</i> Silberspinne	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Str	<i>M. sinensis</i> Strictus	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Yak	<i>M. sinensis</i> Yaku Jima	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
H6 <sup>b</sup>	Hybride 6	<i>M. sinensis</i>	4x <sup>d</sup>	Université d'Aarhus, Danemark
GoD	<i>M. sinensis</i> Goliath Danois	<i>M. sinensis</i>	4x	Nordic Biomass, Danemark
Gol	<i>M. sinensis</i> Goliath	<i>M. sinensis</i>	4x	Chombart, France
Sac	<i>M. sacchariflorus</i>	<i>M. sacchariflorus</i>	2x	Chombart, France
H5 <sup>b</sup>	Hybride 5	<i>M. sacchariflorus</i>	4x	Université d'Aarhus, Danemark

<sup>a</sup> Déterminé par cytométrie de flux par Zub et al. (2012c)

<sup>b</sup> Clones déjà étudiés par Clifton-Brown et al. (2001b) et Lewandowski et al. (2003a)

<sup>c</sup> Il s'agit assurément d'un clone appartenant à l'espèce *M. x giganteus* (Rambaud, communication personnelle); nous supposons que le nom variétal est Floridulus mais sans certitude puisqu'il peut exister des confusions taxonomiques notamment pour du matériel végétal provenant de pépiniéristes

<sup>d</sup> Déterminé par cytométrie de flux par Rambaud (communication personnelle)

## b. L'année de culture

L'effet de l'année de culture correspond en réalité à deux effets combinés : un effet de l'âge de la plante et un effet de l'environnement. L'effet âge de la plante est dû à la pérennité du miscanthus dont la durée de vie peut atteindre 20 à 25 ans (Lewandowski et al., 2003b). Le cycle de vie du miscanthus est caractérisé par deux phases, une première phase juvénile d'élaboration du rendement et une deuxième phase de plateau pour laquelle la production de biomasse est stable. L'effet de l'environnement est lié aux conditions pédo-climatiques de l'année considérée.

De par le caractère pérenne du miscanthus, les mesures réalisées chaque année sur le dispositif sont des mesures dites répétées puisqu'elles sont réalisées sur les mêmes plantes chaque année. Il s'agira de prendre en compte ce type particulier de dispositif en 'mesures répétées dans le temps' dans l'analyse statistique de données, et plus particulièrement, dans l'écriture des modèles statistiques, pour caractériser l'effet de l'année de culture sur les différents caractères.

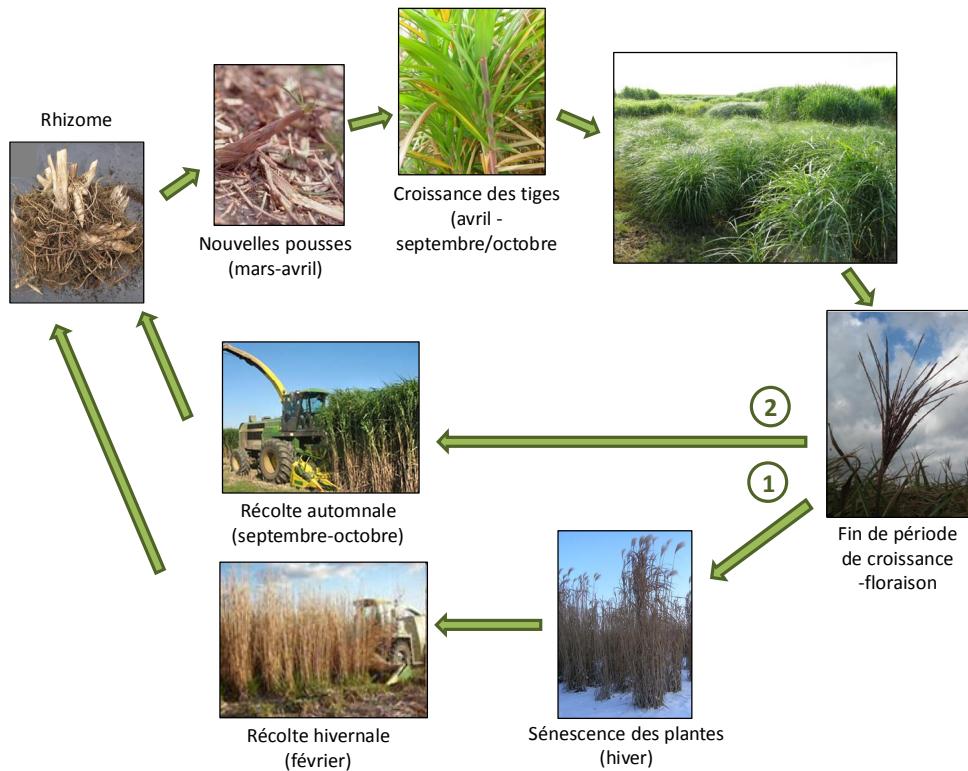
### **c. La date de récolte**

Selon la littérature, la date de récolte a un effet sur la production et la composition de la biomasse chez le miscanthus (Cf Chapitre 2). L'efficacité du procédé de transformation de la biomasse en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération étant dépendante de la composition de la biomasse, la date de récolte apparaît comme un facteur essentiel à étudier.

Aujourd'hui, la récolte la plus couramment pratiquée chez le miscanthus est celle réalisée en sortie d'hiver, lorsque la plante est entièrement sénescente. Cette date de récolte, que nous qualifierons par la suite de « récolte hivernale » (winter harvest), va permettre à la plante d'accomplir son cycle annuel complet (Figure 3-2) : en fin de période de croissance, la plante va progressivement entrer en sénescence et perdre ses feuilles. Les nutriments contenus dans les parties aériennes de la plante, en particulier l'azote, vont également être mobilisés vers les parties souterraines, et ainsi constituer des réserves pour l'année suivante (Strullu et al., 2011). Dès la reprise des plantes au printemps de l'année suivante, ces nutriments stockés pendant l'hiver dans les parties souterraines seront remobilisés vers les parties aériennes et réutilisés par la plante. A cette date de récolte, le produit récolté a donc l'avantage d'être relativement sec et de contenir de faibles quantités de minéraux, ce qui est particulièrement recherché pour les procédés de combustion (Lewandowski and Kicherer, 1997).

Une deuxième date de récolte, plus précoce, est également pratiquée : la plante est récoltée à la fin de la période de croissance, en septembre/octobre, après la floraison des clones pour ceux qui fleurissent, ou juste avant les premiers gels pour ceux qui ne fleurissent pas (Figure 3-2) ; à ce stade, la plante est encore verte et la production de biomasse est maximale (Cosentino et al., 2007). Cette modalité de récolte, que nous qualifierons par la suite de « récolte automnale » (autumn harvest), est particulière car elle ne permet pas à la plante d'accomplir son cycle annuel complet : au moment de la récolte, les parties aériennes de la plante contiennent des nutriments, notamment de l'azote, qui vont donc être exportés à la récolte. Du point de vue industriel, le produit issu de cette récolte pourrait mieux convenir pour les procédés de transformation destinés à la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération pour lesquels on valorise la lignocellulose (Karp and Shield, 2008). De plus, il

semblerait que le produit récolté à cette date engendre une meilleure fermentation lors de ces procédés par rapport à celui issu de la récolte hivernale (Le Ngoc Huyen et al., 2010).



**Figure 3-2 : Cycle du miscanthus**

Ainsi, pour le débouché de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération, nous avons fait le choix d'étudier ces deux dates de récolte à travers le dispositif expérimental mis en place.

Chacune des deux dates de récolte a été pratiquée de la façon suivante :

- la récolte automnale a été réalisée en septembre/octobre sur les parcelles de l'essai destinées exclusivement à cette récolte (Figure 3-3) :
  - 200 degrés jours après la date de floraison des clones, selon leur précocité, pour les clones qui fleurissent en Picardie ;
  - juste avant les premiers gels, pour les clones qui ne fleurissent pas en Picardie.
- la récolte hivernale a été réalisée en février sur les parcelles de l'essai destinées exclusivement à cette récolte hivernale (Figure 3-3).

### 3.2.2 Structure du dispositif

L'essai a été implanté selon un dispositif en split-plot comprenant deux facteurs : la 'date de récolte' comme facteur principal et le 'clone' comme second facteur. Les modalités du facteur

principal ‘date de récolte’ sont randomisées dans les grandes parcelles. Les modalités du second facteur ‘clone’ sont randomisées dans les petites parcelles qui composent chacune des grandes parcelles (Figure 3-3).

Le facteur ‘date de récolte’ possède deux modalités : une récolte automnale et une récolte hivernale. Le facteur ‘clone’ possède 21 modalités, soit 21 clones. Ces 21 clones sont répartis dans les petites parcelles selon une randomisation tenant compte de la hauteur des plantes pour éviter des effets d’ombrage entre grandes et petites plantes (programme de randomisation d’Hervé Monod sous S+, communication personnelle). Le dispositif comprend 3 blocs.

La taille d’une parcelle élémentaire (petite parcelle) est de 3,2 m x 4,8 m soit 15,36 m<sup>2</sup>. Chaque parcelle élémentaire contient 32 plantes réparties sur 4 rangs de 8 plantes d’un même clone selon un espacement de 0,8 m entre rangs et de 0,6 m intra-rang (Figure 3-4). Chaque parcelle élémentaire est séparée par 2 rangs de 8 plantes de bordure d’un même clone de *M. sinensis*, le clone *M. sinensis* Malepartus, choisi pour son développement aérien intermédiaire en comparaison avec les autres clones utilisés dans l’essai.

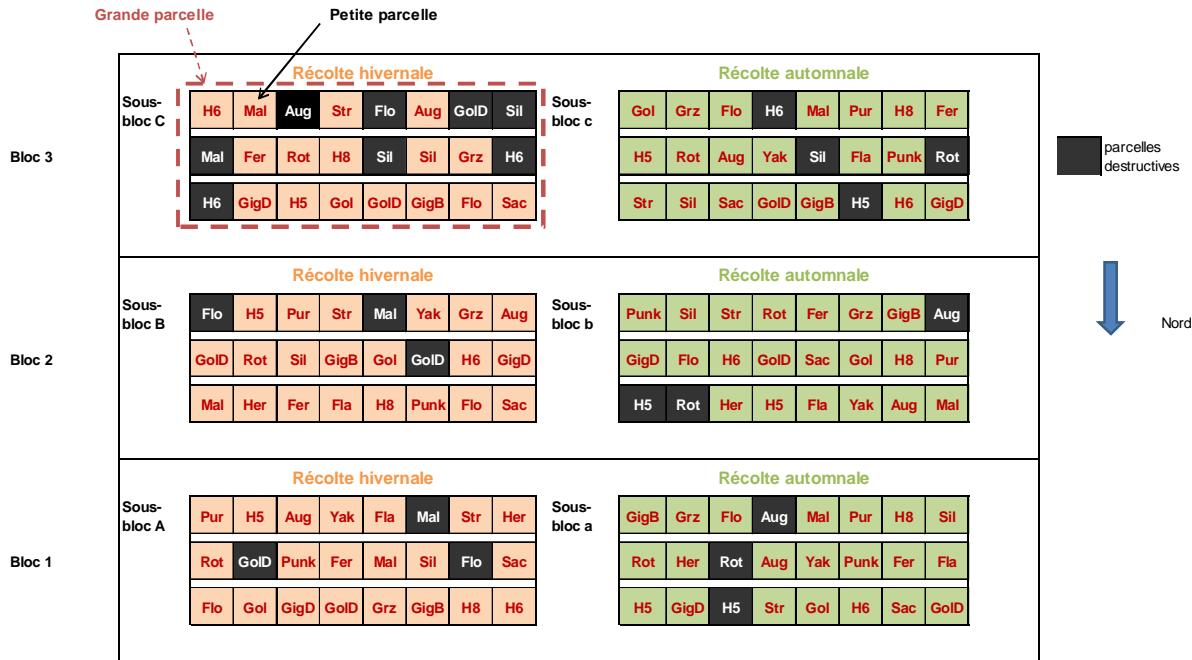


Figure 3-3 : Plan de l'essai

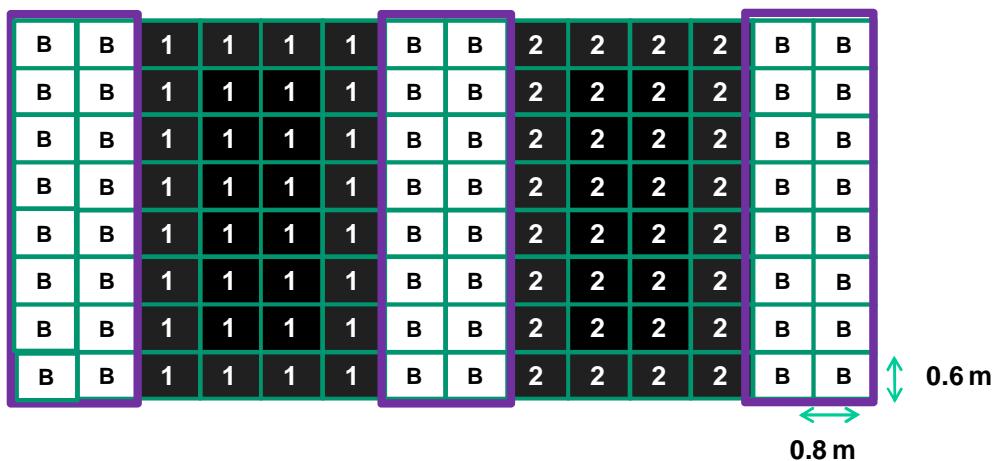


Figure 3-4 : Schéma de deux parcelles élémentaires (petites parcelles) adjacentes de deux clones différents (en noir, parcelles 1 et 2) entourées de part et d'autre par les deux lignes de bordure (B) du clone *M. sinensis* Malepartus

### **3.2.3 Conduite de l'essai**

#### **a. Implantation de l'essai**

Les parcelles élémentaires (Figure 3-4) ont été implantées en mai 2007 à une densité de 2 plantes/m<sup>2</sup> et à partir de rhizomes issus de pieds-mère préalablement découpés par les fournisseurs en fragments d'environ 5 cm de long. Pour s'assurer d'une homogénéité des fragments à planter, un tri des fragments les plus homogènes a été réalisé avant la plantation, sur la base d'un contrôle visuel et de la pesée de chacun des fragments. Pour assurer une équidistance entre plantes, la plantation a été manuelle.

Les deux rangs de bordure situés entre chaque parcelle élémentaire (Figure 3-4) ont été implantés au printemps 2008.

#### **b. Gestion des manques à la levée**

Afin d'anticiper d'éventuels manques à la levée durant la première année de culture, c'est-à-dire la non émergence des nouvelles pousses du rhizome planté, les 21 clones utilisés dans l'essai ont également été implantés au printemps 2007 dans une pépinière proche de l'essai et selon le même procédé. En Septembre 2007, certaines plantes de la pépinière ont été transférées dans l'essai pour combler les manques à la levée. La densité observée était donc rigoureusement égale à la densité théorique de 2 plantes/m<sup>2</sup>.

#### **c. Irrigation**

La plantation étant pour le miscanthus l'étape la plus critique pour la réussite de la culture (Cf Chapitre 2), l'essai a été irrigué un mois après plantation, en juin 2007, pour assurer une bonne reprise des rhizomes et ainsi une réussite de la plantation.

La mise en place de cultures pour un débouché bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération nécessite de minimiser l'impact négatif de ces cultures sur l'environnement. Dans cet objectif, l'essai a été mené sans irrigation à partir de la deuxième année de culture.

#### **d. Désherbage**

En 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> années de culture (2007 et 2008), un désherbage mécanique manuel a été préféré à un désherbage chimique pour éviter tout risque de phytotoxicité vis-à-vis des différentes espèces ;

en effet, seul le comportement de l'espèce *M. x giganteus* était connu vis-à-vis du désherbage chimique. Ce désherbage a été effectué pendant la période de croissance des plantes, entre mars et septembre, afin d'éviter une compétition entre les jeunes plantes de miscanthus et les adventices préjudiciable pour une bonne installation de la culture lors des premières années (Cf Chapitre 2).

Au cours des années suivantes, deux types de désherbage ont été réalisés pour éviter la compétition avec les adventices et limiter ainsi les biais dans l'estimation de la production de biomasse :

- ✓ un désherbage en sortie d'hiver (Glyphosate, 4 L/ha),
- ✓ des désherbages en local au cours de la période de croissance des plantes contre les dicotylédones annuelles et vivaces (Allié, 20 g/ha ; Bofix, 3 L/ha), quand cela était nécessaire.

#### e. Disponibilité en azote dans le sol

Dans le but de minimiser les impacts négatifs de la culture de miscanthus sur l'environnement, l'essai n'a pas été fertilisé en azote.

Dans le cas de notre expérimentation, et plus particulièrement dans le cas de la récolte automnale, nous pouvons supposer que la disponibilité en azote pour la plante diminue au fil de ces récoltes du fait (i) des exportations successives d'azote contenu dans les parties aériennes et (ii) d'absence de fertilisation azotée pendant toute la période d'expérimentation.

Nous avons donc caractérisé les quantités d'azote minéral restant dans le sol (appelées « reliquats azotés ») tout au long de l'expérimentation.

Pour ce faire, des prélèvements de sol ont été effectués chaque année à deux dates :

- juste après la récolte automnale (en octobre/novembre), sur les 3 sous-blocs voués à la récolte automnale,
- en sortie d'hiver (en février/mars), sur l'ensemble de l'essai (sur les 3 sous-blocs destinés à la récolte hivernale et sur les 3 sous-blocs voués à la récolte automnale).

Les prélèvements de sol ont été réalisés sur une profondeur de sol de 150 cm répartie en 5 horizons de 30 cm chacun soit 0-30 cm, 30-60 cm, 60-90 cm, 90-120 cm et 120-150 cm. A noter que l'enracinement a pu être plus profond que 150 cm mais la sonde utilisée pour les prélèvements ne nous permettait techniquement pas de prélever du sol sur des profondeurs plus importantes.

A chaque date de prélèvement, les prélèvements de sol ont été répétés en individualisant les sous-blocs ou pas :

▪ Individualisation des sous-blocs pour les prélèvements réalisés de février 2007 à mars 2010 inclus : six points de prélèvement ont été répartis selon une diagonale sur chacun des 3 sous-blocs destinés à la récolte hivernale et sur chacun des 3 sous-blocs destinés à la récolte automnale (Figure 3-5a). A noter qu'aucune différence significative entre les 3 sous-blocs de chacune des modalités de récolte n'a été décelée pour les quantités d'azote minéral présentes dans le sol.

▪ Sous-blocs non individualisés de novembre 2010 à février 2013 : au vu de ces différences non significatives entre sous-blocs pour chaque modalité de récolte, le nombre de répétitions des prélèvements de sol a été réduit pour les dates suivantes à six points de prélèvement répartis selon une diagonale couvrant l'ensemble des 3 sous-blocs pour chaque modalité de récolte (Figure 3-5b).

Les valeurs obtenues sur les 3 sous-blocs individualisés de février 2007 à mars 2010 ont été moyennées pour pouvoir les comparer aux données des années suivantes.

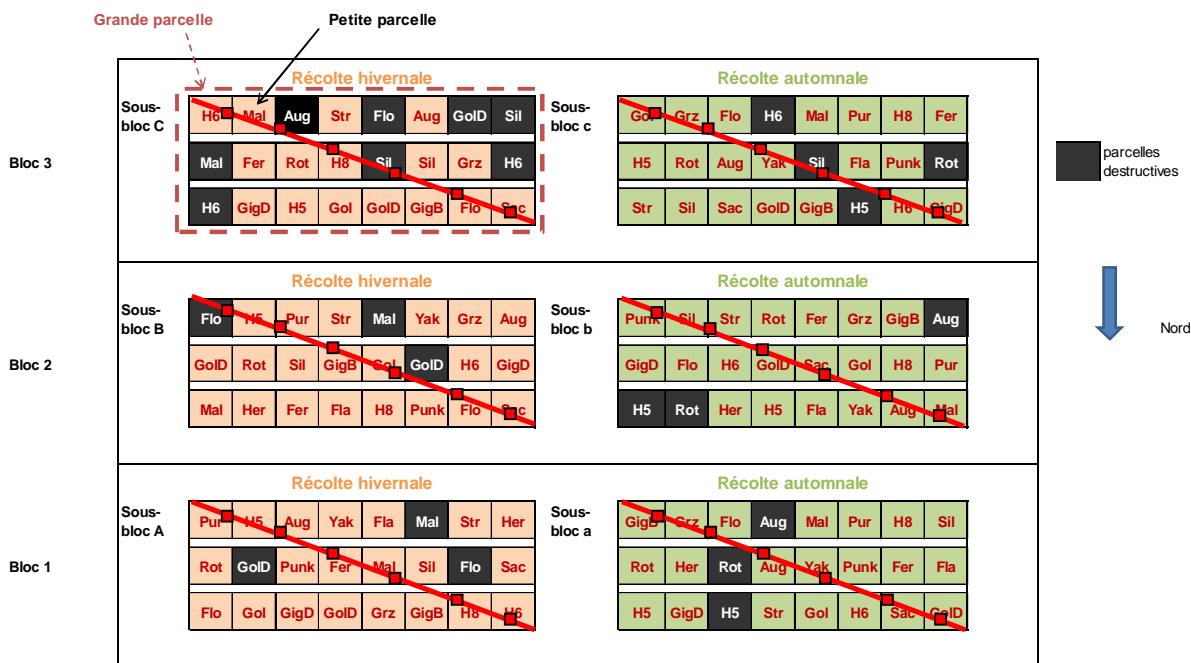
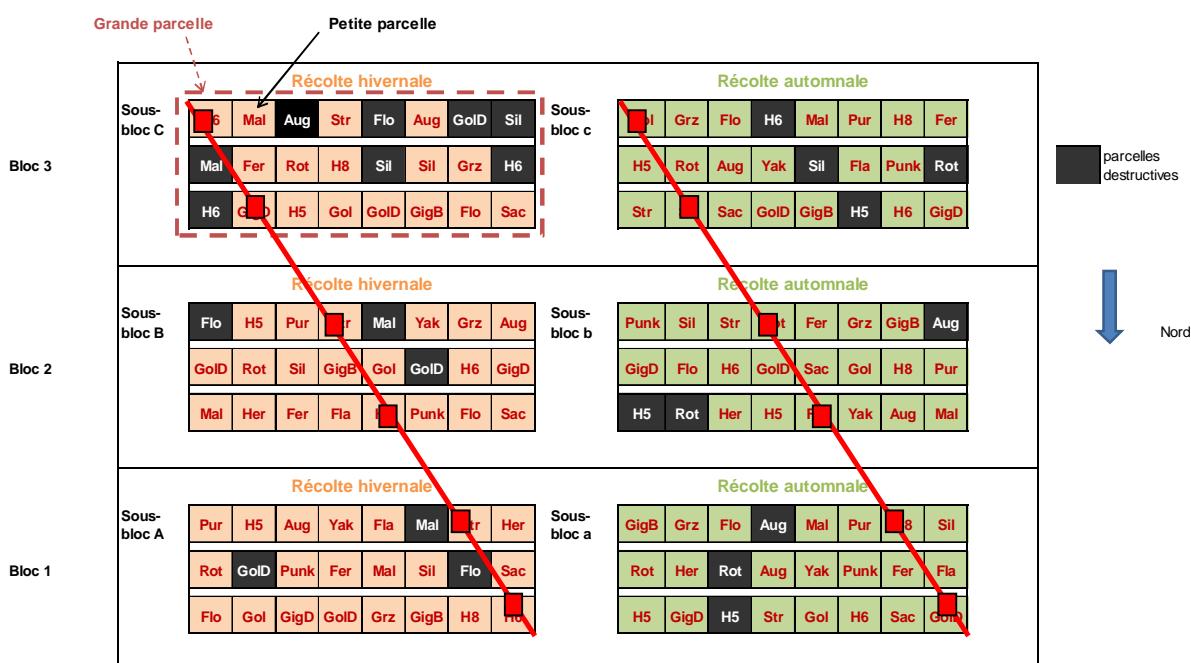
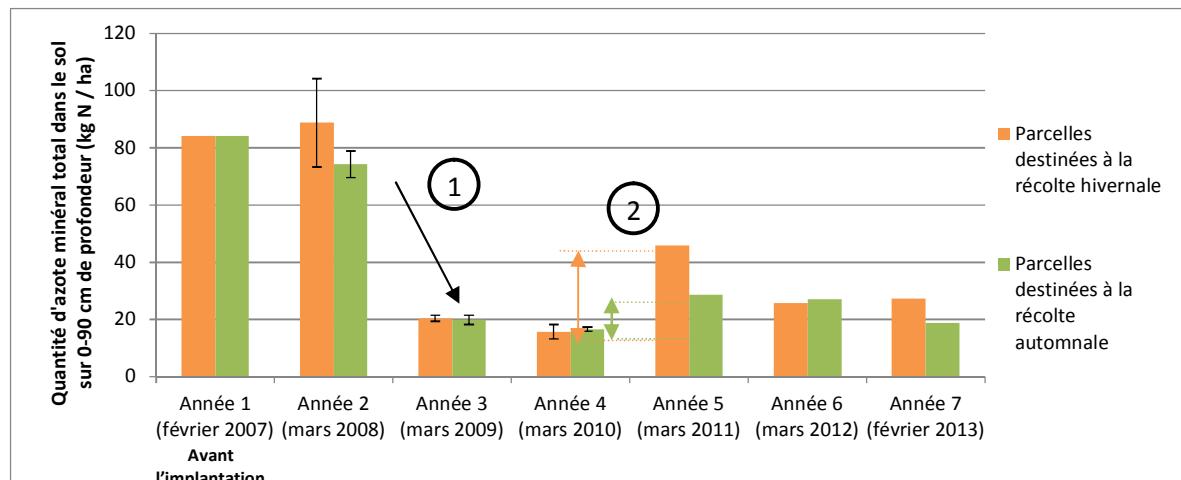
**a****b**

Figure 3-5 : Répartition des prélèvements de sol effectués pour évaluer les quantités de reliquats d'azote minéral pour les dates de prélèvement (a) en individualisant les sous-blocs de février 2007 à mars 2010 inclus et (b) en ne les individualisant pas par la suite, de novembre 2010 à février 2013

Les quantités d'azote minéral total dans le sol en sortie d'hiver pour chaque année de culture et pour chaque modalité de récolte (récolte automnale et récolte hivernale) sont présentées dans la Figure 3-6. A noter que nous n'illustrons ici que les quantités d'azote minéral présentes dans le sol sur une profondeur de sol de 0 à 90 cm, les variations observées pour les horizons plus profonds correspondant principalement à la variabilité résiduelle (Annexe 1).



**Figure 3-6 : Quantité d'azote minéral total dans le sol sur une profondeur de 0 - 90 cm en sortie d'hiver au démarrage de chaque année de culture et pour chacune des deux modalités de récolte, automnale (histogrammes verts) et hivernale (histogrammes oranges)**

Les barres représentent les écarts types ; ces écarts types ne sont calculables que pour les 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, et 4<sup>ème</sup> années pour lesquelles des répétitions entre sous-blocs ont été réalisées.

La quantité d'azote minéral dans le sol est assez importante en 1<sup>ère</sup> année de culture (février 2007 et mars 2008) puis diminue fortement entre le début de la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> année (mars 2008 et mars 2009) pour ensuite globalement se stabiliser entre les 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> années (Figure 3-6).

La baisse significative de la quantité d'azote minéral dans le sol entre le début de la 2<sup>ème</sup> et de la 3<sup>ème</sup> année de culture s'explique par le développement important des rhizomes des plantes en termes de taille et de capacité à absorber, entraînant ainsi une plus forte absorption d'azote minéral par la plante qu'entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> années (Figure 3-6, point 1).

Outre une quantité d'azote minéral globalement similaire entre les 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> années, nous pouvons cependant observer une légère augmentation de la quantité d'azote minéral dans le sol en 5<sup>ème</sup> année pour les parcelles destinées à une récolte hivernale (entre mars 2010 et mars 2011) (Figure 3-6, point 2). Cette légère augmentation d'azote minéral dans le sol serait due à une plus forte minéralisation. Cette dernière peut être liée à des conditions climatiques particulières au cours de l'hiver 2010 associées à la présence de feuilles tombées au sol sur ces parcelles destinées à une récolte hivernale. En effet, les feuilles tombées au sol sur ces parcelles avant les chutes de neige

importantes de cet hiver-là ont créé une couche intermédiaire entre le sol et le manteau neigeux. L'activité biologique au sein de cette couche de feuilles aurait ainsi provoqué un réchauffement du sol accentuant l'activité de micro-organismes et les phénomènes de minéralisation dans les horizons supérieurs du sol (Machet, communication personnelle).

### **3.3 Evaluation des caractères d'intérêt**

D'après l'étude bibliographique réalisée précédemment (Cf Chapitre 2), plusieurs caractères d'intérêt sont à prendre en compte chez le miscanthus pour le débouché bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération. Sur cette base, nous allons nous intéresser aux deux groupes de caractères suivants :

- la production de biomasse et ses caractères associés, avec :
  - ✓ la production de biomasse aérienne,
  - ✓ la date d'émergence des nouvelles pousses et la précocité de floraison,
  - ✓ les composantes de la production de biomasse : la hauteur des plantes, le nombre de tiges par plante, le diamètre des tiges, et le ratio feuilles/tiges ;
- la composition de la biomasse à travers les caractères suivants : les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres ; à noter que la teneur en solubles dont il est question ici correspond à la fraction soluble obtenue par la méthode Van Soest (Cf § 3.3.4 c)

Pour le besoin de l'étude, nous serons également amenés à travailler sur une variable synthétique, le volume aérien de la plante, combinant la hauteur de plante, le nombre de tiges et le diamètre des tiges (Cf § 3.3.3 e).

Nous serons aussi amenés à utiliser des variables synthétiques combinant les deux aspects de production de biomasse et de composition de la biomasse : les rendements potentiels en cellulose, hémicelluloses, et lignines, obtenus par le produit entre la production de biomasse aérienne et les teneurs en cellulose, hémicelluloses, et lignines, respectivement.

#### **3.3.1 Evaluation des stades phénologiques**

Le suivi des stades phénologiques a été réalisé sur chaque parcelle de l'essai pendant 5 années successives, de la 2<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> année de culture, soit de 2008 à 2012. Deux stades phénologiques ont été observés chaque année : la date d'émergence des nouvelles pousses et la précocité de floraison, ces stades étant liés à la production de biomasse (Zub et al., 2011).

**a. Date d'émergence des nouvelles pousses**

La date d'émergence des nouvelles pousses a été notée visuellement pendant la période d'émergence, à savoir, pendant les mois de mars, avril et mai en Picardie et selon une fréquence de notation de 2 ou 3 jours. La date d'émergence correspond à la date à laquelle 50% des plantes de la parcelle ont émis au moins une pousse hors du sol.

**b. Précocité de floraison**

La précocité de floraison a été caractérisée à travers trois dates : la date d'apparition de la feuille étandard, la date d'émergence de la panicule, et la date de floraison. Ces dates ont été notées visuellement entre les mois de juillet et octobre en fonction de la précocité des clones et selon une fréquence de passage de 2 ou 3 jours.

La date d'apparition de la feuille étandard correspond à la date à laquelle 50% des plantes de la parcelle ont émis leur feuille étandard ; la date d'émergence de la panicule correspond à la date à laquelle 50% des plantes de la parcelle ont émis une panicule visible à 1 cm du haut de la tige. Enfin, la date de floraison correspond en théorie à la date à laquelle 50% des plantes de la parcelle ont émis leurs anthères. On l'estime de façon visuelle à partir du moment où 50% des plantes de la parcelle ont des panicules ayant les fleurs ouvertes. Ces dates ont été exprimées en degrés jours depuis la date d'émergence en base 10 selon Arnoult et al. (2014).

Ces trois variables s'avèrent être fortement corrélées : la date d'apparition de la feuille étandard et la date de sortie de la panicule sont corrélées à 0,86 et 0,92 à la date de floraison respectivement sur l'ensemble des 21 clones (données non montré).

Etant donné que nous souhaitons étudier la date de floraison, qui est la variable la plus couramment utilisée dans la littérature, nous nous focaliserons, dans la suite du chapitre, sur cette variable 'date de floraison' uniquement.

**3.3.2 Evaluation de la production de biomasse aérienne**

Cette évaluation a été réalisée sur 5 années successives, soit de la 2<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> année de culture, entre 2008 et 2012.

Pour chacune de ces 5 années, des échantillonnages ont été réalisés au moment de chacune des deux récoltes : au moment de la récolte automnale sur les parcelles spécifiques à la récolte automnale, et au moment de la récolte hivernale sur les parcelles spécifiques à la récolte hivernale.

Pour ce faire, chaque parcelle a été entièrement récoltée à l'aide d'une motofaucheuse en coupant les parties aériennes à 5 cm du sol. Le poids frais total des parties aériennes récoltées a été pesé pour chacune des parcelles.

Pour chaque parcelle récoltée, un échantillon d'environ 500 g de matière fraîche a été prélevé de façon aléatoire et pesé en frais avant d'être placé à l'étuve à 65°C pendant 4 jours. A la sortie de l'étuve, chaque échantillon sec a été pesé pour obtenir le taux de matière sèche et la quantité de biomasse produite par parcelle en tonne de matière sèche par hectare (t MS/ha).

### **3.3.3 Evaluation des composantes de la production de biomasse**

Les composantes de la biomasse, à savoir les hauteurs de plante, le nombre de tiges, ou le diamètre des tiges ont été évaluées au cours de 5 années successives, de la 2<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> année de culture (entre 2008 et 2012). Le ratio feuilles/tiges a été évalué sur 3 années successives, de la 3<sup>ème</sup> à la 5<sup>ème</sup> année de culture (2009 à 2011).

Ces évaluations ont été réalisées sur chacune des parcelles :

- au moment de la récolte automnale sur les parcelles spécifiques à la récolte automnale, et,
- au moment de la récolte hivernale sur les parcelles spécifiques à la récolte hivernale.

#### **a. Hauteur de végétation et hauteur totale de la plante**

Les hauteurs de végétation et totale ont été mesurées de la façon suivante :

- la hauteur de végétation correspond à la distance entre la surface du sol et le niveau de la dernière feuille ligulée de la plante.
- la hauteur totale correspond à la distance entre la surface du sol et le haut de la panicule (lorsque les clones émettent leur panicule).

Ces mesures ont été réalisées sur 3 plantes médianes pour chacune des parcelles élémentaires, ces plantes médianes étant définies sur la base de la hauteur et du nombre de tiges par Zub et al. (2011). A noter que ce sont les mêmes 3 plantes médianes sur lesquelles les mesures ont été réalisées chaque année.

**b. Nombre de tiges par plante**

Le nombre de tiges par plante a été compté sur les mêmes 3 plantes médianes que pour la hauteur pour chacune des parcelles élémentaires.

**c. Diamètre des tiges**

Le diamètre des tiges, mesuré à la base de la tige, correspond à la moyenne du diamètre de tige mesuré sur 12 tiges prises au hasard au moment de la récolte sur chacune des parcelles.

**d. Ratio feuilles/tiges**

Le ratio feuilles/tiges a été évalué à partir d'un échantillon de matière fraîche prélevé de façon aléatoire sur chaque parcelle au moment de chacune des deux récoltes. Sur chaque échantillon, les feuilles et tiges ont été séparées jusqu'à obtenir environ 100 g de feuilles. Les lots de feuilles et de tiges correspondantes ont ensuite été pesés en frais puis passés à l'étuve à 65°C pendant 4 jours. A la sortie de l'étuve, chaque lot a été pesé pour obtenir le poids sec et le pourcentage de matière sèche. Les quantités de biomasse des feuilles et des tiges contenues dans la biomasse récoltée (en matière sèche) et le ratio feuilles/tiges ont ainsi été calculés.

**e. Calcul du volume aérien de la plante**

Dans l'objectif d'évaluer la production de biomasse, nous avons calculé le volume aérien de la plante, correspondant à un indice prenant en compte la hauteur de végétation la plante, le nombre de tiges par plante, et le diamètre de tiges.

Il a été calculé selon Zub et al. (2012b) de la façon suivante :

$$\text{Volume aérien de la plante (cm}^3\text{)} = \text{HVeg} * \text{Nb Tiges} * (\text{Diamètre}/2)^2 * \pi$$

Avec :

HVeg : Hauteur de végétation de la plante en cm

Nb Tiges : Nombre de tiges par plante

Diamètre : Diamètre de tige en cm

### **3.3.4 Evaluation de la composition de biomasse**

La composition chimique de la biomasse a été déterminée sur les échantillons de 3 années successives : les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> années de culture (2009 à 2011).

#### **a. Organes considérés**

Pour se placer dans les conditions d'un procédé industriel de production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération où les différentes parties de la plante ne sont pas séparées, nous nous intéresserons en premier lieu aux parties aériennes de la plante dans leur ensemble.

En revanche, il apparaît essentiel de s'intéresser également aux feuilles et tiges séparément dans un objectif de sélection, en particulier pour les caractères associés à la composition de la biomasse, puisque (i) la composition et la digestibilité des tiges et feuilles s'avèrent différente (Le Ngoc Huyen et al., 2010), (ii) les feuilles, de par leur chute, seraient à l'origine de différences entre les deux dates de récolte et (iii) certains clones de miscanthus perdent plus ou moins leurs feuilles.

#### **b. Préparation des échantillons**

Les échantillons prélevés sur chacune des parcelles à la récolte ont été séchés à l'étuve à 65°C pendant 4 jours. Ils ont ensuite été pré-broyés à l'aide d'un broyeur à végétaux (Viking, modèle GE 220, France) puis broyés à l'aide d'un broyeur équipé d'une grille d'1 mm (modèle Gondard Productions, France). Les poudres obtenues ont été homogénéisées et conservées dans des piluliers. Ces échantillons ont ensuite été entreposés en chambre froide à une température de 6°C et une hygrométrie régulée pour assurer leur conservation.

#### **c. Analyses chimiques des constituants de la biomasse**

Les dosages chimiques de la cellulose, des hémicelluloses, des lignines, des solubles, et des cendres ont été réalisés par le Laboratoire Agronomique de Normandie (LANO) sur les échantillons préalablement broyés.

La méthode Van Soest (Van Soest, 1967), adaptée par le laboratoire, a été utilisée (Annexe 2). C'est une méthode gravimétrique basée sur la différence de solubilité des constituants dans deux types de détergents : un détergent neutre et un détergent acide.

Elle permet de quantifier la fraction NDF (Neutral Detergent Fiber), la fraction ADF (Acid Detergent Fiber), la fraction ADL (Acid Detergent Lignin), et la fraction soluble (Figure 3-7) :

- L'échantillon est tout d'abord mélangé avec une solution au détergent neutre pour séparer la partie soluble et la partie insoluble des hydrates de carbones (glucides). On obtient ainsi deux fractions :
  - la **fraction « soluble »**, contenant les glucides dits « non-structuraux », c'est-à-dire, qui ne sont pas contenus dans la paroi des végétaux ;
  - la fraction organique insoluble, appelée **fraction « Neutral Detergent Fiber » (NDF)**, contenant les glucides dits « structuraux » constituant la paroi végétale ; cette fraction représente la somme des polymères de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines, et de pectines de la paroi végétale, sachant que les plantes monocotylédones, et plus particulièrement le miscanthus, possèdent très peu de pectines.
- La fraction NDF est ensuite soumise à l'action d'une solution au détergent acide. On obtient ainsi la **fraction « Acide Detergent Fiber » (ADF)** ; cette fraction ADF représente la somme des polymères de cellulose et de lignines.
- Enfin, la fraction ADF obtenue précédemment est ensuite reprise dans une solution d'acide sulfurique diluée ; on obtient ainsi la **fraction « Acid Detergent Lignin » (ADL)** ; cette fraction représente les lignines seules.

Par différences successives de masse, il est possible de quantifier chaque fraction de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines, et de solubles (en % de matière sèche) :

$$\text{Hémicelluloses} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (1)$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad (2)$$

$$\text{Lignines} = \text{ADL} \quad (3)$$

$$\text{Solubles} = 100 - \text{NDF} \quad (4)$$

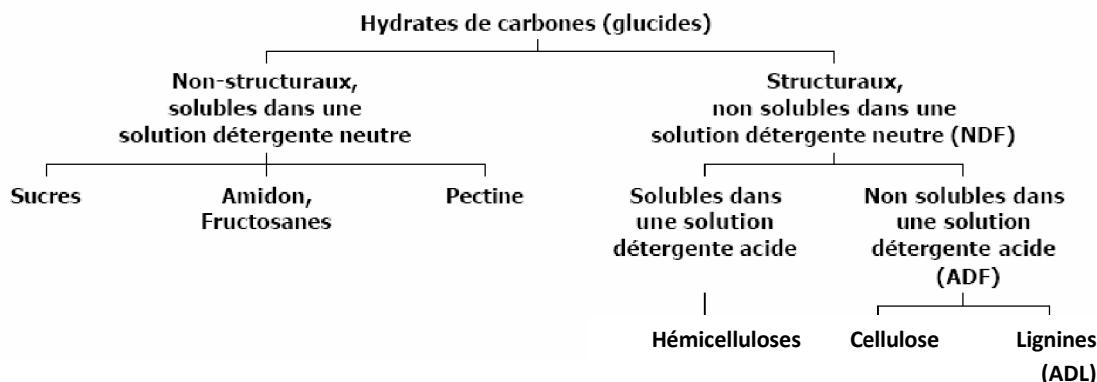


Figure 3-7 : Schéma des différentes étapes de la méthode Van Soest

Enfin, la teneur en **cendres** (en % de matière sèche) représente la masse restante après calcination des échantillons à 550°C pendant 12h.

Dans la suite de l'étude, en ce qui concerne la quantification des constituants pariétaux, il faudra garder à l'esprit que la méthode Van Soest a été utilisée. Cette méthode a été choisie car (i) elle présente le meilleur compromis entre les données obtenues sur la nature des polysaccharides structuraux constituant les biomasses lignocellulosiques et le temps d'analyse pour parvenir à obtenir cette information par rapport à d'autres méthodes, (ii) elle relativement bien adaptée au miscanthus, et (iii) elle est plus couramment dans la littérature (Godin et al., 2011). En effet, il faut savoir que d'autres méthodes d'évaluation des quantités de constituants pariétaux existent et que ces méthodes donnent des différences de quantifications des constituants : nous savons par exemple que la méthode Van Soest minimise la quantité de lignines obtenue chez miscanthus par rapport à la technique dite 'lignine Klason' (Chabbert, communication personnelle). Enfin, dans le cas de notre étude, nous n'avons pas forcément besoin d'utiliser une méthode absolue pour comparer la composition de la paroi de nos différents clones.

### **3.3.5 Mise au point d'équations de calibration par spectroscopie proche infra-rouge pour les constituants de la biomasse**

Les données issues des analyses chimiques détaillées ci-dessus vont servir de données de référence pour mettre au point les équations de calibration par spectroscopie proche infra-rouge (SPIR) afin d'évaluer la composition de la biomasse.

*Le matériel et méthodes concernant spécifiquement l'obtention de ces équations de calibration SPIR sera détaillé dans le chapitre 6-2.*

### **3.3.6 Evaluation des rendements potentiels en cellulose, hémicelluloses, et lignines**

A partir des teneurs en cellulose, hémicelluloses, et lignines obtenues dans les parties aériennes et de la production de biomasse aérienne, nous avons calculé les rendements potentiels en cellulose, hémicelluloses, et lignines exprimés en t/ha. Ces rendements potentiels représentent une information importante pour les industriels afin d'évaluer les potentialités des cultures à être transformées selon le processus industriel de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Ces variables sont calculées comme suit :

**Rendement potentiel = teneur du constituant x production de biomasse aérienne**

<i>(t/ha)</i>	<i>(% MS)</i>	<i>(t MS/ha)</i>
---------------	---------------	------------------

### **3.3.7 Qualité technologique des clones de miscanthus : aptitude à la transformation en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération**

Pour tester l'aptitude du miscanthus à être transformé en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, nous allons utiliser 5 clones, choisis parmi les 21 clones étudiés comme étant contrastés pour leur composition de biomasse : les clones Flo, GiB, H8, Rot, et Sil. Pour ce test, ces clones ont été récoltés en février (récolte hivernale) de la 7<sup>ème</sup> année de culture sur le dispositif utilisé dans ce travail. La matière récoltée (70 kg de matière fraîche par clone) a été acheminée au pilote FUTUROL situé à Pomacle-Bazancourt (Marne) et traitée.

*Le matériel et méthodes concernant spécifiquement ce test sera détaillé dans le chapitre 5.*

## **3.4 Gestion des données manquantes**

Pour certains caractères, il s'avère que notre jeu de données possède des données manquantes. Il s'agit de gérer ces données manquantes pour réaliser des analyses statistiques qui soient le moins biaisées possible et les plus représentatives de notre jeu de données.

Notre jeu de données comporte deux types de données manquantes :

- des données manquantes pour certains clones très tardifs qui n'atteignent pas le stade floraison en Picardie ;
- des données manquantes pour certains clones pour lesquels les observations n'ont pas toutes été réalisées ;

### **3.4.1 Données manquantes pour certains clones très tardifs qui n'atteignent pas le stade floraison en Picardie**

Le fait que certains clones ne fleurissent pas impacte l'estimation de la floraison et de la hauteur de la plante.

### a. Variables de floraison

En Picardie, il s'avère que certains clones très tardifs n'atteignent généralement pas le stade de floraison car les premiers gels, bloquant la croissance de la plante, interviennent avant ce stade phénologique. C'est le cas des clones Flo, GiB, GiD et H5.

Il est cependant difficile d'envisager d'exclure ces clones des analyses puisque, nous le verrons plus loin, ce sont les clones qui produisent le plus de biomasse. Pour ces clones, nous avons choisi de remplacer les données manquantes par les dates du premier gel survenu pour chaque année correspondante, c'est-à-dire la première date à laquelle la température moyenne est devenue négative. En effet, à partir de cette date de premier gel, on peut supposer que la plante stoppe sa croissance ; cette date nous permet donc de considérer que ces clones sont très tardifs par rapport aux autres tout en les conservant dans nos analyses.

### b. Variables de hauteur

Deux mesures de hauteur ont été réalisées, une hauteur de végétation et une hauteur totale (Cf § 3.3.3 a). De ces deux variables, il se trouve que la variable ‘hauteur de végétation’ est plus représentative de notre jeu de données que la variable ‘hauteur totale’. En effet, sous nos conditions climatiques, il s'avère que certains clones n'ont pas émis de panicule certaines années. De ce fait, la hauteur totale n'est pas mesurable pour ces clones. De plus, ces deux variables, ‘hauteur de végétation’ et ‘hauteur totale’, sont significativement et positivement corrélées avec un coefficient de corrélation de 0,94 observé sur l'ensemble des 21 clones (données non montrées).

Ainsi, pour réduire le déséquilibre du dispositif à cause des données manquantes, nous nous focaliserons uniquement sur la variable ‘hauteur de végétation’, d'autant plus qu'elle est plus communément utilisée dans la littérature (Jezowski, 2008 ; Zub et al., 2011 ; Gauder et al., 2012) que la variable ‘hauteur totale’.

## 3.4.2 Données manquantes pour les clones dont les observations n'ont pas toutes été réalisées

Pour certains caractères, les observations n'ont pas été réalisées pour tous les clones. Dans ce cas, nous travaillerons sur un sous-échantillon de clones en excluant les clones pour lesquels on a des données manquantes.

C'est le cas du caractère 'Date de floraison' qui n'a pas été observé toutes les années pour les clones Pur et Str. Ces deux clones ont donc été exclus de l'analyse de ce caractère, ramenant à 19 le nombre de clones étudiés.

Le 'Nombre de tiges par plante' n'a également pas pu être noté toutes les années pour les clones Sac et H5, les plantes n'étant plus individualisables sur la parcelle à partir de plusieurs années. Pour l'analyse de ce caractère, nous travaillerons donc sur 19 clones en excluant ces deux clones.

Le 'Ratio feuilles/tiges' et les teneurs en 'cellulose', 'hémicellulose', 'lignine', 'solubles' et 'cendres' n'ont pu être déterminés certaines années pour les clones Her et Pun du fait d'un problème technique et ces 2 clones ont donc été exclus de l'analyse de ces caractères.

*Le nombre de clones analysé pour chacun des caractères est synthétisé dans la Table 3-3.*

## **3.5 Analyses statistiques**

Les variables ont été analysées de plusieurs manières à l'aide des logiciels SAS (SAS Institute Inc., 2000) et R (R Development Core Team, 2012), afin de répondre aux objectifs des différents chapitres :

- par un modèle linéaire d'analyses des données répétées en considérant les données par clone, pour les différentes années (donnée répétée), et les deux dates de récolte (Chapitre 4) ;
- par des corrélations par variable et entre variables (Chapitres 4, 5, et 6-1) ;
- par des analyses en composantes principales (ACP) (Chapitre 4) ;
- par la méthode « PLS » (Partial Least Squares) pour l'obtention des modèles de calibration dans le cadre de la mise au point d'équations de calibration par spectroscopie proche infrarouge (Chapitre 6-2)

*Les détails concernant la réalisation de chacune de ces analyses seront précisés au sein des différents chapitres correspondants.*

*Les différentes analyses statistiques réalisées dans chacun des chapitres concernés, ainsi que les variables, l'organe de la plante, les facteurs de variation, et les modalités de facteurs utilisés sont synthétisés dans la Table 3-3.*

**Table 3-3 : Synthèse des analyses statistiques réalisées au sein des différents chapitres de la thèse avec les détails des variables, des organes de la plante considérés, des facteurs de variation et des modalités de chaque facteur**

Chapitre	Analyse statistique	Variable	Organe de la plante	Facteur de variation / Modalités des différents facteurs		
				Clone	Année de culture	Date de récolte
Modèle linéaire d'analyse des données répétées	Nombre de tiges par plante	Production de biomasse aérienne	Partie aérienne totale	21 clones	5 années (2, 3, 4, 5, et 6)	
		Date d'émergence des pousses	-	21 clones		
		Date de floraison	-	19 clones (sans Pur et Str)		
		Hauteur de végétation	-	21 clones		
		Diamètre des tiges	-	19 clones (sans H5 et Sac)		
		Ratio feuilles/tiges	Partie aérienne totale	21 clones		
		Teneur en cellulose		19 clones (sans Her et Pun)	3 années (3, 4, et 5)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Teneur en hémicelluloses	Partie aérienne totale,			
		Teneur en lignines	feuilles, et tiges	19 clones (sans Her et Pun)		
		Teneur en solubles				
		Teneur en cendres				
4 ACP	ACP	Production de biomasse aérienne	Partie aérienne totale			
		Date d'émergence des pousses	-			
		Date de floraison	-			
		Hauteur de végétation	-			
		Nombre de tiges par plante	-			
		Diamètre des tiges	-			
		Ratio feuilles/tiges	Partie aérienne totale	Clones communs à toutes les variables : 15 clones	Moyenne des 3 années (sans H5, Her, Pun, Pur, Sac, Str)	Moyenne des 2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Teneur en cellulose				
		Teneur en hémicelluloses	Partie aérienne totale,			
		Teneur en lignines	feuilles, et tiges			
		Teneur en solubles				
		Teneur en cendres				
Corrélations par variable	Corrélations par variable	Rendement potentiel en cellulose				
		Rendement potentiel en hémicelluloses	Partie aérienne totale			
		Rendement potentiel en lignines				
		Teneur en cellulose				
		Teneur en hémicellulloses				
Corrélations entre variables	Corrélations entre variables	Teneur en lignines	Feuilles et tiges	Clones communs aux variables : 19 clones (sans Her et Pun)	3 années (3, 4, et 5)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Teneur en solubles				
		Teneur en cendres				
		Ratio feuilles/tiges	Partie aérienne totale			
		Production de biomasse aérienne & Teneur en cellulose				
		Production de biomasse aérienne & Teneur en hémicelluloses				
		Production de biomasse aérienne & Teneur en lignines				
		Production de biomasse aérienne & Teneur en solubles	Partie aérienne totale	Clones communs aux variables : 19 clones (sans Her et Pun)	3 années (3, 4, et 5)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Production de biomasse aérienne & Teneur en cendres				

(Suite Table 3-3 page suivante)

Table 3-3 (suite)

Chapitre	Analyse statistique	Variable	Organe de la plante	Facteur de variation / Modalités des différents facteurs		
				Clone	Année de culture	Date de récolte
5	Corrélations entre variables	Teneur en xylose potentiellement disponible après prétraitement & Teneur en hémicelluloses	Partie aérienne totale	5 clones (Flo, GIB, H8, Rot, Sil)	1 année (7) *	1 date de récolte (hivernale)
		Teneur en xylose libre après prétraitement & Teneur en hémicelluloses				
		Rendement en glucose cellulosique potentiellement disponible après prétraitement & Teneur en cellulose				
		Rendement en glucose cellulosique extrait après hydrolyse enzymatique & Teneur en cellulose				
		Rendement en glucose cellulosique extrait après hydrolyse enzymatique & Teneur en lignines				
		Potentiel en éthanol de la biomasse & Teneur en lignines				
		Potentiel en éthanol de la biomasse & Teneur en cellulose				
6-1	Corrélations par variable	Potentiel en éthanol de la biomasse & Teneur en hémicelluloses	Partie aérienne totale	19 clones (sans H5 et Sac)	5 années (2, 3, 4, 5, et 6)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Production de biomasse aérienne				
		Date de floraison				
		Hauteur de végétation				
		Nombre de tiges par plante				
		Diamètre des tiges				
		Volume aérien de la plante				
6-2	Corrélations entre variables	Teneur en cellulose	Partie aérienne totale	19 clones (sans Her et Pun)	3 années (3, 4, et 5)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Teneur en hémicelluloses				
		Teneur en lignines				
		Teneur en solubles				
		Teneur en cendres				
		Production de biomasse aérienne & Date de floraison				
		Production de biomasse aérienne & Hauteur de végétation				
Méthode "PLS"	Méthode "PLS"	Production de biomasse aérienne & Nombre de tiges par plante	Partie aérienne totale	19 clones (sans H5 et Sac)	5 années (2, 3, 4, 5, et 6)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Production de biomasse aérienne & Diamètre des tiges				
		Production de biomasse aérienne & Volume aérien de la plante				
		Teneur en cellulose				
		Teneur en hémicelluloses				
6-2	Méthode "PLS"	Teneur en lignines	Partie aérienne totale	19 clones (sans Her et Pun)	3 années (3, 4, et 5)	2 dates de récolte (automnale et hivernale)
		Teneur en solubles				
		Teneur en cendres				

\* Les 5 clones utilisés pour ce chapitre ont été récoltés en récolte hivernale de la 7<sup>ème</sup> année.

### 3.6 Références bibliographiques

- Arnoult, S., Quillet, M.C., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** Miscanthus Clones Display Large Variation in Floral Biology and Different Environmental Sensitivities Useful for Breeding. *Bioenergy Research* 7:430-441.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Cosentino, S.L., Patane, C., Sanzone, E., Copani, V., and Foti, S. 2007.** Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25:75-88.
- Gauder, M., Graeff-Hönninger, S., Lewandowski, I., and Claupein, W. 2012.** Long-term yield and performance of 15 different *Miscanthus* genotypes in southwest Germany. *Annals of Applied Biology* 160:126-136.
- Godin, B., Agneessens, R., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Gerin, P.A., and Delcarte, J. 2011.** Review on analytical methods for lignocellulosic biomass structural polysaccharides. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 15:165-182.
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of *Miscanthus* in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Karp, A., and Shield, I. 2008.** Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179:15-32.
- Le Ngoc Huyen, T., Rémond, C., Dheilly, R.M., and Chabbert, B. 2010.** Effect of harvesting date on the composition and saccharification of *Miscanthus x giganteus*. *Bioresource Technology* 101:8224-8231.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- Lewandowski, I., and Kicherer, A. 1997.** Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *European Journal of Agronomy* 6:163-177.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., and Christou, M. 2003b.** The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass & Bioenergy* 25:335-361.
- R Development Core Team. 2012.** version « 2.15.1 ».
- SAS Institute Inc. 2000.** SAS user's guide: statistics. Cary, NC, USA.
- Strullu, L., Cadoux, S., Preudhomme, M., Jeuffroy, M.H., and Beaudoin, N. 2011.** Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus x giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research* 121:381-391.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 50:50-55.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different *Miscanthus* species at two harvest dates. *Biomass & Bioenergy* 35:637-651.
- Zub, H.W., Monod, H., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012b.** An Index of Competition Reduces Statistical Variability and Improves Comparisons between Genotypes of *Miscanthus*. *Bioenergy Research* 5:829-840.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012c.** Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones. *Bioenergy Research* 5:841-854.

## Chapitre 4

# ***Miscanthus clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition***

Stéphanie Arnoult<sup>1,2</sup>, Annabelle Obeuf<sup>1</sup>, Linda Béthancourt<sup>1</sup>, Marie-Chantal Mansard<sup>2</sup>,  
and Maryse Brancourt-Hulmel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1281 SADV, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>2</sup> (Current address) INRA, UE0972 GCIE Picardie, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>3</sup> INRA, UR1158 AgroImpact, Site d'Estrées-Mons, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

**Keywords:**  
*Miscanthus clones,*  
*Biomass production,*  
*Biomass composition,*  
*Relationships,*  
*Cellulosic ethanol production*

Ce chapitre a été publié dans le journal *Industrial Crops and Products*  
63:316-328 (2015).



## **Abstract**

The perennial miscanthus crop is a promising feedstock for cellulosic ethanol production due to its high yield, low input and low environmental impacts. To be suitable for cellulosic ethanol production, cultivated *Miscanthus* clones need to present not only high aboveground biomass production, but also high cellulose and hemicellulose contents and low lignin, soluble, and ash contents.

By testing *M. x giganteus*, *M. sacchariflorus*, and *M. sinensis* clones, we investigated the relationships between biomass production and biomass composition traits at two harvest dates over three years.

High aboveground biomass production was associated with high canopy height, high stem diameter, late flowering, and high cellulose and lignin contents but low hemicellulose, soluble, and ash contents. The aboveground biomass production was positively correlated with the potential yields of cellulose, hemicelluloses, and lignins. These relationships were consistent throughout the years and the harvest dates. The most productive *Miscanthus* clones displayed high cellulose contents and low soluble and ash contents; however, they displayed low hemicellulose contents and high lignin contents. The total aboveground biomass composition was closer to the stem composition than to the leaf composition. Nevertheless, the leaves were interesting because of their high hemicellulose and low lignin contents. Lastly, all of the studied factors were significant, but the biomass production traits were mainly affected by the year of cultivation or clone, while the biomass composition traits were mainly affected by the harvest date. All of the traits showed low interaction effects.

These results will guide the breeding of miscanthus clones that are tailored for biofuel production.

## **Abbreviations**

ADF, acid detergent fiber

ADL, acid detergent lignin

DM, dry matter

NDF, neutral detergent fiber

PCA, principal component analysis

t, ton

VS, Van Soest

## 4.1 Introduction

Various crops are interesting candidates for the production of cellulosic ethanol. To be suitable for cellulosic ethanol production, such crops need to combine (i) a high aboveground biomass production with a composition maximizing the process conversion (Godin et al., 2010), (ii) low inputs, and (iii) a low environmental impact (Gabrielle et al., 2014b).

The biomass composition and more particularly the cell wall composition are considered today as major challenges in enhancing the conversion efficiency of such processes. Several studies have reported that the cell wall architecture mainly influences the efficiency of the conversion process (Sticklen, 2006; McCann and Carpita, 2008; Jakob et al., 2009; Godin et al., 2010). The cell wall contains mainly cellulose, hemicelluloses, and lignins that are organized in a complex structure. Cellulose is a polymer of hexose sugars, and hemicelluloses are polymers of hexose and pentose sugars. These polymers are of particular interest for cellulosic ethanol production: they are hydrolyzed by enzymes in monomer of sugars, which are themselves fermented by microorganisms (DGEC, 2010). However, (i) lignins restrict the accessibility of enzymes to cellulose and hemicelluloses during enzymatic hydrolysis, and (ii) lignins are a source of inhibitory substances that can decrease the microorganism activity during fermentation (Tran and Chambers, 1985; Klinke et al., 2004; McCann and Carpita, 2008; Godin et al., 2010). This process requires, therefore, high cellulose and hemicellulose (holocellulose) contents (van der Weijde et al., 2013) but low lignin contents in the aboveground biomass (Chang and Holtzapple, 2000). In addition, low ash and soluble contents are preferable for such processes (Dumas and Navard, personal communication). From these considerations, the aboveground biomass production of the candidate crops is expected to be high in order to maximize the amounts in cellulose and hemicelluloses in the cell wall.

Among the candidate crops, the lignocellulosic C4 perennial miscanthus crop, and more specifically the species *Miscanthus x giganteus*, is of particular interest to target cellulosic ethanol production because it combines high biomass production with a low environmental impact (Clifton-Brown et al., 2004; Lewandowski and Schmidt, 2006; Hastings et al., 2008; Cadoux et al., 2014). Compared to other *Miscanthus* species, this species also contains a high cellulose content, which is expected for the cellulosic ethanol conversion process (Allison et al., 2011). However, this species shows a high lignin content, which is not suitable for this process (Allison et al., 2011).

Among the twenty species within the *Miscanthus* genus (Hodkinson et al., 2002), many studies have reported various potentials in biomass production and various cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents in the aboveground biomass (Clifton-Brown et al., 2001b; Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Clifton-Brown et al., 2008; Jezowski, 2008; Hodgson et al., 2010b; Allison et al.,

2011; Zub et al., 2011; Baxter et al., 2012; Gauder et al., 2012; Qin et al., 2012). These results are encouraging for the selection of other *Miscanthus* clones than *M. x giganteus* clones, which will combine favorable biomass production and composition traits for cellulosic ethanol production. However, (i) the miscanthus aboveground biomass production is a complex trait that is determined by earliness and morphological traits, such as the canopy height, stem number per plant, and stem diameter (Zub et al., 2011; Robson et al., 2013). Regarding the miscanthus biomass composition, (ii) Allison et al. (2011) highlighted variable correlations between cellulose, lignin, and hemicellulose contents. In addition, miscanthus biomass composition differs between the stems and leaves, and the ratio between the stems and leaves varies according to the *Miscanthus* clones (Kalembasa et al., 2005). Lastly, (iii) the traits that are related to biomass production and composition vary according to the *Miscanthus* clone, the year of cultivation, and the harvest date (Lewandowski and Kicherer, 1997; Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Kaack et al., 2003; Allison et al., 2011; Zub et al., 2011; Gauder et al., 2012; Qin et al., 2012; Godin et al., 2013a, b; Larsen et al., 2014).

Previous studies have been conducted on miscanthus biomass production and composition but mainly separately. Little attention has been paid to the relationships between both types of traits that are related to biomass production and biomass composition in miscanthus. However, based on previous observations, we first hypothesized that there are synergistic and antagonistic relationships between the traits of interest that are related to biomass production and composition, resulting in most productive *Miscanthus* clones not always being the most suitable clones for the biomass composition. Second, we hypothesized that the relationships between the biomass production and the biomass composition traits were consistent in the function of the year of cultivation and the harvest date in miscanthus.

The aim of this study was therefore to characterize the relationships between the traits that are related to biomass production and biomass composition in miscanthus. For this objective, we first generated preliminary results on the variability of the traits that are related to biomass production and biomass composition in 21 *Miscanthus* clones. Here, we focused on the main effects and interactions of the clone, the harvest date, and the year of cultivation. The biomass composition was investigated in different parts of the plant: the total aboveground part, the stems, and the leaves. Second, we explored the relationships between these traits to identify the synergistic and antagonistic traits between the biomass production and biomass composition traits. Here, we considered separately the composition of the total aboveground biomass, the stems, and the leaves. Third, we explored the stability of the relationships between the aboveground biomass production and each of the cellulose, hemicellulose, lignin, soluble, and ash contents in the total aboveground biomass. We focused on the stability of these relationships over years of cultivation and harvest dates, which had a significant effect on the traits of interest. Fourth, we explained the variations in

the composition of the total aboveground biomass by the contribution of the leaves and the stems. We lastly investigated the characteristics of the studied clones to determine whether the most productive *Miscanthus* clones are also the most suitable clones in terms of biomass composition for cellulosic ethanol production.

This study will contributes to new knowledge regarding the relationships between the miscanthus biomass production and composition traits, which will be particularly useful in breeding suitable *Miscanthus* clones for cellulosic ethanol production.

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Experimental site and climatic conditions

The experimental site is in the Picardie region of Northern France (49°53'N, 3°00'E) at the INRA experimental unit in Estrées-Mons. The soil is a deep loam soil (Orthic Luvisol, FAO classification). The climate is oceanic. The rainfall and temperature data (see Table 4-1) were collected throughout the experiment by a local meteorological station 1 km away from the trial.

**Table 4-1: Temperature and rainfall that are recorded during the years of experimentation, from 2007 to 2013**

Year of cultivation	Mean temperature (°C)			Total rainfall (mm)		
	During growth period		Annual	During dormancy		Annual
	a	b		a	b	
1 (2007-08)	14.8	5.7	11.0	394	248	642
2 (2008-09)	14.5	3.9	10.1	490	163	653
3 (2009-10)	15.0	4.3	10.6	298	280	577
4 (2010-11)	14.4	4.5	10.3	365	224	589
5 (2011-12)	15.4	5.9	11.5	332	236	568
6 (2012-13)	14.3	3.9	10.0	453	224	677

<sup>a</sup> According to the experimental conditions of the trial site, the growth period was between the 1<sup>st</sup> of April and the 31<sup>st</sup> of October

<sup>b</sup> The period of dormancy corresponded to a period of slow functioning and of a gradual storage of nutrients in the rhizome. This period of dormancy was defined in our experimental conditions between the 1<sup>st</sup> of November and the 31<sup>st</sup> of March

## 4.2.2 Experimental design

The experimental design of the trial was a split plot design: the harvest date factor was the whole-plot factor (main plot) and the clone factor was the subplot factor. The levels of the harvest date factor were randomly assigned to whole-plots. The levels of the clone factor were randomly assigned to split plots (subplots) within each whole-plot. Two levels of the harvest date factor were tested: an autumn harvest was carried out in autumn at the end of the growing period, and a winter harvest was carried out at the end of winter at over-maturity. Twenty one clones of *Miscanthus* were studied: 4 clones were identified as *M. x giganteus* clones, 15 clones as *M. sinensis* clones, and 2 clones as *M. sacchariflorus* clones (Table 4-2). Among the 4 clones of *M. x giganteus*, H8 was considered as a *M. x giganteus* clone as it was a hybrid between *M. sacchariflorus* and *M. sinensis*. Using AFLP markers, the clone named “Flo” belonged to the *M. x giganteus* species (Rambaud, personal communication). The design contained three blocks.

**Table 4-2: Description of the 21 *Miscanthus* clones that were studied during the experiment, including species, ploidy level, name, code and acquisition**

Species	Name	Code	Ploidy level <sup>a</sup>	Acquired from
<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i> UK	GiB	3x	United Kingdom, ADAS
	<i>M. x giganteus</i> DK	GiD	4x	Denmark, Nordic Biomass
	<i>M. x giganteus</i> Floridulus <sup>b</sup>	Flo	3x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Hybrid 8	H8 <sup>c</sup>	2x	Danish institute of agricultural science, Aarhus
<i>M. sacchariflorus</i>	<i>M. sacchariflorus</i>	Sac	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sacchariflorus</i> Hybrid 5	H5 <sup>c</sup>	4x	Danish institute of agricultural science, Aarhus
<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i> August Feder	Aug	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Ferner Osten	Fer	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Flamingo	Fla	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Goliath	Gol	4x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Goliath DK	GoD	4x	Denmark, Nordic Biomass
	<i>M. sinensis</i> Graziella	Grz	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Herman Müssel	Her	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Hybrid 6	H6 <sup>c</sup>	4x <sup>d</sup>	Danish institute of agricultural science, Aarhus
	<i>M. sinensis</i> Malepartus	Mal	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Punktchen	Pun	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Purpurescens	Pur	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Rotsilber	Rot	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Silberspinne	Sil	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Strictus	Str	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Yaku Jima	Yak	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld

<sup>a</sup> From Zub et al. (2012c)

<sup>b</sup> The clone named “Flo” belonged to the *M. x giganteus* species (Rambaud, personal communication)

<sup>c</sup> Clones that were already studied during the three year trial carried out in five sites in Europe (Clifton-Brown et al., 2001b)

<sup>d</sup> The clone H6 was a tetraploid clone (4x) (Rambaud, personal communication)

Each subplot of 16 m<sup>2</sup> consisted of four rows of eight plants that were planted at a density of 2 plants per m<sup>2</sup>. A border row was planted on each side of the plot for edging using the same clone, *M. sinensis* Malepartus.

#### **4.2.3 Management of the trial**

The trial was planted by hand in spring 2007 at a rhizome planting density of 2 plants per m<sup>2</sup>. The plants were watered immediately after planting to ensure good root contact with the soil. No irrigation was applied during the following years of cultivation. No fertilizer was applied during the entire experiment. The weeds were controlled each year by hand and machine hoeing.

#### **4.2.4 Measurements and observations**

The traits that are studied on each clone are presented in Table 4-3, which summarizes the years of cultivation, the blocks of the trial, the harvest dates, and the parts of the plant that were used to study each trait. The corresponding data were given in supplemental tables (Tables A 4-1 and A 4-2, p 150-153).

**Table 4-3: List of the studied traits with the details of the years of cultivation, the blocks of the trial, the harvest dates, and the parts of the plant that were used for each trait**

	<b>Developmental stages</b>	<b>Aboveground biomass production</b>	<b>Biomass components</b>	<b>Biomass composition</b>
<b>Trait</b>	Emergence date (EmergenceDate) Flowering date (FloweringDate)	Aboveground biomass production (Yield)	Canopy Height (CanopyHeight) Stem number per plant (StemNb) Stem diameter (StemDiameter) Leaf/Stem ratio (LeafStemRatio)	Cellulose content (Cellulose) Hemicellulose content (Hemicellulose) Lignin content (Lignin) Soluble content (VS Soluble) Ash content (Ash)
<b>Year after planting</b>	3-5 (2009-2011)	2-6 (2008-2012)	3-5 (2009-2011)	3-5 (2009-2011)
<b>Harvest date</b>	Autumn and winter harvest	Autumn and winter harvest	Autumn and winter harvest	Autumn and winter harvest
<b>Part of the plant</b>		Total aboveground biomass		Total aboveground biomass Leaves Stems

**a. Developmental stages**

The emergence date and flowering date were observed in the third, fourth, and fifth years after planting (2009 to 2011).

The emergence date was estimated by counting the number of plants for which one shoot emerged within each plot. This count was recorded every 2 to 3 days during the months of March, April, and May, corresponding to the beginning of the growing period. The emergence date corresponded to the date on which 50 % of the plants of the plot showed at least a single emerged shoot.

The flowering date was recorded for each plot by counting the number of plants for which at least a single flower was opened. This count was performed during the months of July, August, September, and October, corresponding to the flowering period as a function of the earliness of the clones. The flowering date corresponded to the date for which 50 % of the plants in each plot had their flowers opened. The flowering date was not recorded for some clones that did not flower in the Picardie region as the flowering stage was not reached, which is the case of the clones Flo, GiB, GiD, and H5. As these clones were of particular interest in our study because of their high aboveground biomass production, we considered that a close approximation of their flowering date was given by the first day of frost for each year when the average daily temperature was below to zero.

**b. Aboveground biomass production**

The aboveground biomass production was assessed each year for five years, from the second to the sixth year after planting (2008 to 2012), and for each harvest date. The autumn harvest was conducted on the three blocks that were designated for this harvest date at the end of the growing period. The winter harvest was conducted on the remaining three blocks at the end of winter.

Each plot was harvested using a reed harvester. The plants were cut at a height of approximately 5 cm above the ground. The aboveground total fresh matter of each plot was weighed. A sample of approximately 500 g of fresh matter was randomly chosen from each plot and weighed. Each sample was dried at 65 °C for four days in a well-ventilated oven. The moisture content of each sample was measured. The dry matter weight, referred to below as the aboveground biomass production, was calculated and expressed in tons of dry matter per hectare (t DM/ha).

**c. Biomass components**

The canopy height, stem number per plant, stem diameter, and leaf/stem ratio were recorded in the third, fourth, and fifth years after planting (2009 to 2011). These observations were performed on each plot of the trial prior to each harvest.

For each plot, the canopy height and the stem number per plant were measured on the same 3 median plants that were determined by Zub et al. (2011). For each of these two traits, the averages were calculated from these 3 individual values.

The canopy height corresponded to the distance from the ground to the ligula of the last ligulated leaf.

The stem diameter was measured and averaged on a sample of 12 randomly chosen stems per plot. This measure was performed on the stems at 5 cm above the ground.

The leaf/stem ratio was also evaluated. For each plot, a random sample of green matter was harvested. For each sample, the stems and leaves were separated at the ligule level until 100 g of leaves were obtained. The stems and leaves samples were weighed and then dried at 65 °C for four days. The dry weight of the stems and leaves was obtained, and the leaf/stem ratio was calculated. The trait “leaf/stem ratio” will be presented with the traits that are related to biomass composition in the following section in order to facilitate the interpretation.

**4.2.5 Chemical analyses of the biomass composition**

The biomass composition of the total aboveground biomass, the stems, and the leaf samples that were harvested during the third, fourth, and fifth years after planting (2009 to 2011) was determined by chemical analyses.

**a. Sample preparation**

The previously dried samples of the total aboveground biomass, the leaves, and the stems were first ground with a crusher (Viking, model GE 220, France) at a coarse size and then ground with a hammer crusher (Gondard Productions model, France) to pass through a 1-mm screen, as recommended for subsequent fiber analysis by Van Soest (Van Soest, 1967).

**b. Determination of the cellulose, hemicellulose, lignin, and soluble contents**

The previous samples were analyzed by the laboratory LANO (Saint-Lô, France) for soluble (Van Soest soluble), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) according to a protocol that was adapted from the Van Soest method (Van Soest, 1967). Briefly, the NDF fraction corresponded to the ash-corrected residue that remained after refluxing for 60 minutes in a neutral buffered detergent solution. The ADF fraction corresponded to the ash-corrected residue remaining after refluxing the samples in a solution of hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.5 mol/L sulfuric acid. The ADL fraction was obtained by treating ADF with 72 % sulfuric acid.

The cellulose, hemicellulose, and lignin contents of each sample were estimated by subtracting the corresponding values from the NDF, ADF, and ADL fractions. (i) The NDF consists of cellulose, hemicelluloses, and lignins, (ii) the ADF consists of cellulose and lignins, and (iii) the ADL consists of lignins. The cellulose, hemicellulose, and lignin contents of each sample were estimated as shown below in equations (Eq. (1), Eq. (2), and Eq. (3)):

$$\text{Cellulose content (hereafter named Cellulose)} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad (1)$$

$$\text{Hemicellulose content (hereafter named Hemicellulose)} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (2)$$

$$\text{Lignin content (hereafter named Lignin)} = \text{ADL} \quad (3)$$

The Van Soest soluble content was calculated according to equation (Eq. (4)) and corresponds to the soluble NDF as follows:

$$\text{Van Soest Soluble content (hereafter named VS Soluble)} = 100 - \text{NDF} \quad (4)$$

The analytical dry matter content of each sample was determined at 103°C to express all the previous values in percentage of dry matter (% DM).

**c. Determination of the ash content**

The ash content, also named mineral compounds content in the literature, was determined in percentage of dry matter (% DM) and corresponds to the dry matter remaining after the calcination of the samples at 550 °C for 12 h.

**d. Calculation of the potential yields in cellulose, hemicelluloses, and lignins**

The potential yields in cellulose, hemicelluloses, and lignins of the total aboveground part (PotYieldCel, PotYieldHemicel, and PotYieldLignin respectively) were calculated, as these variables are important in determining the feedstock that is available for the conversion process. These variables corresponded to the aboveground biomass production multiplied by the cellulose, hemicellulose, and lignin contents respectively (expressed in tons of dry matter per hectare (t DM/ha)).

#### **4.2.6 Statistical analysis**

The experimental dataset was analyzed using the SAS Software (SAS Institute Inc., 2000) according to three methods: (i) linear modeling analysis of repeated data, (ii) principal components analysis (PCA), and (iii) simple linear regression analysis.

**a. Linear modeling analysis of repeated data**

The dataset was first analyzed for each studied trait by linear modeling of repeated data using the MIXED procedure (proc MIXED).

Due to missing data, we only considered the clones that were observed each year for the different studied traits. The emergence date, canopy height, stem diameter, and aboveground biomass production were analyzed using all of the 21 studied clones; the flowering date was analyzed on 19 clones (the 21 studied clones except for Pur and Str); the stem number was analyzed on 19 clones (the 21 studied clones except for H5 and Sac); and the leaf/stem ratio and contents in cellulose (Cellulose), hemicelluloses (Hemicellulose), lignins (Lignin), VS solubles (VS Soluble), and ash (Ash) were analyzed on 19 clones (the 21 studied clones except for Her and Pun).

The term ‘repeated data’ usually refers to multiple measurements that are taken in a sequence on the same experimental unit, and a repeated data analysis assumes a covariance between the repeated measurements, *i.e.*, a covariance matrix structure that is modeled for residuals (Littell et al., 1998; Littell et al., 2000). The experimental unit that was considered in this study was the plot. The year of cultivation was considered as repeated data (temporal repetition) because the same plots were harvested each year. Therefore, we distinguished the repeated spatial measures from the repeated temporal measures. The repeated spatial measures corresponded to the blocks and the repeated temporal measures corresponded to the year of cultivation (Segura et al., 2008).

Although all of the effects were fixed effects, we used the MIXED procedure, which considered the missing values of our dataset and the repeated data of the design with more robustness than the GLM procedure (Littell et al., 1998; Wolfinger and Chang, 1998).

The following linear model was built for each studied trait:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + b_k + (\beta b)_{jk} + \delta_l + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\delta)_{il} + (\beta\delta)_{jl} + \varepsilon_{ijkl}$$

where  $Y_{ijkl}$  is the phenotypic value of clone  $i$  on harvest date  $j$  in block  $k$  during the year of cultivation  $l$ ;  $\mu$  is the overall mean;  $\alpha_i$  is the fixed effect of the clone  $i$ ;  $\beta_j$  is the fixed effect of the harvest date  $j$ ;  $b_k$  is the random effect of the block  $k$ ;  $(\beta b)_{jk}$  is the random interaction between the harvest date  $j$  and the block  $k$ ;  $\delta_l$  is the fixed effect of the year of cultivation  $l$ ;  $(\alpha\beta)_{ij}$  is the fixed interaction between clone  $i$  and the harvest date  $j$ ;  $(\alpha\delta)_{il}$  is the fixed interaction between clone  $i$  and the year of cultivation  $l$ ;  $(\beta\delta)_{jl}$  is the fixed interaction between the harvest date  $j$  and the year of cultivation  $l$ ; and  $\varepsilon_{ijkl}$  is the residual error for clone  $i$  on harvest date  $j$  for block  $k$  during the year of cultivation  $l$ .

To analyze a split plot design, the PROC MIXED estimated variance components for block factor, harvest date\*block interaction, and the residual, and it automatically incorporated the correct error term into test statistics (SAS Institute Inc., 2000).

The existence of repeated data in the previous model assumed a covariance between these repeated data, *i.e.*, a covariance matrix structure that is modeled for residuals. Therefore, several covariance structures were tested to model the residuals of each trait. First, an unstructured covariance matrix (UN) was considered in the model to compute the variances and covariances among the years of cultivation (ages of the crop). Second, if the variances and covariances showed a possible structure, a structured covariance matrix was chosen and fitted to the data. The following covariance structures were tested: unstructured corrs (UNR), heterogeneous compound symmetry (CSH), heterogeneous toeplitz (TOEPH); first-order antedependence (ANTE(1), heterogeneous covariances and variances between ages); first-order autoregressive (AR(1)); and heterogeneous first-order autoregressive (ARH(1), heterogeneous variances and covariances decreasing with increasing lag between ages). More details on covariance structures can be found in the mixed procedure section of SAS® v.8 software documentation (SAS Institute Inc., 2000). Third, the covariance structure that minimized the BIC (Bayes Schwarz Information Criterion) was selected (Littell et al., 1998; Littell et al., 2000).

Due to missing values for some of the studied traits, the type III sums of squares were used for the calculation of F statistics to analyze the fixed effects on the traits.

**b. Principal components analysis (PCA)**

The interdependence between the aboveground biomass production, the biomass production components, and the biomass composition was measured using correlation coefficients that were calculated on plot means. The correlation matrix was then analyzed according to the Principal Component Analysis (PCA) using the PRINCOMP procedure. An analysis of a plot displaying the correlations between each trait and each component in Cartesian diagrams guided the interpretation of the correlation matrix. The independence of each measurement was assumed for all of the recorded traits.

A subset of 15 clones for which all of the studied traits were observed was used for this analysis; the other 6 clones were not included in the analysis as missing values for some of the traits studied on these clones could bias the analysis.

A total of 15 traits were used in the PCA analysis: emergence date (EmergenceDate); flowering date (FloweringDate); Canopy height (CanopyHeight); stem number per plant (StemNb); stem diameter (StemDiameter); contents of cellulose, hemicellulose, lignin, ash, and VS soluble (Cellulose, Hemicellulose, Lignin, VS Soluble, and Ash, respectively); leaf/stem ratio (LeafStemRatio); aboveground biomass production (Yield); and yield potentials of cellulose, hemicelluloses, and lignins (PotYieldCel, PotYieldHemicel, PotYieldLignin, respectively). The aboveground biomass production (Yield) and yield potentials of cellulose, hemicelluloses, and lignins (PotYieldCel, PotYieldHemicel, PotYieldLignin, respectively) were considered supplementary variables in the analysis, *i.e.*, were not used to determine the principal components. The cellulose, hemicellulose, lignin, ash, and VS soluble contents were individualized in the analysis for each part of the plant studied: total aboveground biomass, leaves (Leaf), and stems (Stem).

**c. Simple linear regression analysis**

As the entire aboveground part of the plant will be used to produce cellulosic ethanol, a first linear regression analysis was carried out between the biomass composition of the total aboveground biomass (cellulose, hemicellulose, lignin, VS soluble, and ash contents) and the aboveground biomass production. Then, a second linear regression analysis was carried out between the composition of the leaves and of the stems to investigate the contribution of the leaves and of the stems to the total aboveground biomass composition.

In these analyses, we used 19 clones corresponding to the 21 clones that were used in our experiment except for Her and Pun, for which there were missing values for the biomass composition traits.

The correlations between the traits were explored using the Pearson correlation coefficient of the CORR procedure. The p-values that were associated with these correlations were also calculated using the CORR procedure.

## **4.3 Results**

### **4.3.1 The year or clone mainly affected biomass production traits, while the harvest date mainly impacted biomass composition traits**

Considering the traits that are related to biomass production, the aboveground biomass production, stem number per plant, and emergence date were significantly and mainly influenced by the year of cultivation (Table 4-4). The effect of the year of cultivation was particularly great on the aboveground biomass production, possibly due to the fourth year of cultivation for which the environmental conditions were particularly favorable for growth and then led to a high biomass production compared to the other years (data not shown). In contrast, the canopy height, stem diameter, and flowering date were significantly and mainly influenced by the clone (Table 4-4). All of the interactions were significant but rather small (Table 4-4).

In contrast, the composition of the total aboveground biomass was strongly affected by the harvest date, except for hemicellulose content (Table 4-5). The clone and year of cultivation effects were much smaller and varied within the same range for the total aboveground biomass composition-related traits (Table 4-5). Compared to the biomass production-related traits, many interactions were either not significant or had a low effect on the composition of the total aboveground biomass (Table 4-5).

Considering the contribution of the stems and the leaves to these variations, the stems behaved similarly to the total aboveground biomass (Table 4-5). The harvest date had no effect on the hemicellulose content in the stems (Table 4-5). In the leaves, the lignin and ash contents had a stronger effect by the year of cultivation (Table 4-5). In addition, the leaf/stem ratio behaved similarly to the traits that are related to the total aboveground biomass composition (Table 4-5).

Lastly, the clone, harvest date, and year of cultivation clearly strongly influenced traits that are related to the biomass production and composition compared to the clone × harvest date and clone × year of cultivation interactions (Tables 4-4 and 4-5).

In summary, the aboveground biomass production-related traits were mainly affected by the year or clone, while the aboveground biomass composition-related traits were mainly influenced by the harvest date.

**Table 4-4: Linear modeling analyses of repeated data using 21 *Miscanthus* clones for the aboveground biomass production, its components, and the developmental stages**

Trait	Above-ground biomass production		Biomass production components				Developmental stages			
	Canopy height (cm)	Stem number per plant	Stem diameter (mm)	Emergence date (DOY)	Flowering date (DD)					
Source of variation	DF	F (Type III)	DF	F (Type III)	DF	F (Type III)	DF	F (Type III)	DF	F (Type III)
Clone	20	66.9 *	20	497.7 *	18	125.1 *	20	448.5 *	20	91.1 *
Harvest date	1	42.9 *	1	40.8 *	1	0.2 ns	1	78.1 *	1	25.5 *
Year of cultivation	4	1016.4 *	2	144.7 *	2	363.5 *	2	7.0 *	2	683.8 *
Clone * Harvest date	20	2.3 *	20	2.5 *	18	2.4 *	20	5.1 *	20	8.3 *
Clone * Year of cultivation	80	18.6 *	40	15.9 *	36	12.5 *	40	2.6 *	40	7.5 *
Harvest date * Year of cultivation	4	46.4 *	2	9.8 *	2	3.2 *	2	11.0 *	2	8.9 *

The aboveground biomass production was assessed in the autumn and winter harvests of the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup>, and 6<sup>th</sup> years after planting; the canopy height, stem number per plant, and stem diameter were recorded in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 5<sup>th</sup> years after planting. These observations were carried out at the end of the growing season in all of the plots; the emergence date and flowering date were observed in the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 5<sup>th</sup> years after planting in all of the plots of the trial.

DD, degree day; DF, degree of freedom; DM, dry matter; DOY, day of year; F, F value; ns, no significant

\*, significant at the 0.05 probability level

**Table 4-5: Linear modeling analyses of repeated data using 21 *Miscanthus* clones for the total aboveground biomass, stems, and leaves composition**

Trait	Leaf/Stem Ratio	Cellulose (%DM)	Hemicellulose (%DM)	Lignin (%DM)	VS Soluble (%DM)	Ash (%DM)
<b>Part of the plant: Total above-ground biomass</b>						
Source of variation	DF	F (Type III)				
Clone	18	65.4 *	93.2 *	118.3 *	132.9 *	44.4 *
Harvest date	1	671.6 *	3154.5 *	106.8 *	1392.2 *	6137.4 *
Year of cultivation	2	6.2 *	43.6 *	196.6 *	342.8 *	86.7 *
Clone * Harvest date	18	33.1 *	8.5 *	7.8 *	3.6 *	5.8 *
Clone * Year of cultivation	36	1.8 *	1.5 *	1.8 *	3.4 *	1.1 ns
Harvest date * Year of cultivation	2	2.1 ns	4.8 *	10.5 *	8.0 *	12.4 *
<b>Part of the plant: Stems</b>						
Source of variation	DF	F (Type III)				
Clone	18		62.8 *	108.6 *	124.8 *	39.0 *
Harvest date	1		2295.4 *	1.8 ns	454.4 *	4771.7 *
Year of cultivation	2		9.9 *	59.2 *	48.0 *	110.4 *
Clone * Harvest date	18		7.3 *	8.3 *	5.9 *	15.4 *
Clone * Year of cultivation	36		2.8 *	4.1 *	5.2 *	5.5 *
Harvest date * Year of cultivation	2		8.2 *	1.2 *	8.9 *	33.1 *
<b>Part of the plant: Leaves</b>						
Source of variation	DF	F (Type III)				
Clone	18		49.0 *	20.7 *	12.1 *	42.5 *
Harvest date	1		999.2 *	121.5 *	57.1 *	1382.1 *
Year of cultivation	2		200.5 *	77.6 *	72.1 *	88.6 *
Clone * Harvest date	18		6.9 *	7.4 *	8.5 *	14.5 *
Clone * Year of cultivation	36		10.3 *	5.4 *	1.9 *	7.6 *
Harvest date * Year of cultivation	2		7.1 *	13.0 *	1.6 ns	32.6 *
						1.9 ns

The leaf/stem ratio, cellulose, hemicellulose, lignin, VS soluble, and ash contents were assessed on the samples of total aboveground biomass, stems, and leaves obtained from the autumn and the winter harvests of the 3rd, 4th, and 5th years after planting.

F, F value; DF, degree of freedom; DM, dry matter; VS, Van Soest; ns, no significant

\*, significant at the 0.05 probability level

#### **4.3.2 High biomass production, height, stem diameter, and late flowering were associated with high cellulose and lignin contents**

As the clone × harvest date and clone × year of cultivation interactions were low in comparison to the main effects, there was no difference in the position of a given trait according to the year and the harvest date on the Cartesian diagram of the principal component analysis (data not shown).

Therefore, the aboveground biomass production measured for each clone was represented by the accumulation of the aboveground biomass production that was calculated in the third, fourth, and fifth years for each clone and averaged for the two harvest dates (autumn and winter). All other variables measured for each clone were averaged from the third to the fifth years and for the two harvest dates.

The first two principal components (PCs) accounted for more than 75 % of the total variation (Figure 4-1 a). The first component (PC 1) accounted for a very high value of the variation in the correlation matrix (59.9 %). PC 1 indicated that seven traits had high positive loadings ( $> 0.8$ ): CanopyHeight, StemDiameter, FloweringDate, Cellulose, Lignin, Cellulose\_Stem, and Lignin\_Stem (Figure 4-1 a). Moreover, the supplementary variables Yield, PotYieldCel, PotYieldHemicel, and PotYieldLignin were placed near these traits on the right of the first component and were, therefore, highly related to them (Figure 4-1 a). PC 1 also indicated that five traits had a high negative loading ( $< -0.8$ ): Hemicellulose, VS Soluble, Ash, Hemicellulose\_Stem, and Ash\_Stem (Figure 4-1 a). The second component (PC 2) explained 15.2 % of the variation. This component indicated that three traits had high positive loadings ( $> 0.6$ ): StemNb, Cellulose\_Leaf, and Lignin\_Leaf (Figure 4-1 a). This component also indicated that two traits had high negative loadings ( $< 0.7$ ): EmergenceDate and VS Soluble\_Leaf (Figure 4-1 a).

These results showed that the aboveground biomass production was mainly positively correlated with canopy height, stem diameter, and flowering date, as well as the cellulose and lignin contents. In contrast, the aboveground biomass production was mainly negatively correlated with the hemicellulose, VS soluble, and ash contents.

(Following page)

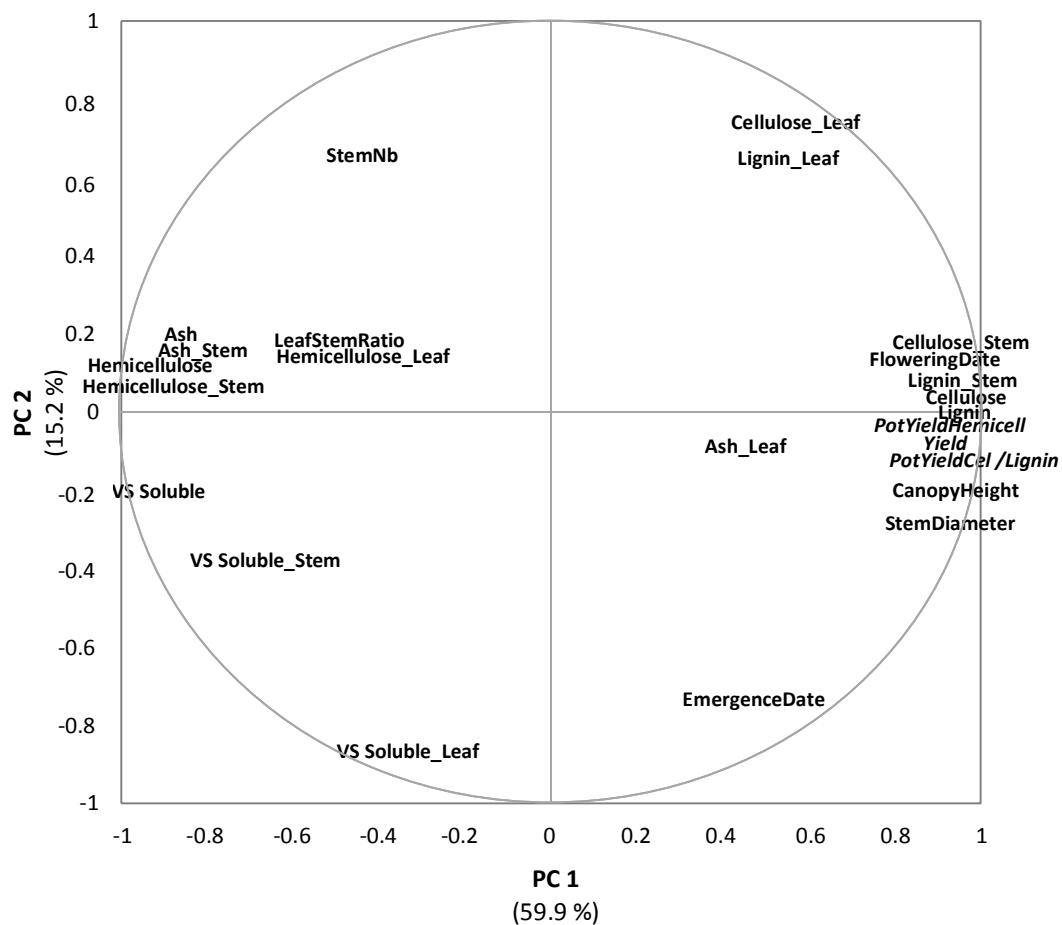
**Figure 4-1: (a) Principal component analysis (PCA) plot of variables that are related to the aboveground biomass production and biomass composition according to the first and the second principal components (PC 1 and PC 2, respectively); (b) Plot illustrating the repartition of the individuals (15 *Miscanthus* clones) according to PC 1 and PC 2.**

The four variables written in italics correspond to supplementary variables (*i.e.*, not used to determine the principal components).

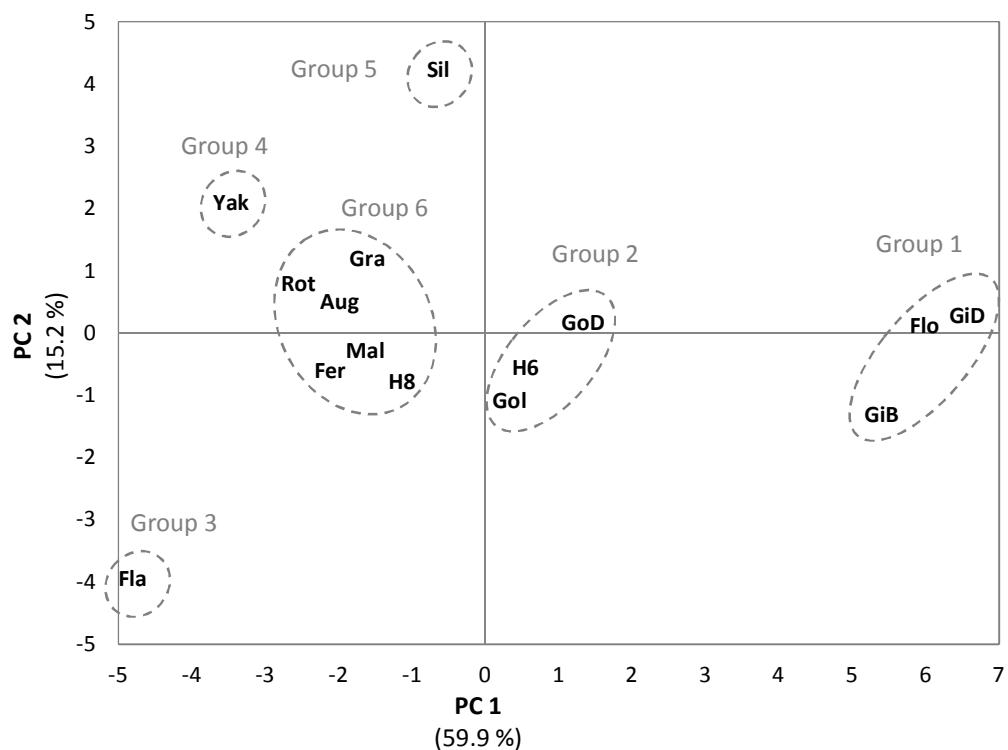
The ellipses are empirically built.

For more details, see § Materials and methods.

a



b



### **4.3.3 The relationships between the biomass production and the biomass composition were consistent over the harvest dates and years**

With correlation coefficients ranging from 0.39 to 0.81 in absolute value, the correlations between the traits that are related to the composition of the total aboveground biomass and the aboveground biomass production were all significant and rather high (Figures 4-2 and 4-3).

Regarding the stability of the relationships as a function of the harvest date, the relationships were consistent between the harvest dates except for the relationship between the hemicellulose content in the total of aboveground biomass and the aboveground biomass production (Figure 4-2). For this relationship, there was a crossing of the curves between the autumn and winter harvests in the third and fifth years (Figure 4-2 d-f). This observation was consistent with the effect of the harvest date  $\times$  year of cultivation interaction which was higher for the hemicellulose content in the total aboveground biomass than for the other composition traits (Table 4-5). The cellulose and lignin contents in the total aboveground biomass were higher in the winter harvest than in the autumn harvest for each of the three years (Figure 4-2 a-c, g-i). In contrast, the VS soluble and ash contents in the total aboveground biomass were lower in the winter harvest than in the autumn harvest for each of the three years (Figure 4-3 a-f). These differences between the harvest dates were consistent with the high harvest date effect that was previously highlighted on these traits in the total aboveground biomass (Table 4-5).

Regarding the stability of these relationships as a function of the year of cultivation, these relationships were generally similar in the third and the fifth years of cultivation (Figures 4-2 and 4-3). However, these relationships stood out in the fourth year of cultivation: with lower slope coefficients than in the other two years, the regression lines of the winter harvest were especially noteworthy in this fourth year (Figures 4-2 and 4-3).

Briefly, the relationships between the aboveground biomass production and the aboveground biomass composition were rather consistent over the harvest dates and years of cultivation.

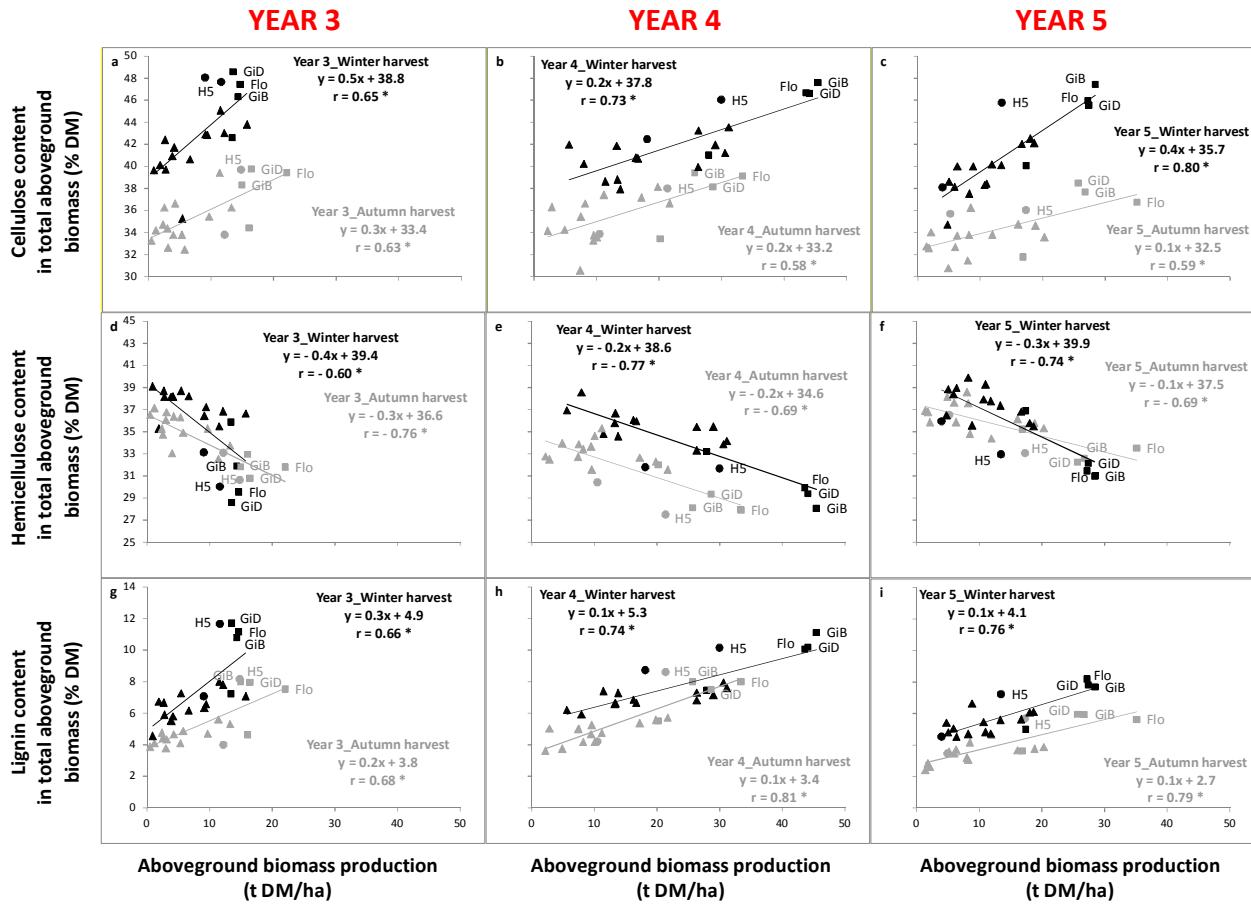
(Following page)

(Legend of the Figures 4-2 and 4-3)

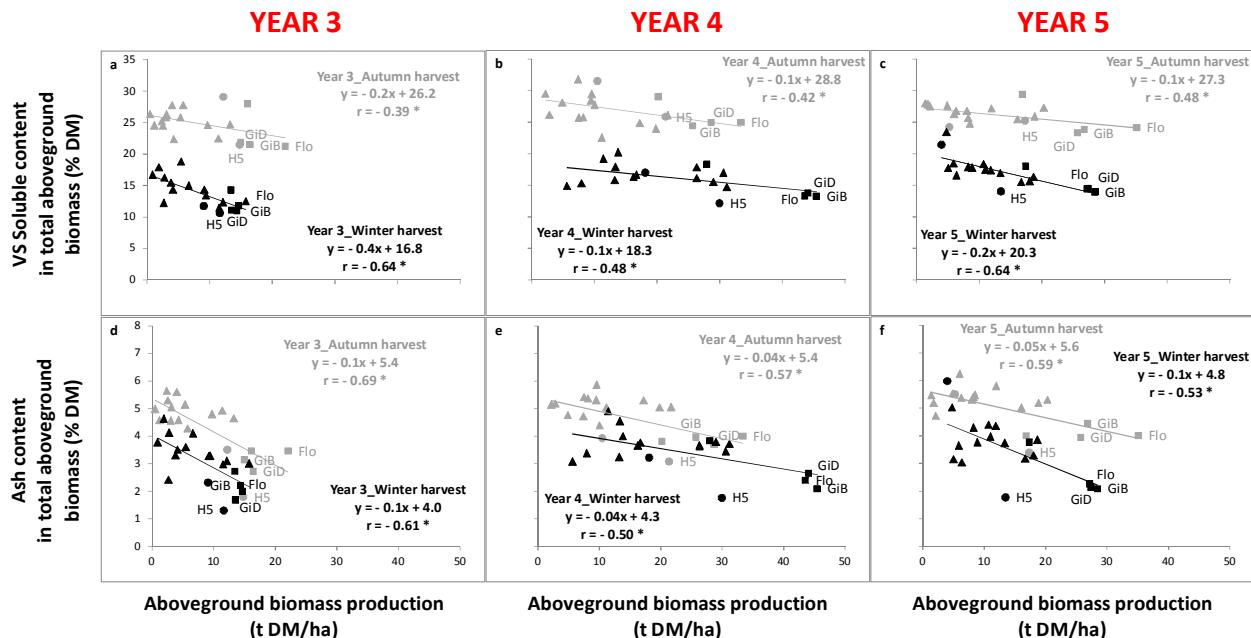
The years of cultivation correspond to the third (first column on the left of the figure), the fourth (middle column), and the fifth (column on the right) years after planting. The harvest dates correspond to the autumn harvest (in grey) and the winter harvest (in black). The filled square symbol corresponds to the *M. x giganteus* clones; the filled circle symbol corresponds to the *M. sacchariflorus* clones; and the filled triangle symbol corresponds to the *M. sinensis* clones. For details on the clones, see Table 4-2.

r, Pearson correlation coefficient; \*, significant at the 0.05 probability level

**Chapitre 4 - Miscanthus clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**



**Figure 4-2: Relationships between the aboveground biomass production and the cellulose (a-c), hemicellulose (d-f), and lignin (g-i) contents in the total aboveground biomass of miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date**



**Figure 4-3: Relationships between the aboveground biomass production and the VS soluble (a-c) and ash (d-f) contents in the total aboveground biomass of miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date**

#### **4.3.4 The variations of the biomass composition were explained by differential contributions of the leaves and stems**

With correlation coefficients ranging from 0.01 to 0.74 in absolute value, the composition of the leaves was more or less correlated with the composition of the stems (Figures 4-4 and 4-5).

The cellulose and lignin contents were generally higher in the stems than in the leaves whatever the year, the harvest date, and the clones (Figure 4-4 a-c, g-i). In contrast, the VS soluble and ash contents were higher in the leaves than in the stems (Figure 4-5 a-f). Surprisingly, the differences in the hemicellulose content between the stems and leaves were not consistent among the clones: the clones Flo, GiB, GiD, and H5 displayed higher hemicellulose contents in their leaves than in their stems in contrast to the other clones (Figure 4-4 d-f).

Moreover, the composition of the leaves and of the stems differed according to the harvest date. The cellulose, hemicellulose, and lignin contents in both the stems and the leaves were generally higher in the winter harvest than in the autumn harvest (Figure 4-4 a-i). In contrast, the VS soluble content in both the stems and the leaves were lower in the winter harvest than in the autumn harvest (Figure 4-5 a-c). Moreover, concerning the ash content, the differences between autumn and winter harvests were less marked (Figure 4-5 d-f). These differences between the harvest dates were consistent with the high harvest date effect that was previously highlighted on these traits in the leaves and the stems (Table 4-5). Lastly, the composition of the leaves and of the stems was generally consistent with the year of cultivation (Figures 4-4 and 4-5).

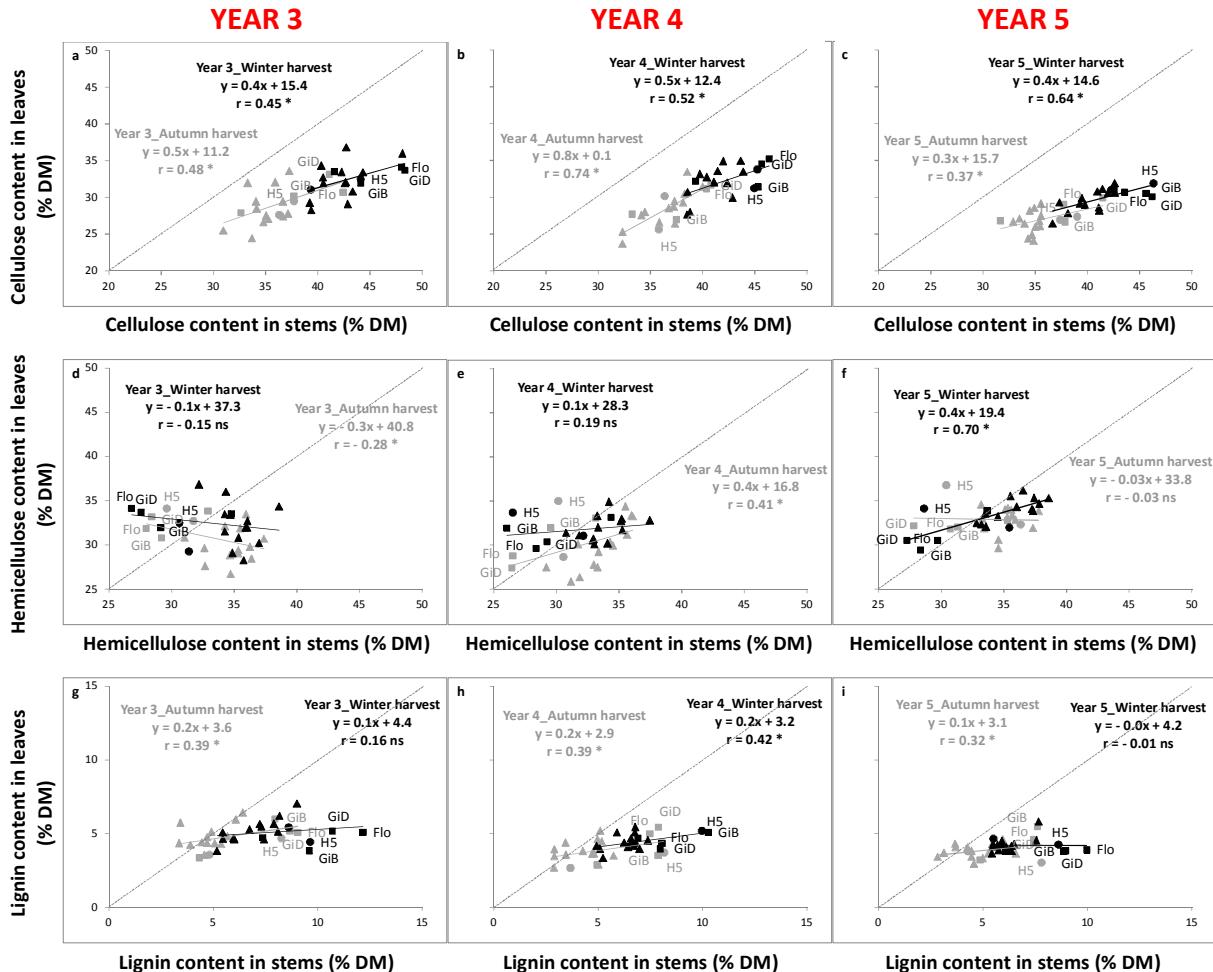
(Following page)

(Legend of the Figures 4-4 and 4-5)

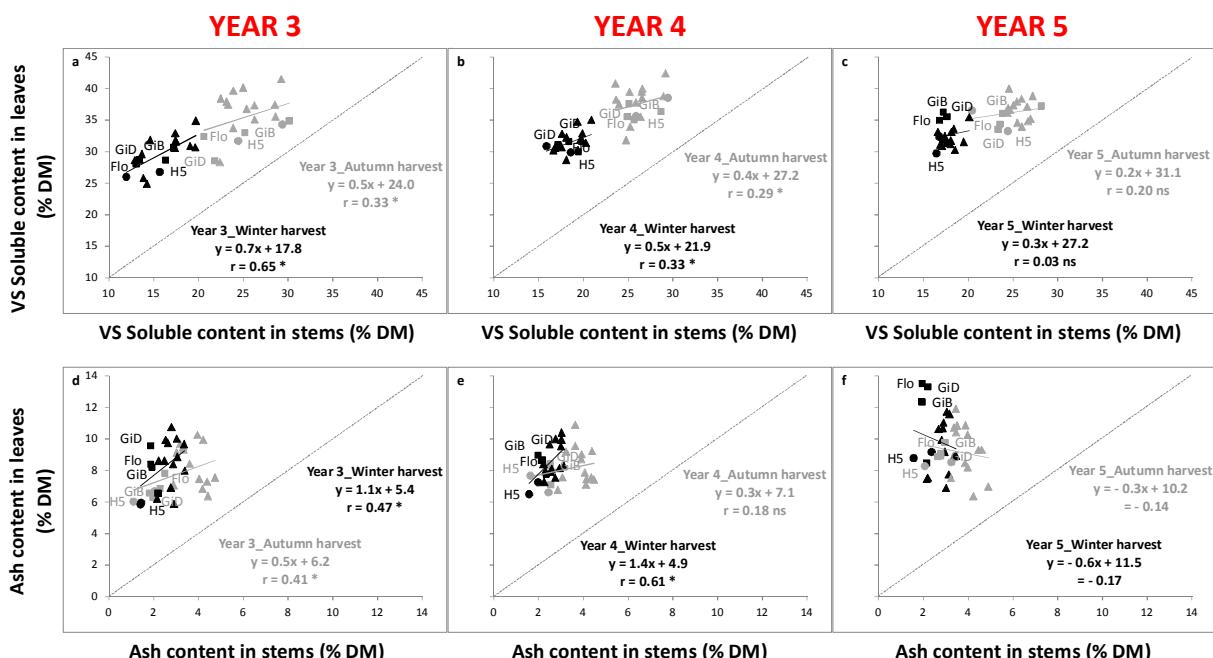
The years of cultivation correspond to the third (first column on the left of the figure), the fourth (middle column), and the fifth (column on the right of the figure) years after planting. The harvest dates correspond to the autumn harvest (in grey) and the winter harvest (in black). The symbols corresponding to the *Miscanthus* species were detailed in Figures 4-2 and 4-3.

r, Pearson correlation coefficient; \*, significant at the 0.05 probability level

**Chapitre 4 - Miscanthus clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**

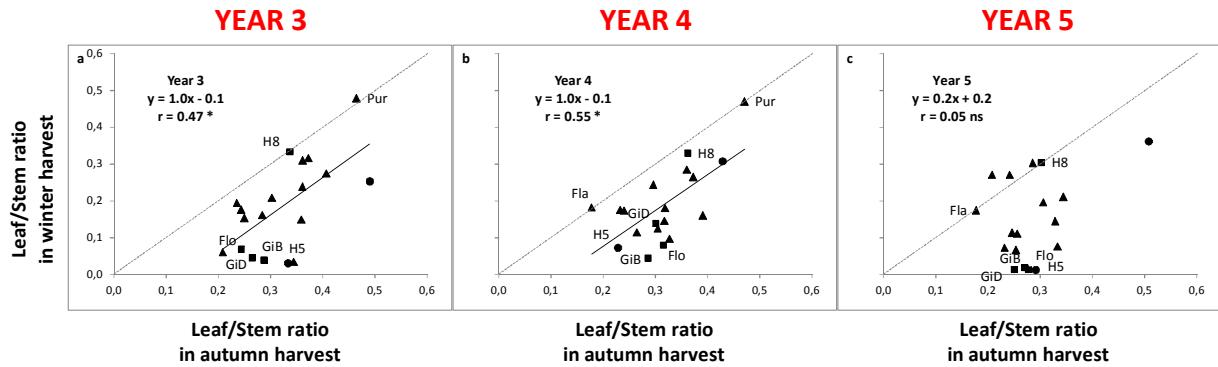


**Figure 4-4: Relationships between the composition of the stems and of the leaves in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date for the cellulose (a-c), hemicellulose (d-f), and lignin (g-i) contents**



**Figure 4-5: Relationships between the composition of the stems and of the leaves in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date for the VS soluble (a-c) and ash (d-f) contents**

In addition, the leaf/stem ratio was generally higher in the autumn harvest than in the winter harvest (Figure 4-6), indicated that the plants lost leaves between the autumn and winter harvest stages. The leaf/stem ratio also differed according to *Miscanthus* clones: the clones Flo, GiB, GiD, and H5 displayed a particularly low leaf/stem ratio (Figure 4-6); interestingly, the clones H8, Pur, and Fla showed a similar leaf/stem ratio in the autumn and in winter harvests, as these clones did not lose leaves between these two stages (Figure 4-6).



**Figure 4-6: Relationships between the leaf/stem ratio in the autumn harvest and the leaf/stem ratio in the winter harvest in miscanthus according to the year of cultivation and the harvest date**

The years of cultivation correspond to the third (a), the fourth (b), and the fifth (c) years after planting. The harvest dates corresponded to the autumn harvest (in grey) and the winter harvest (in black). The symbols corresponding to the *Miscanthus* species were detailed in Figures 4-2 and 4-3.

r, Pearson correlation coefficient; \*, significant at the 0.05 probability level

In summary, the cellulose and lignin contents were higher in the stems than in the leaves whatever the year, the harvest date, and the clones. In contrast, the VS soluble and ash contents were lower. Lastly, the differences in the hemicellulose content between the stems and leaves highly varied among the clones.

#### **4.3.5 The most productive clones displayed high cellulose and lignin contents but low hemicellulose, soluble, and ash contents**

As shown in Figure 4-1 b, the 15 studied clones were clearly divided into 6 distinct groups: group 1 included Flo, GiD, and GiB; group 2 included Gol, H6, and GoD; group 3 included Fla; group 4 included Yak; group 5 included Sil; and group 6 included Gra, Rot, Aug, Mal, Fer, and H8.

Interestingly, the clones Flo, GiD, and GiB (group 1) were the most productive (highest values of Yield) and showed high values for CanopyHeight, StemDiameter, FloweringDate, Cellulose, Lignin, Cellulose\_Stem, and Lignin\_Stem, and low values for Hemicellulose, VS Soluble, Ash, Hemicellulose\_Stem, and Ash\_Stem (Figure 4-1 b). Surprisingly, these three clones also displayed higher hemicellulose content in their leaves than in their stems in contrast to the other clones (Figure 4-4 d-f). These three clones also showed a low leaf/stem ratio (Figure 4-6).

In addition to these three clones, we can see that a *M. sacchariflorus* clone (H5) that was discarded from the PCA due to missing values, was also unique regarding its total aboveground biomass composition: it showed similar cellulose, hemicellulose, lignin, and VS soluble contents in the total aboveground biomass compared to the *M. x giganteus* Flo, GiB, and GiD clones (Figures 4-2 a-i, 4-3 a-c). This clone also especially showed the lowest ash content among the studied clones (Figure 4-3 d-f).

Briefly, the most productive clones displayed high cellulose and lignin contents but low hemicellulose, VS soluble, and ash contents.

### **4.4 Discussion**

This study of the miscanthus relationships between the traits that are related to biomass production and composition addressed our hypotheses. (i) As expected, there were synergistic and antagonistic traits: the aboveground biomass production was positively correlated with the cellulose and lignin contents but was negatively correlated with the hemicellulose, ash, and soluble contents; the most productive *Miscanthus* clones were not the best suited for the biomass composition due to high lignin and low hemicellulose contents. (ii) The relationships between the aboveground biomass production and the total aboveground biomass composition were generally consistent over the tested years of cultivation and independent of the harvest dates. In addition, (iii) the biomass production and composition traits were mainly influenced by main effects and the interactions had little effect on these traits. Lastly, (iv) the leaves and stems contributed differently to the total aboveground biomass composition.

We, therefore, discuss below three main points: (i) the explanation of our results from a physiological viewpoint, (ii) the impact of our results on the production and process of cellulosic ethanol, and (iii) their impact on the genetic improvement.

We, therefore, discuss below three main points that are directly related to our results: (i) the existence of synergistic and antagonistic traits among the traits related to biomass production and composition, (ii) the stability of the relationships between the aboveground biomass production and the total aboveground biomass composition as a function of the year of cultivation and the harvest date, and (iii) the differential contribution of the leaves and the stems to the total aboveground biomass composition.

#### **4.4.1 Our results can be explained from a physiological viewpoint**

Biomass production and composition were influenced by the year, the harvest date, and the clone. The year effect, which combined the age of the crop and the climate conditions, affected biomass production the most. With regard to the effect of the age of the crop, it is possible that the crop did not reach the adult phase after 3 years of cultivation. Indeed, the duration of the juvenile phase is highly variable and can vary from 3.3 to 7.3 years in *M. x giganteus* (Lesur et al., 2013). This contributed to a greater variability of the effect of year. In addition to the age of the crop, the year effect can be explained by variable climate conditions which could be more or less favorable to the growth of miscanthus. The growth duration can be particularly high, as miscanthus is able to maintain capacity for CO<sub>2</sub> assimilation even in leaves developed at, or exposed to, chilling temperatures (Dohleman et al., 2009). This resulted in a higher biomass production.

The harvest date impacted the composition of biomass the most. This can be related to a change in the cell wall, as a significant increase in the cell wall fraction of the total aerial biomass has been observed between autumn and winter harvests (Le Ngoc Huyen et al., 2010). The decrease in soluble cell components between these two harvest dates can be attributed to the loss of leaves from the aboveground biomass (Le Ngoc Huyen et al., 2010) as well as the reduction in ash (Lewandowski et al., 2003a). The changes arose principally from the loss of leaves, but there were some changes in the harvestable plant components over time (Hayes, 2013).

The clone influenced the biomass production-related traits and the biomass composition-related traits. In particular, lateness at flowering was the most significant trait. This variable growth duration between the clones can explain the variable biomass production. In a comparison of maize and miscanthus, Dohleman and Long (2009) attributed the higher productivity of miscanthus to its longer growing season and a larger leaf area.

The relationships between biomass production and composition have not been well documented in miscanthus or in sugarcane and sorghum, which are closely related to miscanthus from a taxonomic basis. However, some studies have reported data about these relationships in other grass species, such as maize and switchgrass. Indeed, Argillier et al. (1995) showed that the cellulose and lignin contents in whole maize plants were significantly and positively correlated with biomass yields, with correlation coefficients of 0.81 and 0.78, respectively. These correlations agree with our observations in miscanthus. In contrast, Lemus et al. (2002) observed a negative correlation (- 0.47) between the lignin content and biomass production of switchgrass. In addition, we found that the hemicellulose content was significantly and negatively correlated with biomass production, whereas Argillier et al. (1995) and Lemus et al. (2002) found a positive but not a significant correlation with biomass production on maize and switchgrass, respectively. Regarding the ash content, Lemus et al. (2002) found a significant negative correlation with biomass production in switchgrass, in agreement with our results in miscanthus. The observed differences could be due (i) to differences in the composition of the cell wall between these three crops (Argillier et al., 1995; Kaack et al., 2003; Bhandari et al., 2014) and/or (ii) to various leaf/stem ratios between these crops (Kaack et al., 2003; Baxter et al., 2012). In addition, these differences between the three crops could be due to differential composition between the leaves and stems. Indeed, our results in *Miscanthus* clones showed that the composition of the stems was more correlated with the composition of the total aboveground biomass than the composition of the leaves.

#### **4.4.2 Impact of our results on the production and process of cellulosic ethanol**

As reviewed by van der Weijde et al. (2013), comparative studies of ethanol biorefineries showed that the holocellulose (cellulose + hemicellulose) content of feedstocks was directly proportional to ethanol yields under optimal processing conditions. These authors predicted that crops such as miscanthus, sugarcane, and sorghum are expected to dominate the future cellulosic ethanol market due to their high biomass yields and very high holocellulose content on a dry matter basis (~ 75%). We indeed showed that aboveground biomass production was positively correlated with the potential yields of cellulose and hemicellulose. Therefore, we can expect high ethanol yields from the best clones.

We found a positive relationship between biomass production and the lignin content. The lignin content impacts the efficiency of the cellulosic ethanol conversion process; as reviewed by Slavov et al. (2013), lignin induces recalcitrance to enzymatic deconstruction (saccharification) and fermentation to bioethanol. Therefore, it can be expected a lower efficiency of the bioethanol

conversion process for the most productive *Miscanthus* clones that were the most lignified. Nevertheless, a high production of cellulosic ethanol can be expected from the best *Miscanthus* clones, as found for a productive *M. x giganteus* clone (Cadoux et al., 2014), due to the offset by the positive relationships between biomass production and the potential yields of cellulose and hemicellulose.

Lastly, we found a negative relationship between biomass production and the ash and soluble contents, which should be favorable for cellulosic ethanol production (Martel, personal communication).

#### **4.4.3 Impact on genetic improvement**

Among the studied clones, our results showed that none of them combined all the traits at favorable levels for bioethanol production. Indeed, there were contrasted relationships between the biomass production-related traits and biomass composition-related traits. A positive relationship between biomass production and cellulose content was found, which was favorable for breeding. In contrast, there was a positive relationship between biomass production and lignin content, which was the less favorable one among the relationships that we highlighted. Improving the lignin content by reducing it could lead to a decrease in the biomass production. Therefore, breeding strategies have to take this feature into account in the future.

Two breeding options can be attempted: (i) a reduction in the lignin content of the entire plant while maintaining biomass production and (ii) an increase in the leaf/stem ratio of the harvestable plant.

Brown midrib mutants of maize and sorghum are known to contribute to a reduction in the lignin content and to an improvement of the enzymatic digestibility (review of van der Weijde et al., 2013). This reduction in lignin content can also be achieved by a down-regulation of the monolignol biosynthesis genes, as found in maize and sugarcane (review of van der Weijde et al., 2013). The search of such genes in miscanthus, which is closely related to maize, sorghum, and sugarcane, could be an option for reducing the lignin content.

As the lignin content is more favorable in the leaves than in the stems from a cellulosic conversion process viewpoint, a breeding strategy should consist of maximizing the leaf/stem ratio, which will contribute to an indirect decrease in the lignin content of the harvested whole plant. This improvement in both the stems and leaves separately could be achievable, as the leaf and stem compositions could be under different genetic control (Murray et al., 2008). For instance, the four most productive clones of our study displayed a low leaf/stem ratio and lost their leaves between the autumn and winter harvest stages. As we found that some clones could keep their leaves during the

winter, an interesting option to improving the amount of lignin is to introduce the ability to retain leaves between the autumn and winter harvest stages, which would result in a higher leaf/stem ratio of the harvestable plant and a lower lignin content in the harvested dry matter of the whole plant. Of course, the lignin content has to be at a level that will prevent the plant from lodging, and a minimum leaf loss has to be maintained on the ground to ensure the recycling of nitrogen due to leaf decomposition.

In addition to a reduction in the lignin content, modification of the constituents of lignin, such as alterations in the ratio between two of the main subunits of lignin (S and G), could be further investigated. Indeed, a lower S/G ratio can reduce biomass recalcitrance in C4 grasses, as reviewed by van der Weijde et al. (2013).

All these breeding options are achievable owing to a high genotypic diversity in miscanthus with regard to the biomass production-related traits and biomass composition-related traits. Arnoult and Brancourt-Hulmel (2014) reviewed the high genotypic diversity among and within the three most studied *Miscanthus* species (*M. x giganteus*, *M. sacchariflorus*, and *M. sinensis*). In a comparison of 26 wild populations of *M. sinensis* from southwest China, Xu et al. (2013) even found a higher genetic diversity within each population than among populations. These findings indicate a good potential of miscanthus for plant breeding to maximize cellulosic ethanol production and optimize the conversion process.

## 4.5 Conclusions

This study thoroughly explored the relationships between the biomass production and the biomass composition and gave interesting guidelines regarding the traits that are related to biomass production and composition in miscanthus, which were useful in targeting the breeding of miscanthus for the production of cellulosic ethanol. The consistency of the relationships between the miscanthus aboveground biomass production- and composition-related traits throughout the years and harvest dates was particularly interesting and allowed for the early selection of all of these traits in the first years of cultivation. Concerning the relationships that we highlighted, the positive relationship between biomass production and cellulose content was the most favorable one. In contrast, the positive relationship between biomass production and the lignin content was the less favorable one. Therefore, breeding strategies should target a lower lignin content while maintaining high biomass production. This could be achieved by two breeding options: (i) a reduction in the lignin content of the whole plant while maintaining biomass production and (ii) an increase in the leaf/stem ratio of the harvestable plant. Breeding suitable *Miscanthus* clones that did not lose their leaves could even contribute to the increase of the amount of holocellulose that is required for cellulosic ethanol production. Of course, a minimum leaf loss has to be maintained on the ground to ensure the recycling of the nitrogen due to the decomposition of leaves.

The biomass composition has a large impact on the efficiency of the conversion processes in many species. With such a high diversity observed here, this impact also must be demonstrated in miscanthus in the future by testing contrasted clones under industrial conversion processes for biofuel production.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the FUTUROL project funded by Oseo, which supported this study. Thanks to the laboratory LANO, which performed the Van Soest analyses, and to the INRA unit of Lusignan, which provided the grinding equipment. Particular thanks to Benoit Decaux, and the staff of the UE GCIE for their valuable help in the notations, harvests, and maintenance of the trial. Thanks to Vincent Segura for helpful advice on the statistical analyses. Thanks to Brigitte Chabbert, Yves Barrière, and Matthieu Reymond for their valuable recommendations for the preparation of this text.

## References

- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of *Miscanthus*. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Argillier, O., Hebert, Y., and Barriere, Y. 1995.** RELATIONSHIPS BETWEEN BIOMASS YIELD, GRAIN PRODUCTION, LODGING SUSCEPTIBILITY AND FEEDING VALUE IN SILAGE MAIZE. *Maydica* 40:125-136.
- Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding. *Bioenergy Research*. DOI: 10.1007/s12155-014-9524-7.
- Baxter, X.C., Darvell, L.I., Jones, J.M., Barraclough, T., Yates, N.E., and Shield, I. 2012.** Study of *Miscanthus x giganteus* ash composition – Variation with agronomy and assessment method. *Fuel* 95:50-62.
- Bhandari, H.S., Walker, D.W., Bouton, J.H., and Saha, M.C. 2014.** Effects of ecotypes and morphotypes in feedstock composition of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *GCB Bioenergy* 6:26-34.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.-M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., and Mary, B. 2014.** Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6:425-438.
- Chang, V.S., and Holtapple, M.T. 2000.** Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-6:5-37.
- Clifton-Brown, J.C., Chiang, Y.C., and Hodkinson, T.R. 2008.** *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production., in: Vermeris, W. (Ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, USA, pp. 273-294.
- Clifton-Brown, J.C., and Lewandowski, I. 2002.** Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* 16:97-110.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Clifton-Brown, J.C., Stampfl, P.F., and Jones, M.B. 2004.** *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology* 10:509-518.
- DGEC. 2010.** L'industrie des énergies décarbonées en 2010, 1 : Biocarburants, Définitions et technologies.13 p.
- Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Leakey, A.D.B., and Long, S.P. 2009.** Does greater leaf-level photosynthesis explain the larger solar energy conversion efficiency of *Miscanthus* relative to switchgrass? *Plant Cell and Environment* 32:1525-1537.
- Dohleman, F.G., and Long, S.P. 2009.** More Productive Than Maize in the Midwest: How Does *Miscanthus* Do It? *Plant Physiology* 150:2104-2115.
- Gabrielle, B., Bamière, L., Caldes, N., De Cara, S., Decocq, G., Ferchaud, F., Loyce, C., Pelzer, E., Perez, Y., Wohlfahrt, J., and Richard, G. 2014b.** Paving the way for sustainable bioenergy in Europe: Technological options and research avenues for large-scale biomass feedstock supply. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:11-25.
- Gauder, M., Graeff-Hönninger, S., Lewandowski, I., and Claupein, W. 2012.** Long-term yield and performance of 15 different *Miscanthus* genotypes in southwest Germany. *Annals of Applied Biology* 160:126-136.

- Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Goffart, J.P., Gerin, P.A., Stilmant, D., and Delcarte, J. 2010.** Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash contents in various lignocellulosic crops for second generation bioethanol production. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 14:549-560.
- Godin, B., Lamaudière, S., Agneessens, R., Schmit, T., Goffart, J.-P., Stilmant, D., Gerin, P.A., and Delcarte, J. 2013a.** Chemical characteristics and biofuel potential of several vegetal biomasses grown under a wide range of environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 48:1-12.
- Godin, B., Lamaudière, S., Agneessens, R., Schmit, T., Goffart, J.-P., Stilmant, D., Gerin, P.A., and Delcarte, J. 2013b.** Chemical characteristics and biofuels potentials of various plant biomasses: influence of the harvesting date. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:3216-3224.
- Hastings, A., Clifton-Brown, J., Wattenbach, M., Stampfli, P., Mitchell, C.P., and Smith, P. 2008.** Potential of Miscanthus grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 28:465-472.
- Hayes, D.J.M. 2013.** Mass and compositional changes, relevant to biorefining, in Miscanthus x giganteus plants over the harvest window. *Bioresource Technology* 142:591-602.
- Hodgson, E.M., Lister, S.J., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J., and Donnison, I.S. 2010b.** Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of Miscanthus in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass & Bioenergy* 34:652-660.
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Lledo, M.D., Salamin, N., and Renvoize, S.A. 2002.** Phylogenetics of Miscanthus, Saccharum and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *Journal of Plant Research* 115:381-392.
- Jakob, K., Zhou, F.S., and Paterson, A. 2009.** Genetic improvement of C4 grasses as cellulosic biofuel feedstocks. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45:291-305.
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of Miscanthus in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Kaack, K., Schwarz, K.U., and Brander, P.E. 2003.** Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of Miscanthus genotypes differing in mechanical properties. *Industrial Crops and Products* 17:131-142.
- Kalembasa, D., Jezowski, S., Pude, R., and Malinowska, E. 2005.** The content of carbon, hydrogen and nitrogen in different development stage of some clones of Miscanthus. *Polish Journal of Soil Science* 38:169-177.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., and Ahring, B.K. 2004.** Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:10-26.
- Larsen, S., Jørgensen, U., Kjeldsen, J., and Lærke, P. 2014.** Long-Term Miscanthus Yields Influenced by Location, Genotype, Row Distance, Fertilization and Harvest Season. *Bioenergy Research* 7:620-635.
- Le Ngoc Huyen, T., Rémond, C., Dheilly, R.M., and Chabbert, B. 2010.** Effect of harvesting date on the composition and saccharification of Miscanthus x giganteus. *Bioresource Technology* 101:8224-8231.
- Lemus, R., Brummer, E.C., Moore, K.J., Molstad, N.E., Burras, C.L., and Barker, M.F. 2002.** Biomass yield and quality of 20 switchgrass populations in southern Iowa, USA. *Biomass and Bioenergy* 23:433-442.
- Lesur, C., Jeuffroy, M.H., Makowski, D., Riche, A.B., Shield, I., Yates, N., Fritz, M., Formowitz, B., Grunert, M., Jorgensen, U., Laerke, P.E., and Loyce, C. 2013.** Modeling long-term yield trends of Miscanthus x giganteus using experimental data from across Europe. *Field Crops Research* 149:252-260.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.

- Lewandowski, I., and Kicherer, A. 1997.** Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. European Journal of Agronomy 6:163-177.
- Lewandowski, I., and Schmidt, U. 2006.** Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. Agriculture Ecosystems & Environment 112:335-346.
- Littell, R.C., Henry, P.R., and Ammerman, C.B. 1998.** Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. Journal of Animal Science 76:1216-1231.
- Littell, R.C., Pendegast, J., and Natarajan, R. 2000.** Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. Statistics in Medicine 19:1793-1819.
- McCann, M.C., and Carpita, N.C. 2008.** Designing the deconstruction of plant cell walls. Current Opinion in Plant Biology 11:314-320.
- Murray, S.C., Rooney, W.L., Mitchell, S.E., Sharma, A., Klein, P.E., Mullet, J.E., and Kresovich, S. 2008.** Genetic Improvement of Sorghum as a Biofuel Feedstock: II. QTL for Stem and Leaf Structural Carbohydrates. Crop Science 48:2180-2193.
- Qin, J., Yang, Y., Jiang, J., Yi, Z., Xiao, L., Ai, X., and Chen, Z. 2012.** Comparison of lignocellulose composition in four major species of *Miscanthus*. African Journal of Biotechnology 11:12529-12537.
- Robson, P., Jensen, E., Hawkins, S., White, S.R., Kenobi, K., Clifton-Brown, J., Donnison, I., and Farrar, K. 2013.** Accelerating the domestication of a bioenergy crop: identifying and modelling morphological targets for sustainable yield increase in *Miscanthus*. Journal of Experimental Botany 64:4143-4155.
- SAS Institute Inc. 2000.** SAS user's guide: statistics. Cary, NC, USA.
- Segura, V., Cilas, C., and Costes, E. 2008.** Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: mixed linear modelling of repeated spatial and temporal measures. New Phytologist 178:302-314.
- Slavov, G., Allison, G., and Bosch, M. 2013.** Advances in the genetic dissection of plant cell walls: tools and resources available in *Miscanthus*. Front. Plant Sci. 4:217.
- Sticklen, M. 2006.** Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. Current Opinion in Biotechnology 17:315-319.
- Tran, A.V., and Chambers, R.P. 1985.** RED OAK WOOD DERIVED INHIBITORS IN THE ETHANOL FERMENTATION OF XYLOSE BY PICHIA-STIPITIS CBS-5776. Biotechnology Letters 7:841-845.
- van der Weijde, T., Kamei, C.L.A., Torres, A.F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R.G.F., and Trindade, L.M. 2013.** The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. Frontiers in Plant Science 4.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. Journal - Association of Official Analytical Chemists 50:50-55.
- Wolfinger, R., and Chang, M. 1998.** Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measures. <http://www.ats.ucla.edu/stat/sas/library/mixedglm.pdf> (Access date: 12/04/2014).
- Xu, W.Z., Zhang, X.Q., Huang, L.K., Nie, G., and Wang, J.P. 2013.** Higher genetic diversity and gene flow in wild populations of *Miscanthus sinensis* in southwest China. Biochemical Systematics and Ecology 48:174-181.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different *Miscanthus* species at two harvest dates. Biomass & Bioenergy 35:637-651.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012c.** Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones. Bioenergy Research 5:841-854.

**Table A 4-1: Mean values of each of the 21 *Miscanthus* clones tested at two harvest dates over three years for the aboveground biomass production, its components, and developmental stages**

		Aboveground biomass production (t DM/ha)		Biomass production components				Developmental stages			
		Autumn	Winter	Canopy height (cm)	Stem number per plant	Stem diameter (mm)	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn
Clone	Year	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter
Aug	3	3.1	6.7	96	118	43	52	4.0	4.5	96	94
	4	10.1	16.7	109	111	96	108	4.1	4.2	91	92
	5	6.3	8.3	79	104	73	94	3.6	4.1	87	87
Fer	3	3.0	3.8	69	84	47	67	2.9	3.6	100	96
	4	4.9	13.2	87	92	104	128	4.0	4.2	99	94
	5	2.1	6.4	59	84	77	119	3.7	3.8	91	90
Fla	3	0.5	0.9	73	83	17	27	3.0	3.4	107	105
	4	2.2	5.6	91	98	85	100	3.5	4.0	106	101
	5	1.4	5.9	67	83	112	147	3.1	3.6	96	89
Flo	3	22.1	14.6	228	224	33	34	9.8	8.9	103	101
	4	33.4	43.5	272	264	49	45	9.0	9.2	98	95
	5	35.1	27.2	267	285	46	35	10.4	10.7	90	93
GiB	3	14.9	14.3	211	225	23	28	9.1	9.1	103	100
	4	25.7	45.4	257	267	46	41	9.7	9.1	106	99
	5	26.8	28.4	267	291	50	49	9.3	11.3	91	93
GID	3	16.4	13.5	222	228	25	33	7.9	9.1	102	99
	4	28.6	44.1	266	278	56	33	9.2	9.5	102	99
	5	25.7	27.4	273	274	43	56	9.6	9.6	92	93
GoD	3	9.7	11.5	169	192	30	33	5.8	6.4	95	95
	4	17.2	26.3	183	203	66	86	4.9	7.3	93	99
	5	16.1	16.7	159	183	59	58	6.1	6.1	88	89
Gol	3	13.3	12.2	179	197	32	39	5.9	5.0	95	96
	4	19.8	29.0	171	196	64	68	4.7	7.0	96	101
	5	20.3	18.0	163	184	51	55	5.7	7.2	88	89
Gra	3	1.2	2.7	97	106	24	32	3.2	3.9	96	93
	4	2.8	8.0	96	99	67	83	4.1	4.5	92	91
	5	1.8	5.0	69	87	64	84	3.1	3.9	87	83
H5	3	14.8	11.6	282	NA	NA	NA	10.5	11.0	103	102
	4	21.3	29.9	307	326	NA	NA	9.0	9.5	114	113
	5	17.3	13.5	298	313	NA	NA	8.8	11.0	96	98

(Table A 4-1 continued overleaf)

**Chapitre 4 - *Miscanthus* clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**

**Table A 4-1 (continued)**

	Clone	Year	Aboveground biomass production (t DM/ha)		Biomass production components				Developmental stages				
			Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	
H6	3	11.4	15.8	174	199	32	44	5.8	5.9	95	95	949	865
	4	21.7	31.2	186	196	71	76	5.6	6.4	95	101	856	873
	5	18.8	18.7	164	182	63	76	5.8	7.3	88	89	831	831
H8	3	16.1	13.4	169	173	51	73	4.8	5.5	98	98	839	828
	4	20.2	28.0	176	179	102	138	4.8	5.6	92	99	831	842
	5	16.8	17.4	144	164	149	122	4.6	6.0	90	88	809	811
Her	3	NA	7.3	85	101	122	133	3.7	3.5	94	89	968	861
	4	12.9	21.7	108	130	236	235	5.4	3.8	91	91	867	859
	5	11.1	12.6	83	117	178	177	3.2	3.6	83	80	839	777
Mal	3	5.4	9.4	118	129	28	38	5.2	5.8	95	92	802	702
	4	9.5	26.3	127	137	50	61	5.3	5.9	91	93	787	783
	5	8.0	11.0	92	125	57	53	4.9	6.6	87	87	700	689
Pun	3	NA	8.6	106	118	52	57	5.1	5.0	93	88	1053	1046
	4	16.0	31.5	141	148	147	135	4.8	5.0	91	91	1001	1009
	5	13.2	15.8	119	137	97	110	4.7	5.6	83	80	1004	1005
Pur	3	5.8	5.4	100	97	77	98	3.4	3.1	97	95	NA	NA
	4	7.4	13.8	104	98	161	131	3.7	3.1	91	91	NA	NA
	5	4.9	4.8	72	75	178	170	3.1	3.3	84	85	NA	NA
Rot	3	2.6	4.2	89	104	30	35	3.8	4.4	95	89	955	902
	4	8.2	16.2	96	118	99	101	4.2	4.7	91	91	858	874
	5	8.2	11.9	87	122	106	80	3.9	4.8	82	81	880	878
Sac	3	12.2	9.1	132	NA	NA	NA	NA	3.8	97	98	694	660
	4	10.5	18.1	NA	134	NA	NA	3.6	3.5	91	91	737	738
	5	5.2	4.0	71	103	NA	NA	3.4	3.7	86	80	683	NA
Sil	3	4.3	9.2	80	105	139	179	2.5	3.0	96	93	953	797
	4	11.2	30.6	101	122	330	310	2.7	2.8	91	91	851	871
	5	8.5	13.4	98	128	286	278	2.5	3.4	87	81	881	845
Str	3	4.0	1.9	119	102	24	19	6.1	5.5	95	94	NA	NA
	4	9.6	11.4	150	144	60	57	6.3	4.9	91	91	NA	NA
	5	11.9	8.9	169	166	58	53	6.0	6.1	87	87	NA	NA
Yak	3	2.4	2.8	65	68	133	105	2.4	2.6	96	93	900	870
	4	7.5	13.4	79	90	383	241	3.1	3.0	91	91	850	839
	5	6.0	10.7	66	82	349	278	2.4	3.1	82	80	818	777

NA, data not available

**Table A 4-2: Mean values of each of the 21 *Miscanthus* clones tested at two harvest dates over three years for the total aboveground biomass composition**

Clone	Year	Leaf/Stem ratio		Cellulose (%DM)		Hemicellulose (%DM)		Lignin (%DM)		VS Solubles (%DM)		Ash (%DM)		PotYieldCellulose (t DM/ha)		PotYieldHemicellulose (t DM/ha)		PotYieldLignin (t DM/ha)	
		Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter
Aug	3	0.41	0.27	32.6	40.6	36.8	38.2	4.3	6.2	26.3	15.0	5.1	4.1	1.0	2.7	1.2	2.5	0.1	0.4
	4	0.39	0.16	33.5	40.7	34.6	36.0	4.2	6.7	27.7	16.7	4.4	3.8	3.4	6.8	3.5	6.0	0.4	1.1
	5	0.21	0.27	33.7	37.5	35.9	39.9	3.7	4.7	26.7	17.9	5.4	4.3	2.1	3.1	2.3	3.3	0.2	0.4
Fer	3	0.24	0.18	34.4	40.9	36.1	38.1	3.8	5.5	25.8	15.4	4.6	3.3	1.0	1.6	1.1	1.5	0.1	0.2
	4	0.23	0.17	34.2	41.8	33.9	35.8	3.7	6.6	28.1	15.8	4.8	3.2	1.7	5.6	1.7	4.7	0.2	0.9
	5	0.26	0.11	34.0	40.0	35.9	39.0	2.6	4.5	27.5	16.5	4.7	3.0	0.7	2.6	0.8	2.5	0.1	0.3
Fla	3	0.25	0.15	33.3	39.7	36.5	39.1	3.9	4.6	26.3	16.7	5.0	3.8	0.2	0.4	0.2	0.4	0.0	0.0
	4	0.18	0.18	34.1	42.0	32.8	36.9	3.6	6.2	29.5	14.9	5.1	3.1	0.7	2.4	0.7	2.1	0.1	0.3
	5	0.18	0.17	32.7	38.1	36.9	38.4	2.4	5.0	28.0	18.5	5.5	3.6	0.5	2.2	0.5	2.3	0.0	0.3
Flo	3	0.24	0.07	39.4	47.5	31.8	29.5	7.5	11.2	21.2	11.8	3.5	2.0	8.7	7.0	7.0	4.3	1.7	1.6
	4	0.32	0.08	39.1	46.7	27.9	29.9	8.0	10.1	25.0	13.3	4.0	2.4	13.0	20.3	9.3	13.0	2.7	4.4
	5	0.28	0.01	36.7	46.0	33.5	31.4	5.6	8.2	24.1	14.4	4.0	2.3	12.9	12.5	11.8	8.5	2.0	2.2
GiB	3	0.29	0.04	38.3	46.3	31.8	31.9	8.0	10.8	21.9	11.0	3.1	2.2	5.7	6.6	4.8	4.6	1.2	1.6
	4	0.29	0.04	39.4	47.6	28.1	28.1	8.0	11.1	24.4	13.3	4.0	2.1	10.1	21.6	7.2	12.8	2.1	5.0
	5	0.27	0.02	37.7	47.4	32.6	31.0	5.9	7.7	23.8	13.9	4.4	2.1	10.1	13.5	8.8	8.8	1.6	2.2
GiD	3	0.26	0.05	39.8	48.6	30.8	28.6	8.0	11.7	21.5	11.1	2.7	1.7	6.5	6.6	5.1	3.9	1.3	1.6
	4	0.30	0.14	38.1	46.6	29.3	29.4	7.5	10.2	25.0	13.8	3.7	2.7	10.9	20.6	8.4	12.9	2.2	4.5
	5	0.25	0.01	38.5	45.6	32.2	32.1	5.9	7.8	23.3	14.5	3.9	2.1	9.9	12.5	8.3	8.8	1.5	2.1
GoD	3	0.36	0.15	35.4	45.1	35.3	35.5	4.7	8.0	24.6	11.5	4.8	3.0	3.4	5.2	3.4	4.1	0.5	0.9
	4	0.33	0.10	37.2	43.3	32.6	33.3	5.4	7.3	24.8	16.1	5.3	3.7	6.4	11.4	5.6	8.8	0.9	1.9
	5	0.25	0.07	34.7	42.0	36.2	36.8	3.7	5.6	25.4	15.5	5.0	3.2	5.6	7.0	5.8	6.1	0.6	0.9
Gol	3	0.34	0.03	36.3	43.0	33.7	36.8	5.3	7.8	24.7	12.4	4.6	3.1	4.8	5.2	4.5	4.5	0.7	0.9
	4	0.32	0.15	38.1	41.9	32.3	35.4	5.6	7.1	24.0	15.5	5.0	3.8	7.5	12.1	6.4	10.3	1.1	2.1
	5	0.23	0.07	33.6	42.5	35.3	35.8	3.9	6.1	27.3	15.7	5.3	3.3	6.8	7.7	7.1	6.4	0.8	1.1
Gra	3	0.28	0.16	34.2	42.4	37.1	38.7	4.1	6.7	24.6	12.2	4.6	2.4	0.4	1.1	0.4	1.0	0.1	0.2
	4	0.24	0.17	36.3	40.2	32.5	38.5	5.0	5.9	26.2	15.3	5.2	3.4	1.0	3.2	0.9	3.1	0.1	0.5
	5	0.24	0.27	32.6	38.6	36.8	38.8	2.8	4.8	27.8	17.8	5.2	3.1	0.6	1.9	0.7	2.0	0.1	0.2
H5	3	0.33	0.03	39.7	47.7	30.6	30.0	8.2	11.7	21.5	10.6	1.8	1.3	5.9	5.5	4.5	3.5	1.2	1.4
	4	0.23	0.07	38.0	46.1	27.5	31.7	8.6	10.2	25.9	12.1	3.1	1.8	8.1	13.8	5.9	9.5	1.8	3.0
	5	0.29	0.01	36.0	45.8	33.1	32.9	5.7	7.2	25.2	14.0	3.4	1.8	6.2	6.2	5.7	4.4	1.0	1.0

(Table A 4-2 continued overleaf)

**Chapitre 4 - *Miscanthus* clones for cellulosic bioethanol production: Relationships between biomass production, biomass production components, and biomass chemical composition**

**Table A 4-2 (continued)**

Clone	Year	Leaf/Stem ratio		Cellulose (%DM)		Hemicellulose (%DM)		Lignin (%DM)		VS Solubles (%DM)		Ash (%DM)		Pot Yield Cellulose (t DM/ha)		Pot Yield Hemicellulose (t DM/ha)		Pot Yield Lignin (t DM/ha)	
		Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter
H6	3	0.21	0.06	39.4	43.8	32.5	36.6	5.6	7.1	22.5	12.5	4.9	3.0	4.5	6.9	3.7	5.8	0.6	1.1
	4	0.30	0.12	36.6	43.5	31.6	34.1	5.7	7.6	26.1	14.7	5.1	3.7	8.0	13.6	6.9	10.6	1.2	2.4
	5	0.33	0.08	34.6	42.1	35.8	35.5	3.8	6.1	25.9	16.3	5.2	3.9	6.5	7.9	6.7	6.6	0.7	1.1
H8	3	0.34	0.33	34.4	42.6	32.9	35.9	4.6	7.2	28.0	14.3	3.5	2.7	5.5	5.7	5.3	4.8	0.7	1.0
	4	0.36	0.33	33.4	41.0	32.0	33.2	5.5	7.5	29.0	18.3	3.8	3.8	6.7	11.5	6.5	9.2	1.1	2.1
	5	0.30	0.30	31.8	40.1	35.2	36.9	3.6	5.0	29.4	18.0	4.0	3.8	5.3	6.9	5.9	6.4	0.6	0.9
Her	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Mal	3	0.30	0.21	33.8	42.8	36.3	37.2	4.1	6.6	25.8	13.4	5.1	3.3	1.8	4.0	1.9	3.5	0.2	0.6
	4	0.30	0.24	33.3	40.0	33.6	35.4	4.7	6.8	28.4	17.8	5.3	3.6	3.2	10.5	3.2	9.3	0.4	1.8
	5	0.31	0.20	31.5	38.4	38.6	39.3	3.2	4.8	26.8	17.5	5.3	4.0	2.5	4.2	3.1	4.3	0.3	0.5
Pun	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Pur	3	0.46	0.48	32.5	35.3	34.9	38.7	4.9	7.3	27.8	18.8	4.3	3.6	1.9	1.9	2.0	2.1	0.3	0.4
	4	0.47	0.47	30.6	37.9	32.7	34.6	5.0	7.3	31.8	20.2	4.7	4.0	2.2	5.2	2.4	4.8	0.4	1.0
	5	0.15	0.68	30.8	34.7	38.1	36.5	3.5	5.4	27.6	23.4	5.5	5.0	1.5	1.6	1.9	1.7	0.2	0.3
Rot	3	0.36	0.24	36.3	41.7	34.8	38.2	4.4	5.8	24.5	14.3	5.3	3.5	0.9	1.7	0.9	1.6	0.1	0.2
	4	0.32	0.18	36.6	40.8	33.4	36.1	4.2	6.8	25.8	16.3	5.4	3.7	3.0	6.6	2.7	5.9	0.3	1.1
	5	0.34	0.21	33.8	40.2	37.6	37.8	3.0	4.7	25.6	17.4	5.4	4.4	2.8	4.8	3.1	4.5	0.3	0.6
Sac	3	0.49	0.25	33.8	48.1	33.1	33.1	4.0	7.1	29.1	11.7	3.5	2.3	4.1	4.3	4.0	3.0	0.5	0.6
	4	0.43	0.31	33.9	42.5	30.4	31.8	4.2	8.7	31.5	17.0	3.9	3.2	3.5	7.7	3.2	5.7	0.4	1.6
	5	0.51	0.36	35.7	38.1	36.5	36.0	3.6	4.5	24.2	21.4	5.5	6.0	1.9	1.5	1.9	1.4	0.2	0.2
Sil	3	0.24	0.19	36.6	42.9	36.4	36.4	4.7	6.3	22.3	14.3	4.6	3.3	1.6	4.0	1.6	3.3	0.2	0.6
	4	0.26	0.11	37.4	41.2	35.3	33.9	4.8	7.9	22.5	17.0	5.0	3.4	4.2	12.6	3.9	10.3	0.5	2.4
	5	0.25	0.11	36.2	40.1	34.8	37.3	4.2	5.6	24.8	16.9	5.5	3.7	3.1	5.4	3.0	5.0	0.4	0.7
Str	3	0.36	0.31	33.8	40.1	33.0	35.3	5.5	6.7	27.7	17.9	5.6	4.6	1.4	0.8	1.3	0.7	0.2	0.1
	4	0.37	0.26	33.8	38.6	31.6	34.8	5.2	7.4	29.4	19.2	5.9	4.9	3.2	4.5	3.0	4.0	0.5	0.9
	5	0.33	0.15	33.8	40.0	34.4	35.6	4.6	6.6	27.2	17.8	5.8	3.8	4.0	3.6	4.1	3.2	0.6	0.6
Yak	3	0.37	0.32	34.7	39.7	35.3	38.2	4.8	5.9	25.2	16.3	5.6	4.1	0.8	1.1	0.8	1.1	0.1	0.2
	4	0.36	0.28	35.4	38.8	33.9	36.7	5.0	6.6	25.7	17.9	5.4	4.5	2.7	5.2	2.5	4.9	0.4	0.9
	5	0.29	0.30	32.7	38.3	37.6	37.9	3.5	5.4	26.2	18.3	6.2	4.4	2.0	4.1	2.3	4.1	0.2	0.6

NA, data not available



## **Chapitre 5**

**Qualité technologique des clones de miscanthus :  
aptitude à la transformation en bioéthanol  
de 2<sup>ème</sup> génération**



## 5.1 Introduction

Dans l'objectif de produire du bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, de premiers essais ont été menés au sein du pilote construit dans le cadre du projet FUTUROL afin d'évaluer le comportement de différentes matières premières (biomasses) au cours des étapes du procédé. La biomasse issue de coproduits agricoles et forestiers ou de cultures dédiées a été testée. Ces tests ont notamment porté sur diverses biomasses, comme plusieurs variétés de paille de blé (Apache, Bermudes) de différentes années, sur des houppiers, des taillis à courte et très courte rotation de peuplier, et sur une seule variété de *Miscanthus* appartenant à l'espèce *Miscanthus x giganteus*, l'unique actuellement cultivée en France.

Ces premiers tests ont mis en évidence des différences de comportement entre ces biomasses lors du procédé. Il s'avère que ces différences sont étroitement liées à la composition de la biomasse native et, en particulier, à la structure et à la composition de la paroi végétale qui diffèrent selon les cultures et qui influencent majoritairement l'efficacité du procédé (Sticklen, 2006; McCann and Carpita, 2008; Jakob et al., 2009; Godin et al., 2010).

En comparant plusieurs espèces et clones de miscanthus, nous avons précédemment mis en évidence une forte variabilité pour la composition pariétale de leur biomasse native (Cf Chapitre 4). Ainsi, nous pouvons formuler deux hypothèses : (i) le clone de *M. x giganteus* actuellement cultivé ne serait pas le plus optimal pour la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération et certains clones de miscanthus pourraient présenter une meilleure aptitude à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération que ce dernier, et (ii) la composition de biomasse variable des clones de miscanthus impactera l'efficacité du procédé.

Ce chapitre s'attache donc à évaluer l'aptitude de clones de miscanthus contrastés pour leur composition de biomasse native à être transformés au cours du procédé de transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Pour ce faire, 5 clones, choisis parmi les 21 étudiés dans ce travail ont été testés au sein du pilote FUTUROL. Ils ont subi les premières étapes du procédé, à savoir, le prétraitement de la matière première et l'hydrolyse enzymatique, les autres étapes étant envisagées ultérieurement.

Nous exploitons les résultats de ces essais afin de (i) déterminer s'il existe des différences lors du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération pour les clones testés et afin de (ii) déterminer quels clones semblent les plus adaptés à cette transformation si des différences entre clones sont mises en évidence au cours du procédé. Ces premiers résultats nous permettront également de proposer des pistes pour l'amélioration génétique du miscanthus par l'identification de

critères à prendre en compte en sélection pour la conversion de la biomasse de miscanthus en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, notamment en termes de composition de biomasse.

## 5.2 Matériel et méthodes

### 5.2.1 Matériel végétal

Cinq clones de miscanthus sont utilisés pour ces essais. Ils ont été choisis parmi les 21 clones que compte notre étude comme étant contrastés pour leur composition de biomasse, en particulier pour leurs teneurs en cellulose et lignines, et produisant une quantité relativement importante de biomasse (Table 5-1). Les clones Flo et GiB, appartenant à l'espèce *M. x giganteus*, ont été choisis pour leur forte production de biomasse et leurs fortes teneurs en cellulose et en lignines. Le clone H8, un hybride de type *M. x giganteus*, a été choisi pour ses teneurs en cellulose, hémicelluloses, et lignines intermédiaires et pour sa capacité à conserver ses feuilles pendant l'hiver (Cf Chapitre 4). Le clone Sil, appartenant à l'espèce *M. sinensis*, a été choisi comme clone intermédiaire pour les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines, de la même façon que H8. Enfin, le clone Rot, appartenant à l'espèce *M. sinensis*, a été choisi pour sa faible teneur en lignines.

**Table 5-1 : Description des 5 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, leur rendement et leur composition de biomasse à la récolte (février 2014)**

Code	Flo	GiB	H8 <sup>c</sup>	Rot	Sil
<b>Nom du clone</b>	<i>M. x giganteus</i> Floridulus <sup>b</sup>	<i>M. x giganteus</i> Britannique	Hybride 8	<i>M. sinensis</i> Rotsilber	<i>M. sinensis</i> Silberspinne
<b>Espèce</b>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i>
<b>Niveau de ploïdie<sup>a</sup></b>	3x	3x	2x	2x	2x
<b>Rendement (t MS/ha)</b>	28,4	26,1	21,9	16,3	17,0
<b>Cellulose (% MS) *</b>	47,9	46,2	41,6	40,9	40,8
<b>Hémicelluloses (% MS) *</b>	24,8	27,2	33,0	34,5	33,4
<b>Holocelluloses (% MS) *</b>	72,7	73,4	74,6	75,4	74,2
<b>Lignines (% MS) *</b>	11,2	10,1	7,6	6,0	7,4
<b>Solubles (% MS) *</b>	16,1	16,5	17,7	18,6	18,4
<b>Cendres (% MS) **</b>	2,4	2,3	3,2	4,0	4,3

<sup>a</sup>Déterminé par cytométrie de flux par Zub et al. (2012c)

<sup>b</sup> Il s'agit assurément d'un clone appartenant à l'espèce *M. x giganteus*; nous supposons que le nom variétal est Floridulus mais sans certitude puisqu'il peut exister des confusions taxonomiques notamment pour du matériel végétal provenant de pépiniéristes

<sup>c</sup> Clone déjà étudié par Clifton-Brown et al. (2001b) et Lewandowski et al. (2003a)

\* Les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, et solubles de la biomasse native (biomasse récoltée) ont été caractérisées selon une adaptation du protocole de la méthode Van Soest (Van Soest, 1967) (Cf chapitre 3)

\*\* La teneur en cendres a été caractérisée après calcination à 550°C pendant 12h (Cf Chapitre 3)

Ces cinq clones ont été récoltés en février 2014 (7<sup>ème</sup> année de culture) sur le dispositif expérimental utilisé pour ce travail de thèse. La récolte a été réalisée sur la partie dédiée à la récolte hivernale.

Les détails concernant la récolte et les analyses de la composition de la biomasse sont présentés dans le chapitre 3.

Pour chacun des cinq clones, 70 kg de matière récoltée en plante-entière a été conditionnée en bottillons de 10 kg puis acheminée sur le site du pilote FUTUROL. Les bottillons y ont été stockés dans la zone de stockage prévue à cet effet (hangar ouvert et filets anti-pluie) jusqu'au démarrage des essais à la fin du mois d'avril.

## 5.2.2 Réalisation des essais au pilote FUTUROL

### a. Mise en œuvre des différentes étapes du procédé

Le procédé développé dans le cadre du projet FUTUROL pour produire du bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération à l'échelle industrielle comporte 4 grandes étapes (Figure 5-1) :

- Le prétraitement de la biomasse
- L'hydrolyse enzymatique de la biomasse prétraitée
- La fermentation
- La distillation

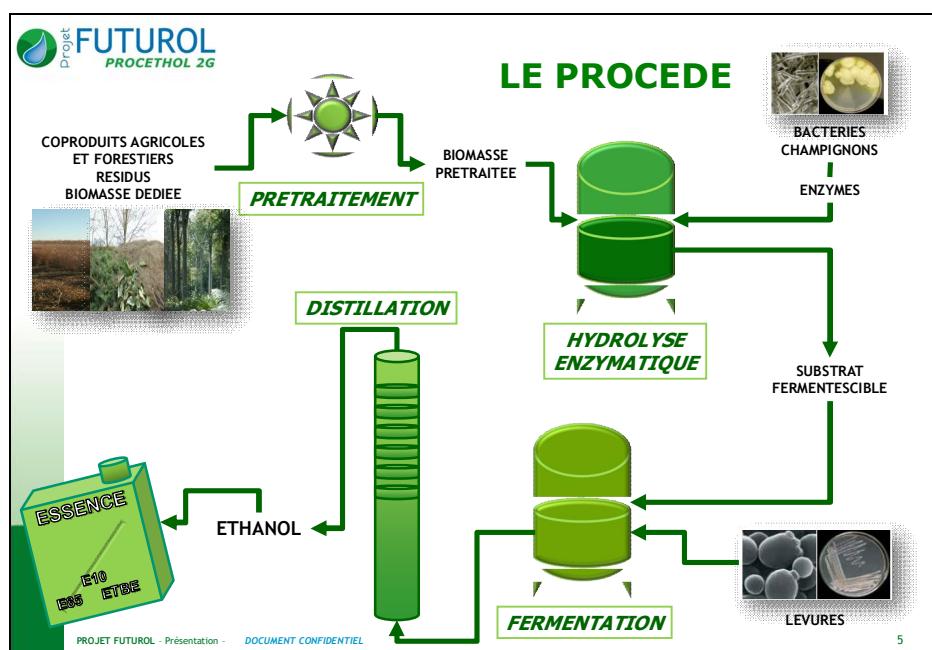


Figure 5-1 : Etapes du procédé de production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération développé au sein du projet FUTUROL (Source : projet FUTUROL, Procéthol 2G)

Pour comparer le comportement des cinq clones de miscanthus au cours du procédé, nous allons nous intéresser ici essentiellement aux deux premières étapes de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique. Les étapes suivantes nécessitent des ajustements en termes de conditions opératoires qui demandent du temps et ne pourront donc pas être testées dans le cadre de ce travail.

#### ▪ **Le prétraitement de la biomasse**

Préalablement au prétraitement, la biomasse a subi un broyage à une granulométrie moyenne de 50 mm (entre 20 et 100 mm).

Le prétraitement de la biomasse comprend 2 phases principales : une phase d'imprégnation acide de la biomasse et une phase d'explosion à la vapeur. La figure 5-2 présente une technologie d'explosion à la vapeur en continu analogue à celle mise en œuvre dans le pilote FUTUROL.

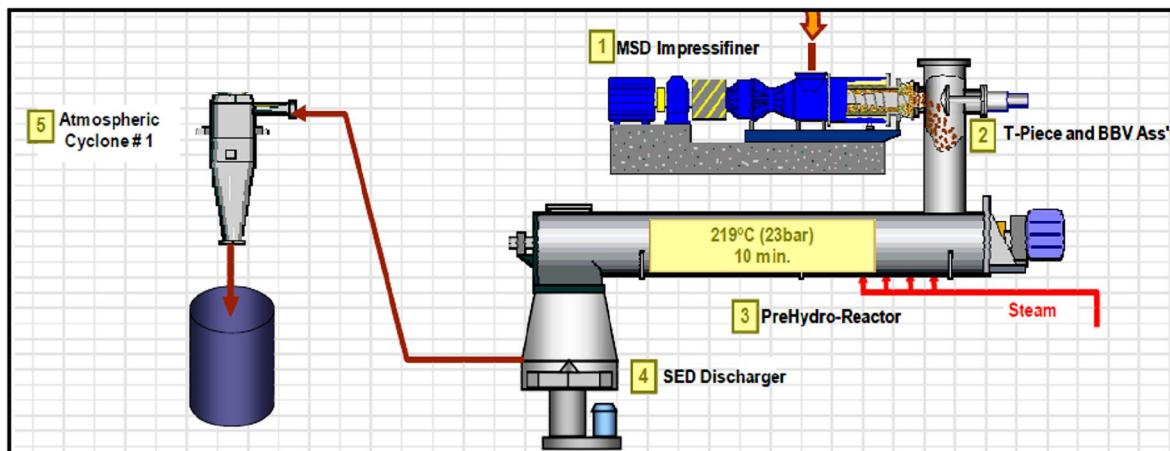


Figure 5-2 : Technologie d'explosion à la vapeur en continu (Source : Andritz)

##### - Préparation de la biomasse imprégnée

La matière broyée subit une imprégnation acide. Cette imprégnation se fait à l'aide de liqueur acide préparée par mélange d'eau et d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) selon les conditions opératoires de référence définies à l'issu de précédents tests :

- Taux de Matière Sèche (MS) du miscanthus broyé = confidentiel, entre 5 et 15%
- $[H_2SO_4]$  = confidentiel, entre 0,1 et 2,0 % pds (g/100 g de liqueur)

Dans le cadre de cet essai pour lequel de petites quantités de biomasse sont utilisées, cette étape d'imprégnation est effectuée dans des containers de 1 m<sup>3</sup> en batch selon un procédé discontinu statique non agité durant au minimum 10 heures. A noter que sur des quantités plus importantes, le procédé d'imprégnation est réalisé en continu sur une durée plus courte.

La biomasse imprégnée est ensuite égouttée par soutirage de la liqueur pour atteindre un taux de matière sèche confidentiel, entre 15 et 30 %.

- Réalisation de l'explosion à la vapeur

Après imprégnation acide, la suite du prétraitement est réalisée par explosion à la vapeur en continu. Des études précédemment effectuées avec divers équipementiers ont en effet mis en évidence une supériorité de l'explosion à la vapeur comme prétraitement en comparaison à la cuisson acide.

Pour cette étape d'explosion à la vapeur, la biomasse imprégnée et pressée est injectée dans une vis de pression qui crée un bouchon de biomasse (Figure 5-2 point 1), puis la biomasse pénètre dans l'étage sous pression (Figure 5-2 point 2). La biomasse pressée est ensuite mise en contact avec de la vapeur injectée dans le système (Figure 5-2 point 3). En sortie du réacteur (Figure 5-2 point 4), la matière subit une décompression en passant dans le compartiment atmosphérique par une restriction, correspondant à la détente explosive, avant d'atteindre le cyclone (Figure 5-2 point 5). C'est dans ce cyclone que la biomasse prétraitée et la vapeur sont séparées.

Les conditions opératoires optimales utilisées pour cette phase ont été définies suite à de nombreux essais sur un lot de miscanthus de référence (*Miscanthus x giganteus* ayant été cultivé dans le département de la Marne). Elles sont les suivantes :

- Température : confidentiel, entre 150 et 210°C
- Temps de séjour = confidentiel, entre 1 et 10 minutes
- Pression : confidentiel, entre 5 et 20 bars

A noter que l'unité d'explosion à la vapeur est équipée avec un orifice de dépressurisation réglable en diamètre après le réacteur. Le réacteur est réglable en taux de remplissage durant le fonctionnement de chaque essai. Les débits sont calculés à partir du temps de séjour souhaité en tenant compte d'un remplissage moyen du réacteur.

Lors de cette étape, les tests ont été réalisés en triple pour chacun des 5 clones.

▪ **L'hydrolyse enzymatique du marc prétraité**

Le marc prétraité subit ensuite un test standard d'hydrolyse enzymatique. Le cocktail enzymatique utilisé est constitué d'une cellulase hydrolysant la cellulose (composition commerciale GC220, de Genencor) complété d'une β-glucosidase (composition commerciale N188, de Novozymes) hydrolysant le cellobiose (diholoside de glucose issu de la dégradation de la cellulose) en deux glucoses. L'hydrolyse enzymatique est réalisée sur une durée de 168 heures selon deux phases : une

première phase de 0 à 72 heures, réalisée avec une faible dose d'enzymes afin de discriminer les clones (10 mg d'enzyme / g de cellulose), et une deuxième phase, où le cocktail enzymatique est ajouté en excès (+50 mg d'enzyme / g de cellulose). Cette étape d'hydrolyse nous permet d'estimer le rendement en glucose cellulosique après hydrolyse enzymatique (à 72h). Sur cette base, nous pourrons également calculer les rendements théoriques en éthanol.

Les tests ont été réalisés en double pour chacun des 5 clones.

### b. Analyses et échantillonnages

La figure 5-3 présente de façon synthétique les principales analyses qui ont été réalisées au cours des étapes du procédé testées.

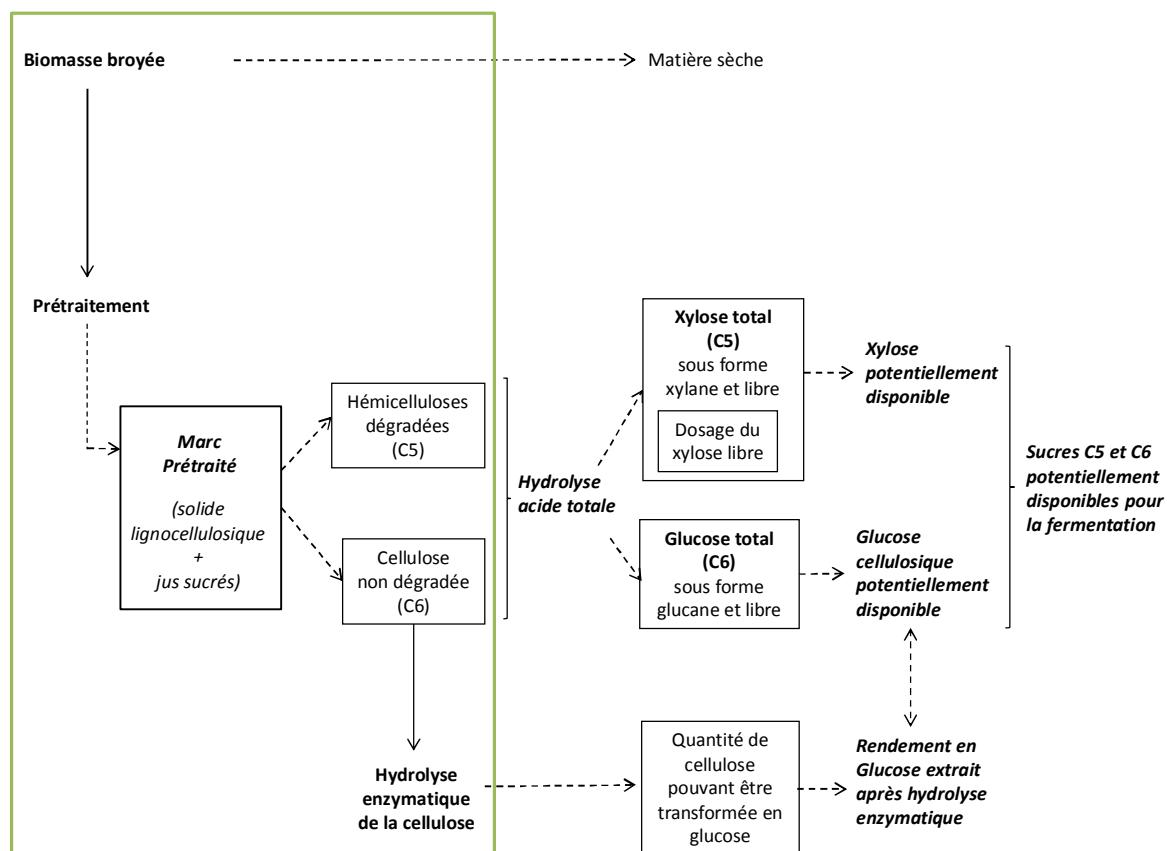


Figure 5-3 : Principales analyses réalisées au cours des étapes du procédé testées : le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique

Le cadre vert correspond aux étapes du procédé ; la partie droite du schéma correspond aux principales analyses réalisées pour accéder aux différentes fractions

▪ **Analyses de suivi**

**Prétraitement (explosion à la vapeur)** (Figure 5-3)

- ✓ Détermination de la matière sèche du marc prétraité
- ✓ Hydrolyse acide totale du marc prétraité (solide lignocellulosique + jus sucrés) et analyse compositionnelle ; cette hydrolyse chimique permet de doser les sucres totaux présents dans le marc tels que :
  - le **glucose total** correspondant au glucose présent sous forme glucane (polymère) ou déjà libre (sucre monomère en C6 provenant de la dégradation de la cellulose).
  - le **xylose total** correspondant au xylose présent sous forme xylane (polymère) ou déjà libre (sucre monomère en C5 provenant de la dégradation des hémicelluloses).
- ✓ En plus du dosage du xylose total, un dosage du **xylose libre** disponible dans la fraction « jus sucrées » du marc prétraité est réalisé ; ce dosage permet notamment d'évaluer la thermolabilité des hémicelluloses au prétraitement et de connaître la part de sucres monomériques, de type xylose, qui sont potentiellement fermentescibles en éthanol. A noter que les xylanes résiduels ne sont pas disponibles pour la production d'éthanol par les levures (sauf si il y a présence d'une activité « xylanase » dans les préparations commerciales d'enzymes).

Ces dosages nous permettront ainsi :

- d'accéder à la **quantité de glucose et xylose potentiellement disponibles** en sortie de prétraitement pour la fermentation en éthanol ;
- d'évaluer la quantité de **glucanes** disponibles pour l'hydrolyse enzymatique (ce qui permettra de calculer la digestibilité enzymatique atteinte après prétraitement) ;
- de donner une information sur le taux de **xylanes résiduels** (xylose total – xylose libre) qui sont un indicateur de l'avancement du prétraitement.

Ces dosages sont réalisés par HPLC ionique.

**Hydrolyse enzymatique** (Figure 5-3)

Pendant la durée de l'hydrolyse enzymatique, des prélèvements réguliers sont effectués afin de déterminer :

- ✓ la concentration en glucose obtenue par dosage du glucose,
- ✓ le rendement d'hydrolyse de la cellulose en glucose.

Nous pouvons notamment déterminer le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique (%). Il nous permettra en particulier de connaître la quantité de cellulose convertible en glucose puis fermentescible en éthanol.

- **Analyses de bilan**

Pour chaque essai, des bilans massiques seront réalisés sur l'eau, la biomasse entrante, le jus et le solide prétraité sortant.

c. **Calculs**

- **Evaluation de la fraction de xylose potentiellement disponible pour la production de bioéthanol après l'étape de prétraitement**

Au contraire de la cellulose, les hémicelluloses contenues dans la biomasse, qui sont thermolabiles et plus fragiles que la cellulose, sont majoritairement dégradées lors de l'étape de prétraitement. Elles sont hydrolysées en différentes molécules, telles que le xylose, l'arabinose, le mannose, et d'autres sucres, la principale étant le xylose. Parmi ces molécules, c'est le xylose qui a la capacité d'être converti en éthanol par les levures du procédé Futurol et c'est donc le xylose qui est dosé en fin de prétraitement. On évalue ainsi la quantité totale de xylose libérée après le prétraitement qui sera disponible pour la production d'éthanol. L'on calcule ainsi le **rendement en xylose libre après prétraitement**.

- **Evaluation de la quantité de glucose pouvant être obtenu à partir de la cellulose lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique**

Il est indispensable d'évaluer la quantité glucose libéré par hydrolyse enzymatique dans des conditions opératoires standardisées. Cela nous permet notamment d'évaluer la digestibilité de la cellulose de la biomasse prétraitée qui est un indicateur de l'efficacité du prétraitement. Pour ce faire, nous calculons le rendement correspondant au pourcentage de glucose extrait par hydrolyse enzymatique après 72 heures de traitement. Ce rendement est appelé **rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique**.

- **Rendement en éthanol de la fraction glucose du marc prétraité (issu de la cellulose)**

**Rendement en éthanol fraction glucose cellulosique (%)** = Rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique x Rendement de conversion du glucose en éthanol

Avec :

Rendement de conversion du glucose en éthanol (rendement de Pasteur) : 48 % (1 kg de glucose donne par fermentation levuriennes 480 g d'éthanol)

- **Rendement en éthanol de la fraction xylose des jus sucrés (issu des hémicelluloses)**

**Rendement en éthanol fraction xylose hémicellulosique (%)** = Rendement en xylose libre après prétraitement x Rendement de conversion du xylose en éthanol

Avec :

Rendement de conversion du xylose en éthanol (rendement de Pasteur) : 48 % (1 kg de xylose donne par fermentation levuriennes 480 g d'éthanol)

- **Potentiel en éthanol de la biomasse**

**Potentiel en éthanol de la biomasse (%)** = Rendement en éthanol fraction glucose cellulosique + Rendement en éthanol fraction xylose hémicellulosique

- **Rendement en éthanol de la biomasse**

**Rendement en éthanol de la biomasse (kg éthanol/t MS)** = Potentiel en éthanol de la biomasse x MS

- **Rendement en éthanol à l'hectare (kg éthanol/ha)**

**Rendement en éthanol à l'hectare (kg éthanol/ha)** = Rendement en éthanol de la biomasse x Rendement (kg MS/ha)

- **Rendement en éthanol à l'hectare (litres éthanol/ha)**

**Rendement en éthanol à l'hectare (litres éthanol/ha)** = Rendement en éthanol à l'hectare (kg éthanol / ha d'un clone) / densité de l'éthanol

Avec :

Densité de l'éthanol : 0,789

### 5.2.3 Analyses statistiques

Des corrélations ont été réalisées à partir du logiciel SAS (SAS Institute Inc., 2000). Ces corrélations ont été réalisées entre différents paramètres obtenus à l'issue du test des 5 clones au pilote et les teneurs en cellulose, hémicelluloses, et lignines de la biomasse brute de ces clones. Des régressions ont également été réalisées.

## 5.3 Résultats et discussion

### 5.3.1 Prétraitement

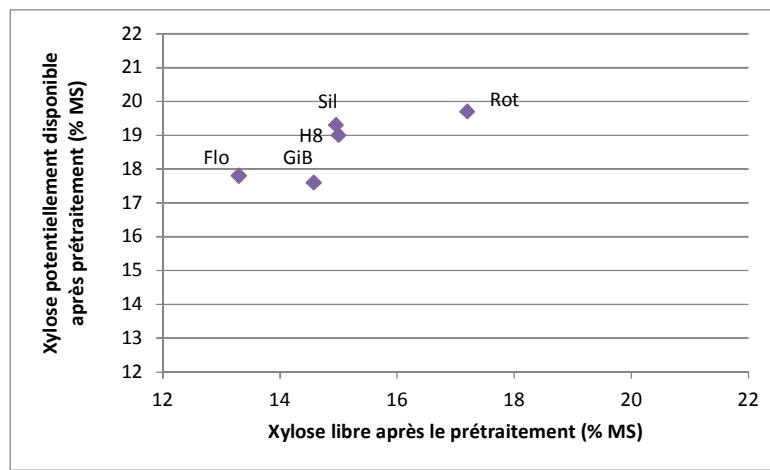
#### a. Xylose potentiellement disponible et libre après le prétraitement

La teneur en xylose libre après le prétraitement (issu de la dégradation des hémicelluloses), qui sera disponible pour la production d'éthanol, est la plus faible pour le clone Flo de l'espèce *M. x giganteus* et la plus élevée pour le clone Rot de l'espèce *M. sinensis* (Table 5-2). Les trois autres clones (GiB, H8 et Sil) présentent des valeurs intermédiaires. Ces différences entre les clones pourraient s'expliquer par leur teneur en hémicelluloses, le clone Flo ayant la plus faible teneur et le clone Rot la plus forte. Cependant, la teneur en xylose libre après prétraitement n'est pas corrélée à la teneur en xylanes totaux (donnée ici en xylose potentiellement disponible) (Figure 5-4) ni à la teneur en hémicelluloses de la biomasse native (biomasse récoltée). Nous pouvons néanmoins supposer que le clone Flo présente une plus faible hydrolyse acide des hémicelluloses lors du prétraitement (teneur en xylose libre après prétraitement la plus faible). Cela tend à montrer une résistance de ce clone au prétraitement.

**Table 5-2: Xylose potentiellement disponible et libre après l'étape de prétraitement chez les 5 clones de miscanthus testés**

Clone	Flo	GiB	H8	Rot	Sil
Espèce	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i>
Xylose potentiellement disponible (% MS)	17,8	17,6	19,0	19,7	19,3
Xylose libre après prétraitement (% MS)	13,3	14,6	15,0	17,2	15,0

La teneur en xylose potentiellement disponible a été obtenue suite à une hydrolyse acide totale réalisée après le prétraitement. Le xylose libre a été mesuré directement sur la fraction liquide



**Figure 5-4 : Relation entre le xylose potentiellement disponible et le xylose libre après le prétraitement pour les 5 clones de miscanthus testés**

### b. Glucose cellulosique potentiellement disponible après le prétraitement

La teneur du glucose cellulosique obtenu après le prétraitemet et potentiellement disponible pour l'hydrolyse enzymatique est plus importante pour les clones Flo et GiB que pour les trois autres clones (Table 5-3). La plus forte teneur en cellulose dans la biomasse native (biomasse récoltée) de ces deux clones est directement corrélée avec le glucose cellulosique disponible après prétraitemet. En effet, il s'avère que la teneur en cellulose dans la biomasse native est significativement et positivement corrélée au rendement en glucose cellulosique potentiellement disponible après prétraitemet, avec un coefficient de corrélation de 0,99. Cela démontre bien que le prétraitemet n'engendre pas de modification significative (dégradation de la cellulose en autres molécules que le glucose comme l'hydroxyméthylfurfural qui est une molécule inhibitrice de la fermentation).

**Table 5-3 : Glucose cellulosique potentiellement disponible après l'étape de prétraitemet chez les 5 clones de miscanthus testés au regard de la cellulose contenue dans la biomasse native**

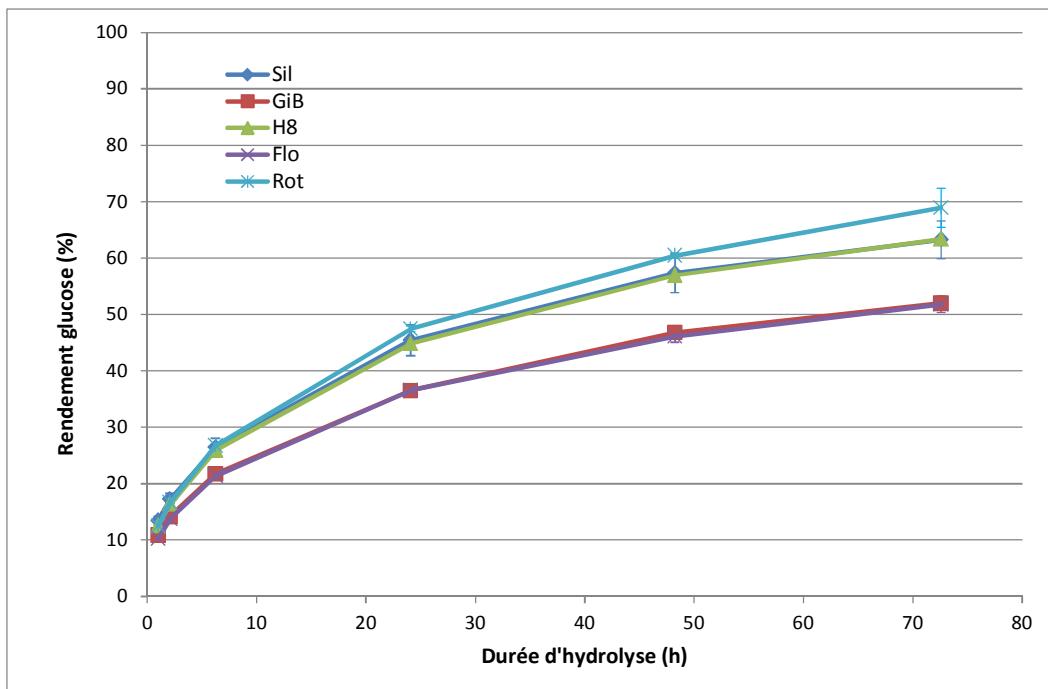
Clone	Flo	GiB	H8	Rot	Sil
Espèce	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i>
<b>Glucose cellulosique potentiellement disponible après prétraitemet (% MS)</b>	46,3	45,0	42,5	42,2	42,4
<b>Teneur en cellulose de la biomasse native (% MS)</b>	47,9	46,2	41,6	40,9	40,8

La teneur en glucose cellulosique potentiellement disponible après prétraitemet a été obtenue suite à une hydrolyse acide totale réalisée après le prétraitemet.

La teneur en cellulose de la biomasse native (biomasse récoltée) a été obtenue par la méthode Van Soest.

### 5.3.2 Hydrolyse enzymatique

#### a. Cinétique d'hydrolyse enzymatique



**Figure 5-5 : Cinétique de rendement en glucose obtenu lors de l'hydrolyse enzymatique pour les 5 clones de miscanthus testés**

Pour les clones Flo et GiB, la cellulose est moins rapidement hydrolysée en glucose par rapport aux trois autres clones (H8, Rot et Sil), dans les conditions discriminantes entre 0 et 72h (Figure 5-5).

De plus, les deux clones Flo et GiB suivent exactement la même cinétique d'hydrolyse. Parmi les trois autres clones, le clone Rot se démarque avec une cinétique d'hydrolyse plus rapide (Figure 5-5).

Ces différences pourraient s'expliquer par des teneurs en lignines dans la biomasse plus ou moins fortes, les clones Flo et GiB étant les plus lignifiés et le clone Rot étant le moins lignifié.

#### b. Rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique

Le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique de 72 heures varie d'environ 52 à 69 % en fonction des clones (Table 5-4). Il est le plus important pour le clone Rot ; viennent ensuite les clones H8 et Sil qui ont un rendement similaire. Enfin, les clones Flo et GiB ont le moins bon rendement en glucose extrait après hydrolyse. De même que pour la cinétique, les teneurs en lignines plus importantes chez les clones Flo et GiB pourraient expliquer un rendement moindre en glucose extrait après hydrolyse.

**Table 5-4 : Rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique chez les 5 clones de miscanthus testés**

Clone	Flo	GiB	H8	Rot	Sil
Espèce	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i>
Rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique (%)	51,8	52,0	63,3	68,9	63,2

Le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique est obtenu au bout de 72h d'hydrolyse pour se placer dans des conditions contrastées pour juger des performances des différentes biomasses, mais aussi pour être économiquement réaliste compte tenu du coût des enzymes (l'ajout en excès d'enzyme pour la deuxième phase de cinétique n'étant pas économiquement viable).

**c. Relations entre le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique et la composition de la biomasse native**

Le rendement en glucose extrait après hydrolyse est un des principaux critères à considérer dans le procédé. En effet, un des inconvénients majeurs de l'étape d'hydrolyse enzymatique est le coût élevé des enzymes. Pour l'industriel, il est donc primordial d'optimiser ce rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique de façon à diminuer au maximum les doses d'enzymes nécessaires.

Nous nous sommes donc intéressés aux relations existantes entre ce rendement et la composition de la biomasse native (biomasse récoltée). Nous avons privilégié les teneurs en cellulose et en lignines de la biomasse native, ces dernières étant susceptibles d'affecter le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique.

La teneur en lignines dans la biomasse native est négativement corrélée au rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique avec un coefficient de - 0,98 (Figure 5-6 a). Une augmentation de la teneur en lignines de 5,2 % MS réduit le rendement de glucose extrait après hydrolyse enzymatique d'environ 17 %.

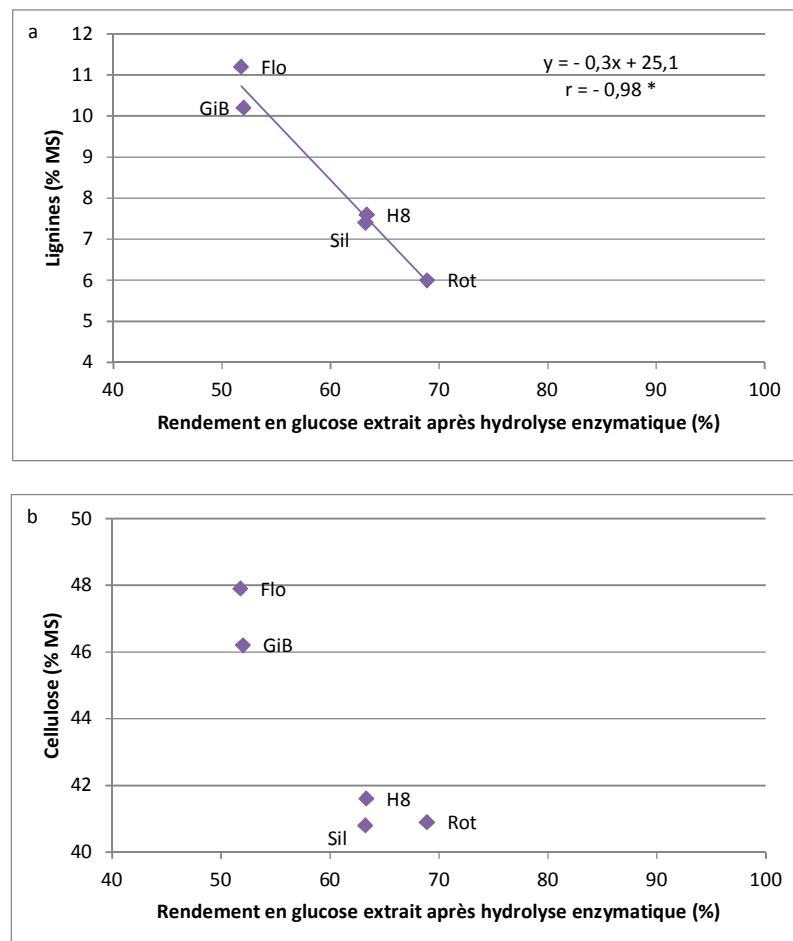
Xu et al. (2012) ont également montré, à partir de 12 clones de *Miscanthus* présentant des teneurs en cellulose, hémicelluloses, et lignines contrastées, que de fortes teneurs en lignines dans la biomasse avaient un effet négatif sur le rendement en hexoses extraits après hydrolyse enzymatique, qui s'apparente au rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique que nous avons évalué. Chez la canne à sucre, qui est proche du miscanthus d'un point de vue taxonomique, Mendes et al. (2011) observent les mêmes tendances. En testant deux types de bagasse, l'une présentant une plus faible quantité de lignine que l'autre, ils ont mis en évidence une plus rapide hydrolyse de la cellulose en glucose pour les échantillons présentant les teneurs en lignines les plus faibles. Les observations de Xu et al. (2012) et Mendes et al. (2011), issues de tests en laboratoire, sont en accord avec celles que nous avons obtenu à l'échelle industrielle sur miscanthus et confirment l'effet négatif de la lignine sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.

La teneur en cellulose dans la biomasse native est inversement reliée au rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique (Figure 5-6 b) ; on aurait pu s'attendre à l'inverse, c'est-à-dire, à un meilleur rendement en glucose extrait après hydrolyse pour de plus fortes teneurs en cellulose de la biomasse. De plus, la teneur en cellulose de la biomasse native ne suit pas une évolution linéaire avec le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique (Figure 5-6 b), ce qui sous-tend un comportement variable des clones.

Il s'avère que le clone Flo, qui a le plus de cellulose, présente également une moindre hydrolyse acide au prétraitement des hémicelluloses (moins de xylose libre après le prétraitement) et un rendement plus faible en glucose extrait après hydrolyse enzymatique (Cf § 5.3.1 a et Figure 5-7). La moins bonne hydrolyse enzymatique des clones Flo et GiB (et plus particulièrement du clone Flo) pourrait donc être expliquée par la présence d'hémicelluloses résiduelles non dégradées lors du prétraitement qui peut être un marqueur de moins bonne efficacité du prétraitement mais qui peut aussi concourir à une moindre efficacité des enzymes lors de l'hydrolyse par un encombrement stérique ou une inhibition des cellulases par les xylanes.

Dans leur étude, Xu et al. (2012) montrent une moins bonne hydrolyse enzymatique pour les clones de *Miscanthus* présentant les plus fortes teneurs en cellulose. Ces observations concordent avec nos résultats et confirment les effets synergiques négatifs de la cellulose et des lignines sur l'hydrolyse enzymatique. Xu et al. (2012) ne mentionnent cependant pas d'élément explicatif à la

relation non linéaire et non proportionnelle entre la teneur en cellulose de la biomasse native et le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique.

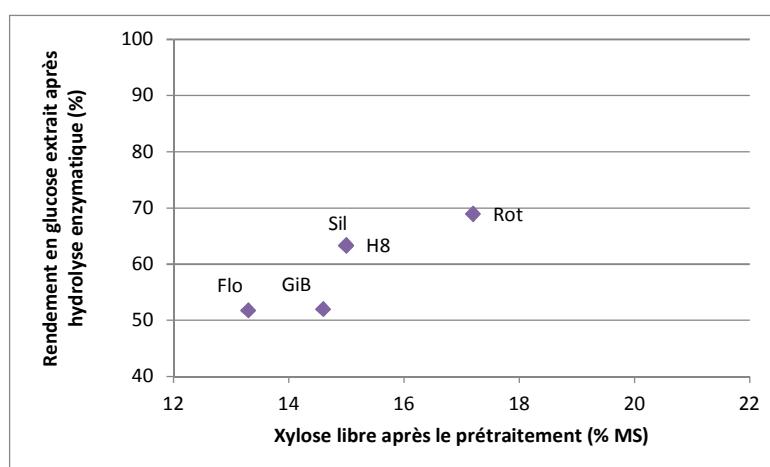


**Figure 5-6 : Relations entre le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique et les teneurs en (a) lignines, et en (b) cellulose de la biomasse native chez 5 clones de miscanthus testés**

Les teneurs en lignines, et en cellulose de la biomasse native ont été obtenues par la méthode Van Soest.

r : coefficient de corrélation de Pearson

\* Significatif au seuil de probabilité de 0,05



**Figure 5-7 : Relation entre le rendement en glucose extrait après hydrolyse enzymatique et le xylose libre après le prétraitement chez les 5 clones de miscanthus testés**

### 5.3.3 Potentiels et rendements en éthanol

Des différences sont observées entre les clones pour les différents potentiels et rendements en éthanol obtenus (Table 5-5).

Le clone Rot de l'espèce *M. sinensis* montre les plus forts potentiels en éthanol de la fraction solide cellulosique, de la fraction xylose, et de la biomasse. Il présente également le plus fort rendement en éthanol de la biomasse avec une valeur de 238 kg d'éthanol/t MS. Ce clone semble donc être prétraité et hydrolysé plus efficacement que les autres. Au contraire, les clones Flo et GiB présentent les plus faibles valeurs pour ces caractères et semblent donc être moins adaptés au prétraitement et à l'hydrolyse enzymatique. Les clones H8 et Sil, présentent, quant à eux, des valeurs intermédiaires.

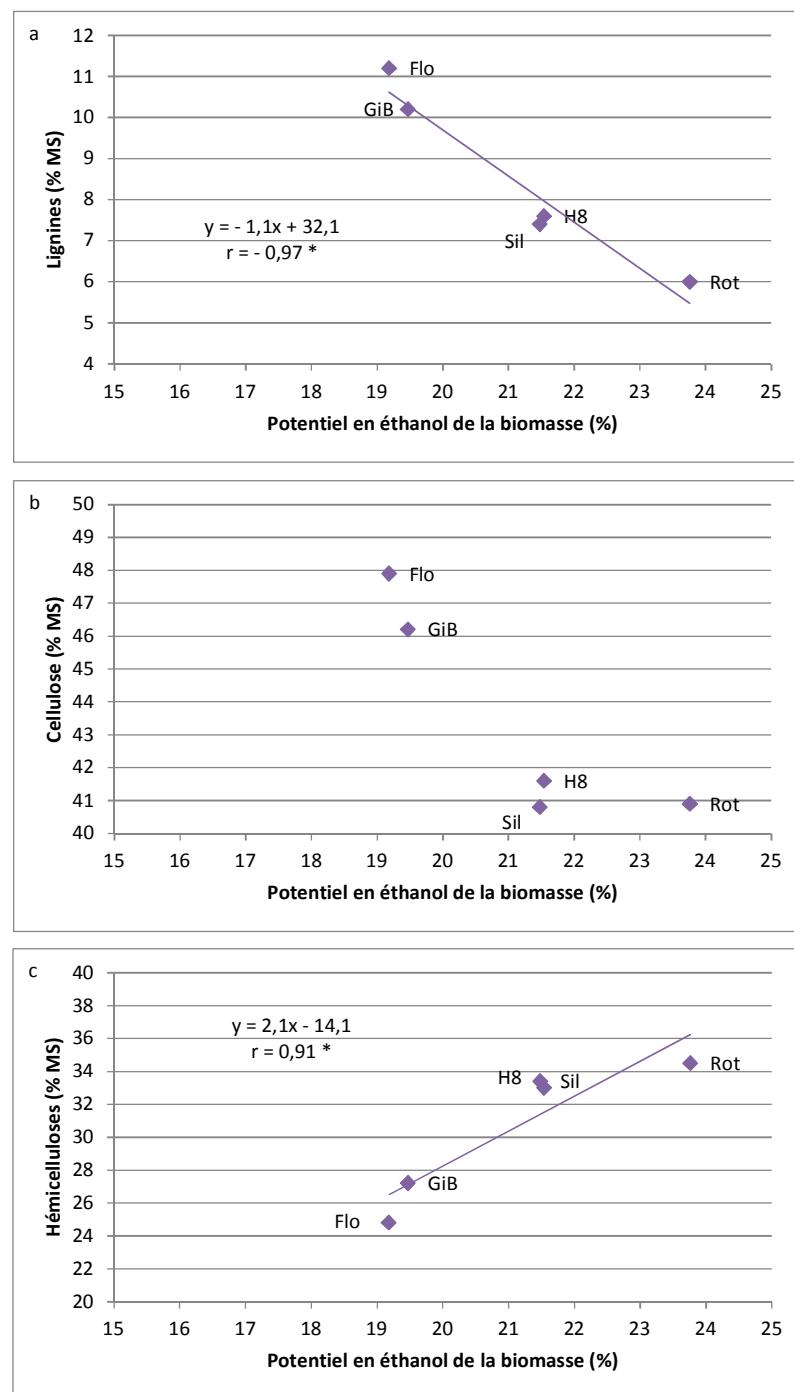
Si l'on prend en compte le rendement en matière sèche à l'hectare des clones, les tendances s'inversent : c'est le clone Flo qui présentent les plus forts rendements en éthanol à l'hectare avec une valeur de 6909 L d'éthanol à l'hectare, suivi par les clones GiB, H8, puis par les clones Sil et Rot. Cette inversion de classement s'explique par le fort rendement des clones Flo et GiB qui permet de compenser leur moins bonne aptitude à être prétraités et hydrolysés lors du procédé.

En dehors du classement des clones, il est important de noter que la part d'éthanol provenant de la cellulose (fraction glucose cellulosique) et des hémicelluloses (fraction xylose) est relativement constante entre les clones : 66 % de l'éthanol en moyenne provient de la dégradation de la cellulose selon les clones, le reste provenant de la conversion des hémicelluloses (Table 5-5).

**Table 5-5 : Potentiels et rendements en éthanol obtenus chez les 5 clones de miscanthus testés**

Clone	Flo	GiB	H8	Rot	Sil
Potentiel en éthanol de la fraction glucose cellulosique (%)	12,8	12,5	14,3	15,5	14,3
Potentiel en éthanol de la fraction xylose (%)	6,4	7,0	7,2	8,3	7,2
Potentiel en éthanol de la biomasse (MS) (%)	<b>19,2</b>	<b>19,5</b>	<b>21,5</b>	<b>23,8</b>	<b>21,5</b>
Part de l'éthanol provenant de la cellulose (%)	67	64	67	65	67
Rendement en éthanol de la biomasse (kg éthanol/t MS)	<b>192</b>	<b>195</b>	<b>215</b>	<b>238</b>	<b>215</b>
Rendement (t MS/ha)	28,4	26,1	21,9	16,3	17,0
Rendement en éthanol à l'hectare (t éthanol/ha)	<b>5,5</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>3,9</b>	<b>3,7</b>
Rendement en éthanol à l'hectare (L éthanol/ha)	<b>6909</b>	<b>6444</b>	<b>5970</b>	<b>4902</b>	<b>4636</b>
Classement relatif (%)	100	93	86	71	67

Enfin, si l'on corrèle le potentiel en éthanol de la biomasse avec les teneurs en lignines, celluloses, et hémicelluloses de la native (biomasse récoltée), on observe une corrélation négative entre le potentiel en éthanol et les teneurs en lignines (Figure 5-8 a). Une diminution de la teneur en lignines dans la biomasse de 5 % MS entraîne une augmentation d'environ 5 % du potentiel en éthanol. Concernant la cellulose, on observe la même relation non linéaire que celle obtenue précédemment avec le rendement en glucose extrait après enzymatique (Figure 5-8 b). Cela laisse supposer que le potentiel en éthanol de la biomasse est fortement dépendant de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. Concernant les hémicelluloses, on observe une corrélation positive avec le potentiel en éthanol (Figure 5-8 c) : une augmentation de la teneur en hémicelluloses de 10 % MS entraîne une augmentation d'environ 5 % du potentiel en éthanol. Cette corrélation peut s'expliquer par le fait qu'une plus importante teneur en hémicelluloses dans la biomasse donnera une plus grande quantité de xylose potentiellement disponible et améliorera ainsi le potentiel en éthanol de la biomasse.



**Figure 5-8 : Relations entre le potentiel en éthanol de la biomasse et les teneurs en (a) lignines, (b) cellulose, et (c) hémicelluloses de la biomasse native (biomasse récoltée) chez les 5 clones de miscanthus testés**  
 Les teneurs en lignines, cellulose, et hémicelluloses de la biomasse native ont été obtenues par la méthode Van Soest.

r : coefficient de corrélation de Pearson

\* Significatif au seuil de probabilité de 0,05

Ces résultats vont dans le même sens que d'autres études menées en laboratoire sur le switchgrass (*Panicum virgatum* L.) et le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), des cultures potentiellement intéressantes pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. En effet, sur switchgrass, Sarath et al. (2011) montrent que les plantes ayant la plus faible teneur en lignines dans leurs tiges présentent les meilleurs rendements en éthanol de la biomasse. De même, en étudiant la composition chimique et le potentiel de production d'éthanol à partir de bagasse chez 4 variétés de sorgho, Han et al. (2013) ont mis en évidence des corrélations négatives significatives entre le potentiel de production d'éthanol et les teneurs en cellulose et en lignines de la bagasse.

Ces observations obtenues sur d'autres cultures à l'échelle du laboratoire confortent nos résultats obtenus sur miscanthus à l'échelle de pilote industriel sur la variabilité de production d'éthanol en fonction de la composition de la biomasse native.

### **5.3.4 Situation du miscanthus par rapport à d'autres biomasses potentiellement intéressantes pour la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération**

Les rendements en éthanol à l'hectare obtenus lors de ces essais pour les 5 clones de miscanthus sont prometteurs. En effet, parmi les 5 clones testés, nous atteignons un rendement en éthanol à l'hectare maximal de 6909 L pour le clone Flo appartenant à l'espèce *M. x giganteus*. Cette valeur est similaire au rendement en éthanol à l'hectare que nous pourrions obtenir pour le saccharose de la canne à sucre (procédé et plante de 1<sup>ère</sup> génération) (Table 5-6). En revanche, ce rendement de 6909 L d'éthanol à l'hectare obtenu sur le clone Flo est environ deux fois plus important que celui que nous pourrions obtenir à partir de grain de blé (1<sup>ère</sup> génération) ; il est environ sept fois supérieur à celui que nous pourrions obtenir à partir de paille de blé (2<sup>ème</sup> génération) (Table 5-6).

**Table 5-6 : Comparaison de la production d'éthanol à l'hectare du clone de miscanthus « Flo » avec d'autres cultures (Martel, communication personnelle)**

	Canne à sucre (1 <sup>ère</sup> génération)	Grain de blé (1 <sup>ère</sup> génération)	Paille de blé (2 <sup>ème</sup> génération)
Tonne brute de biomasse par hectare et par an	80	8	3
Matière sèche de la biomasse	30 %	87 %	87 %
Taux de sucres complexes	45 %	69 %	65 %
Rendement d'hydrolyse	100 %	95 %	90 %
Tonnes d'éthanol à l'hectare	5,5	2,4	2,8
Litres d'éthanol à l'hectare	6916	3084	1032
Ratio par rapport au clone de miscanthus « Flo »	1,00	0,45	0,15

## 5.4 Conclusions et perspectives

Nous avons mis en évidence que les cinq clones de miscanthus testés présentent des aptitudes différentes à la transformation en bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération et que *M. x giganteus* n'est pas le plus optimal. Ces résultats répondent à notre première hypothèse. Au niveau du prétraitement et de l'hydrolyse enzymatique, les clones Flo et GiB de l'espèce *M. x giganteus* présentent les moins bons résultats. Au contraire, le clone Rot, appartenant à l'espèce *M. sinensis*, présente les plus grandes quantités en glucose et xylose potentiellement disponibles après le prétraitement, le meilleur rendement de glucose extrait après hydrolyse enzymatique et, par conséquent, le meilleur potentiel en éthanol. Il semble donc mieux adapté à ces deux étapes en comparaison aux clones Flo et GiB. Les clones H8 et Sil sont intermédiaires.

Si l'on prend en compte les rendements en biomasse à l'hectare, les tendances s'inversent pour le classement des clones : de par leurs forts rendements, les clones Flo et GiB présentent les meilleurs rendements en éthanol à l'hectare, contrairement au clone Rot, qui présente alors le rendement le plus faible.

Les différences entre clones mises en évidence lors du prétraitement et de l'hydrolyse enzymatique s'expliquent notamment par la composition de la biomasse native. Ceci répond à notre deuxième hypothèse. De fortes teneurs en lignines dans la biomasse réduisent le rendement en glucose extrait après hydrolyse et le potentiel en éthanol. La résistance de la biomasse au prétraitement pourrait engendrer une moins bonne hydrolyse acide des hémicelluloses et donc une moins bonne hydrolyse enzymatique de la cellulose et un moins bon potentiel en éthanol, le potentiel en éthanol dépendant fortement de l'hydrolyse enzymatique.

La teneur en lignines de la biomasse, de par son impact négatif sur l'hydrolyse enzymatique, doit être prise en compte en tant que critère de sélection pour les futurs programmes d'amélioration du miscanthus en vue d'une valorisation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Une voie à explorer consisterait par exemple à améliorer les clones les plus productifs en diminuant leur teneur en lignines. Le clone Rot, qui présente de bonnes aptitudes à la transformation et peu de lignines, pourrait être un parent de choix pour de futurs croisements. En effet, si le clone Flo, qui produit le meilleur rendement en éthanol à l'hectare, avait l'aptitude du clone Rot à être transformé, l'on pourrait s'attendre à une production d'éthanol à l'hectare 20 % supérieure à celle observée aujourd'hui, ce qui représenterait un gain non négligeable par l'amélioration génétique. Nos résultats montrent aussi que les hémicelluloses sont à prendre en compte pour l'amélioration génétique. Nous manquons cependant d'éléments qui permettraient d'évaluer leur impact sur le prétraitement.

En outre, nos travaux ont également mis en évidence qu'il pourrait y avoir des possibilités d'amélioration au niveau du procédé : optimisation du prétraitement, ajustement de la dose d'enzymes pour l'hydrolyse enzymatique, ce qui vient s'ajouter aux perspectives d'amélioration génétique.

Enfin, nous n'avons traité ici que les deux premières étapes du procédé, le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique. La mise en évidence de différences de comportements des clones de miscanthus testés dès ces premières étapes nous font penser que ces clones pourraient également avoir des aptitudes différentes lors des étapes ultérieures du procédé et notamment la fermentation du glucose et du xylose (impact biologique des lignines et des autres composés) et la distillation (impact physique du taux de lignines insolubles dans les étapes de purification). Ces différences entre clones pourraient ainsi amener à une quantité et une qualité de bioéthanol produit variable et pas forcément optimale. Pour valider cette hypothèse, il est envisagé, par la suite, de tester le comportement des clones étudiés ici lors des étapes suivantes de fermentation et de distillation du procédé au sein du pilote FUTUROL. De plus, différentes études mettent en avant l'impact d'autres facteurs que ceux étudiés ici sur l'efficacité du procédé de transformation tels que l'architecture de la paroi, la cristallinité de la cellulose ou encore la production de molécules inhibitrices de la fermentation pouvant être libérées lors du prétraitement. Dans des analyses ultérieures, il serait donc intéressant d'investiguer ces différents points pour les clones étudiés afin de (i) continuer à préciser la définition des idéotypes de miscanthus valorisables pour une valorisation bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération et (ii) proposer de nouveaux critères de sélection à prendre en compte dans les programmes d'amélioration du miscanthus pour ce débouché.

## 5.5 Références bibliographiques

- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F.** 2001b. Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Goffart, J.P., Gerin, P.A., Stilmant, D., and Delcarte, J.** 2010. Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash contents in various lignocellulosic crops for second generation bioethanol production. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 14:549-560.
- Han, K.J., Pitman, W.D., Kim, M., Day, D.F., Alison, M.W., McCormick, M.E., and Aita, G.** 2013. Ethanol production potential of sweet sorghum assessed using forage fiber analysis procedures. *Global Change Biology Bioenergy* 5:358-366.
- Jakob, K., Zhou, F.S., and Paterson, A.** 2009. Genetic improvement of C4 grasses as cellulosic biofuel feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45:291-305.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F.** 2003a. Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- McCann, M.C., and Carpita, N.C.** 2008. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11:314-320.
- Mendes, F.M., Siqueira, G., Carvalho, W., Ferraz, A., and Milagres, A.M.F.** 2011. Enzymatic Hydrolysis of Chemithermomechanically Pretreated Sugarcane Bagasse and Samples with Reduced Initial Lignin Content. *Biotechnology Progress* 27:395-401.
- Sarath, G., Dien, B., Saathoff, A.J., Vogel, K.P., Mitchell, R.B., and Chen, H.** 2011. Ethanol yields and cell wall properties in divergently bred switchgrass genotypes. *Bioresource Technology* 102:9579-9585.
- SAS Institute Inc. 2000.** SAS user's guide: statistics. Cary, NC, USA.
- Sticklen, M.** 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 17:315-319.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H.** 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 50:50-55.
- Xu, N., Zhang, W., Ren, S.F., Liu, F., Zhao, C.Q., Liao, H.F., Xu, Z.D., Huang, J.F., Li, Q., Tu, Y.Y., Yu, B., Wang, Y.T., Jiang, J.X., Qin, J.P., and Peng, L.C.** 2012. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatments in Miscanthus. *Biotechnology for Biofuels* 5.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M.** 2012c. Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of Miscanthus Clones. *Bioenergy Research* 5:841-854.

## **Chapitre 6**

**Développement d'outils de sélection adaptés  
au miscanthus dans un objectif de production  
de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**



## Chapitre 6-1

# Early prediction of *Miscanthus* biomass production and composition based on the first six years of cultivation

Stéphanie Arnoult<sup>1,2</sup>, Marie-Chantal Mansard<sup>2</sup>, and Maryse Brancourt-Hulmel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1281 SADV, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>2</sup> (Current address) INRA, UE0972 GCIE Picardie, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

<sup>3</sup> INRA, UR1158 AgroImpact, Site d'Estrées-Mons, 2 Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP 50136, F-80203 Péronne Cedex, France

### **Keywords:**

*Miscanthus clones*

*Prediction*

*Year of cultivation*

*Biomass production*

*Biomass composition*

Ce chapitre est sous presse dans le journal *Crop Science*

doi: 10.2135/cropsci2014.07.0493.



## Abstract

*Miscanthus* is a promising feedstock for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production. This perennial crop produces its biomass in two phases: a yield-building phase, where the biomass production increases gradually, and a plateau phase, where it is maintained. However, to target the breeding of *Miscanthus* for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production, the early selection of interesting traits is critical. We therefore investigated the inter-annual correlations within and among the traits related to biomass production and composition.

We studied 21 clones belonging to *M. x giganteus*, *M. sacchariflorus*, and *M. sinensis* species cultivated on plots from the second to the sixth year at two harvest dates.

The biomass production, canopy height, plant stem number, aboveground plant volume index were better predicted from the third year than from the second year (minimum correlation coefficients of 0.76 and 0.67 respectively). The stem diameter was well predicted from the second-year (correlations above 0.93). The canopy height and the aboveground plant volume index determined in the second and third year were the best predictors of the biomass produced in the second, third, and fourth year (minimum correlations of 0.77 against 0.52 for flowering date or 0.64 for stem diameter). For older crops, the canopy height measured in the second and third year was the best predictor of the biomass production (correlations above 0.70). The inter-annual correlations were lower for the biomass composition-related traits than for the production-related traits and fluctuated over time. These results showed that early prediction of interesting traits is feasible to breed varieties tailored for biofuel production.

## Abbreviations

DD, degree days

DM, dry matter

ha, hectare

Max, maximum

Min, minimum

t, ton

## 6.1 Introduction

*Miscanthus* is a perennial crop that can be cultivated for up to 25 years (Lewandowski et al., 2003b). Its biomass is produced in two phases: a yield-building phase, where the biomass production gradually increases, and a plateau phase, where the biomass production is maintained (Clifton-Brown et al., 2001a; Clifton-Brown et al., 2008; Zub and Brancourt-Hulmel, 2010).

The plateau phase of biomass production, which corresponds to the adult phase, can be attained at various ages according to Clifton-Brown et al. (2008) and Miguez et al. (2008). *M. x giganteus*, the species most studied in long-term experiments, can take up to five years to reach the plateau phase of biomass production, depending on the environmental conditions and crop management practices.

*Miscanthus* biomass production is a complex trait involving earliness and morphological traits such as canopy height, number of stems per plant, and stem diameter (Zub et al., 2011; Robson et al., 2013). During the yield-building phase, the canopy height, the stem number and the stem diameter to a lesser extent increase gradually, similarly to the biomass production (Jezowski et al., 2011; Zub et al., 2011). In addition to the effect of the year of cultivation, the biomass production, flowering date, canopy height, stem number, and stem diameter vary according to the clone and the harvest date (Lewandowski and Kicherer, 1997; Clifton-Brown and Lewandowski, 2002; Gauder et al., 2012; Larsen et al., 2014). Furthermore, biomass production is highly and positively correlated with the flowering date, canopy height, and stem diameter (Zub et al., 2011). In addition, the aboveground volume of the plant has been identified as a reliable predictor of biomass production for the second and the third years of cultivation (Zub et al., 2012b).

Moreover, the traits related to the biomass composition are more consistent throughout the years of cultivation than the traits related to the biomass production (Allison et al., 2011). The traits related to the biomass composition are influenced mainly by the harvest date and the *Miscanthus* clone (Allison et al., 2011; Qin et al., 2012). The aboveground biomass production is highly and positively associated with cellulose and lignin contents. It is negatively associated with the contents of hemicellulose, soluble, and ash.

The 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production industry needs crops displaying high aboveground biomass production, as well as high cellulose and hemicellulose contents and low lignin, soluble, and ash contents (van der Weijde et al., 2013, Dumas and Navard, personal communication).

To breed *Miscanthus* clones that are tailored for 2nd-generation bioethanol production through an efficient breeding strategy, the early selection of traits that are related to the biomass production and composition in the first few years of cultivation is essential for this perennial crop, *i.e.*, without having to wait for the adult phase. For this purpose, biomass production and composition predictions

are needed. Moreover, as a complex trait, biomass production needs to be predicted with reliability using non-destructive and easy-to-measure traits.

We hypothesized that (i) the traits that are related to the biomass production and composition of a mature crop can be predicted in the early stages and (ii) an index combining several simple traits can improve the reliability of the predicted biomass production.

Therefore, for breeding purpose, the aims of this study were (i) to investigate the potential to predict the traits of interest that are related to biomass production and composition in the early stages of the crop and (ii) to determine reliable predictors using simple traits or an index to estimate biomass production.

To meet these objectives, we studied 21 *Miscanthus* clones that were cultivated for 5 consecutive years with two harvest dates (autumn and winter harvests). These two harvest dates are potentially interesting for diverse end-uses. We studied the inter-annual correlations involving the biomass production, the traits related to biomass production (*i.e.*, the flowering date, canopy height, number of stems per plant, and stem diameter), and the traits related to the biomass composition (*i.e.*, the cellulose, hemicellulose, lignin, soluble, and ash contents in the aboveground biomass). This paper will provide guidelines for the early selection of *Miscanthus* clones that are tailored for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production.

## 6.2 Materials and methods

### 6.2.1 Experimental site and climatic conditions

The experimental site is located in the Picardie region of Northern France (49°53N, 3°00E) at the INRA experimental unit in Estrées-Mons. The soil is a deep loam soil (Ortic Luvisol, FAO classification) and the climate is oceanic. The rainfall and temperature data were collected for the duration of the trial by a local meteorological station located at a distance of 1 km from the experimental site.

### 6.2.2 Experimental design

The experiment was designed as a randomized complete block comprised of six blocks, each containing 21 clones. The trial contained a total of 126 plots, each plot measuring 16 m<sup>2</sup>. Among the 21 *Miscanthus* clones planted, four were identified as *M. x giganteus* clones, fifteen as *M. sinensis* clones, and two as *M. sacchariflorus* clones (Table 6-1). Among the four *M. x giganteus* clones, H8 was considered as a *M. x giganteus* clone as it was a hybrid between *M. sacchariflorus* and *M. sinensis*. The clone named “Flo” was identified as belonging to the *M. x giganteus* species using nuclear DNA analysis with amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers (Rambaud, personal communication) and cpDNA analysis (Feng et al., 2014).

**Table 6-1: Description of the 21 *Miscanthus* clones studied in the experiment, including the species, ploidy level, name, code and acquisition**

Species	Name	Code	Ploidy level †	Acquired from
<i>M. x giganteus</i>	<i>M. x giganteus</i> UK	GiB	3x	United Kingdom, ADAS
	<i>M. x giganteus</i> DK	GiD	4x	Denmark, Nordic Biomass
	<i>M. x giganteus</i> Floridulus	Flo ‡	3x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Hybrid 8	H8 §	2x	Danish institute of agricultural science, Aarhus
<i>M. sacchariflorus</i>	<i>M. sacchariflorus</i>	Sac	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sacchariflorus</i> Hybrid 5	H5 §	4x	Danish institute of agricultural science, Aarhus
<i>M. sinensis</i>	<i>M. sinensis</i> August Feder	Aug	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Ferner Osten	Fer	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Flamingo	Fla	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Goliath	Gol	4x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Goliath DK	GoD	4x	Denmark, Nordic Biomass
	<i>M. sinensis</i> Graziella	Grz	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Herman Müssel	Her	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Hybrid 6	H6 ¢	4x ¶	Danish institute of agricultural science, Aarhus
	<i>M. sinensis</i> Malepartus	Mal	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Punktchen	Pun	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Purpurescens	Pur	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld
	<i>M. sinensis</i> Rotsilber	Rot	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Silberspinne	Sil	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Strictus	Str	2x	France, Nursery Chombart
	<i>M. sinensis</i> Yaku Jima	Yak	2x	Belgium, Nursery Bruckeveld

† From Zub et al. (2012c).

‡ The clone named “Flo” was determined as a clone belonging to the *M. x giganteus* species (Feng et al., 2014; Rambaud, personal communication).

§ Clones previously studied by Clifton-Brown et al. (2001b) and Lewandowski et al. (2003a).

¶ The H6 clone was determined as a tetraploid clone (4x) (Rambaud, personal communication).

In addition to the various clones, the harvest date was studied in this experiment. Two harvest dates were tested: an autumn harvest and a winter harvest. The autumn harvest was performed at the end of the growing period according to the earliness of each clone, i.e. 200 degree days after the flowering time of each clone. The winter harvest was performed at the end of winter at over-maturity (in February). This harvest date appeared to be more suitable for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production (Cadoux et al., 2014).

Within the six blocks, the autumn harvest was consistently assigned to the three same blocks and the winter harvest was always performed on the three remaining blocks.

Each 16-m<sup>2</sup> plot consisted of four rows of eight plants. A border row that surrounded the plots was planted with the same clone, i.e., *M. sinensis* Malepartus.

### **6.2.3 Trial management**

The trial was planted by hand in spring 2007 at a density of 2 plants per m<sup>2</sup>. The plants were watered immediately after planting to ensure good root contact with the soil. No irrigation was applied during the following years of cultivation. No fertilizer was applied during the entire experiment. The weeds were controlled by hand during the two first years and by machine hoeing for the subsequent years.

### **6.2.4 Measurements and calculations**

The flowering date, aboveground biomass production and its components (*i.e.*, canopy height, stem number per plant, and stem diameter) were measured each year from the second to the sixth year after planting (2008 to 2012) and for each harvest date.

#### **a. Flowering date**

The flowering date corresponded to the date on which 50% of the plants in each plot had their flowers open, when anthers were first extruded. This date was recorded for each plot by counting the number of plants for which at least one single flower was open. This count was performed each year during July, August, September, and October, corresponding to the flowering period as a function of the earliness of the clones. The record was performed every 2 days. Some clones (Flo, GiB, GiD, and H5) did not flower in the Picardie region because the flowering stage was not reached. These clones were of particular interest in our study because of their high aboveground biomass production. Therefore, in the absence of visible flowering, the flowering date was recorded as the first frost day of each year so all clones could be included in the analysis. The first frost day was based on the average daily temperature below zero degrees Celsius (°C). The flowering date was expressed in degree days (DD), using the same base temperature of 10 °C as Jensen et al. (2013).

#### **b. Aboveground biomass production**

Each plot was harvested using a reed harvester. The plants were cut at a height of approximately 5 cm above the ground. The total aboveground fresh matter of each plot was weighed. A sample of approximately 500 g of fresh matter was randomly selected from each plot and weighed. Each sample was dried at 65 °C for four days in a well-ventilated oven. The moisture content of each sample was determined and used to calculate the dry weight and moisture content of the total plot

biomass. The dry weight (referred to as the aboveground biomass production) was expressed as tons of dry matter per hectare (t DM/ha).

**c. Biomass components**

The canopy height, stem number per plant, and stem diameter were recorded in each plot prior to each harvest. The canopy height corresponded to the distance from the ground to the ligule of the last ligulated leaf. In each plot, the canopy height and the stem number per plant were measured on 3 median plants. These 3 plants were chosen as they reflected the median values of the canopy height and the stem number per plant. These median values were based on the measures of all the plants of each plot. The average canopy height and stem number per plant were calculated from these 3 individual values. The stem diameter was measured at a height of 5 cm above the ground on 12 randomly selected stems per plot and the average stem diameter was calculated.

**d. Calculation of the aboveground plant volume index**

The aboveground plant volume index (expressed in cm<sup>3</sup>) was calculated as a function of the canopy height, stem number per plant, and stem diameter according to Zub et al. (2012b):

$$\text{Aboveground plant volume index} = \text{Canopy height} * \text{Stem number per plant} * (\text{Stem diameter}/2)^2 * \pi$$

### **6.2.5 Chemical analyses of the biomass composition**

The biomass composition of the total aboveground biomass was determined using chemical analyses from samples harvested in the third, fourth, and fifth years (*i.e.*, 2009 to 2011).

**a. Sample preparation**

Dried aboveground biomass samples were coarsely ground using a crusher mill (Viking, GE 220 model, France) and then ground using a hammer crusher (Gondard Productions model, France) to pass through a 1-mm screen as recommended for subsequent fiber analysis by Van Soest (1967).

**b. Determination of the cellulose, hemicellulose, lignin, and soluble contents**

The ground samples were analyzed by the LANO laboratory (Laboratoire Agronomique de Normandie, France) for soluble, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) according to a protocol adapted from the Van Soest method (Van Soest, 1967). Briefly, the NDF fraction corresponded to the ash-corrected residue remaining after refluxing for 60 minutes in a neutral-buffered detergent solution. The ADF fraction corresponded to the ash-corrected residue remaining after refluxing the samples in a solution of hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.5 mol/L sulfuric acid. The ADL fraction was obtained by treating the ADF with 72% sulfuric acid.

The cellulose, hemicellulose, and lignin contents of each sample were calculated by subtracting the corresponding values from the NDF, ADF, and ADL fractions (expressed as % DM); (i) the NDF consists of cellulose, hemicelluloses, and lignins; (ii) the ADF consists of cellulose and lignin, and (iii) the ADL consists of lignin. The cellulose, hemicellulose, and lignin contents of each sample were calculated according to equations (1), (2), and (3):

$$\text{Cellulose content (Cellulose)} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad (1)$$

$$\text{Hemicellulose content (Hemicellulose)} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (2)$$

$$\text{Lignin content (Lignin)} = \text{ADL} \quad (3)$$

The soluble content (Soluble) was expressed as percent dry matter (% DM), calculated according to equation (4), which corresponds to the NDF soluble fraction as follows:

$$\text{Soluble} = 100 - \text{NDF} \quad (4)$$

**c. Determination of the ash content**

The ash content was expressed as percent dry matter (% DM) and corresponds to the dry matter remaining after calcination of the samples at 550 °C for 12 h.

### **6.2.6 Statistical analysis**

The experimental dataset was analyzed through correlations between the traits using the Pearson correlation coefficients of the CORR procedure (SAS Institute Inc., 2000). In addition, simple linear regression were performed for the analysis of the aboveground biomass production, the log(Aboveground plant volume index), and the cellulose content.

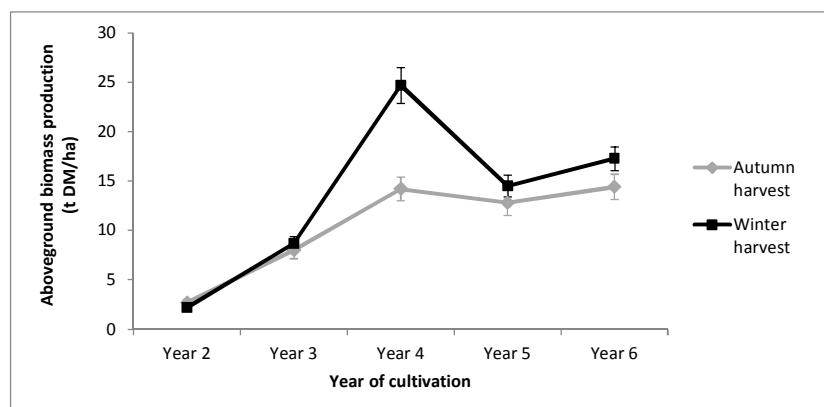
For the traits related to aboveground biomass production, we used 19 clones corresponding to the 21 clones that were used in our experiment except for clones H5 and Sac, for which data were not available for the stem number, stem diameter, and aboveground volume. For the traits that are related to the biomass composition, we used 19 clones corresponding to the 21 clones that were used in our experiment except for clones Her and Pun, for which data were not available.

We calculated the correlations for each year and each harvest date separately considered each of the 3 blocks.

## 6.3 Results

### 6.3.1 Some of the biomass production-related traits increased gradually up to the fourth year, while all of the biomass composition-related traits were consistent throughout the years

The average values for the aboveground biomass production increased gradually from the second to the fourth year of cultivation, and subsequently, were more consistent up to the sixth year (Table 6-2 a). Additionally, the average values for the aboveground biomass production from the winter harvest of the fourth year were particularly high (Table 6-2 a); this was attributed to more favorable climatic conditions in this year (data not shown). A peak in the biomass production was clearly visible for the two harvest dates during the fourth year. It appeared that the biomass production plateau was attained in this year in the autumn harvest, whereas the winter yields were more variable (Figure 6-1).



**Figure 6-1: Average aboveground biomass production of 19 *Miscanthus* clones harvested in autumn and winter of the second to the sixth year of cultivation**  
The errors bars represent the standard error

In addition, the range in the clonal variation for the aboveground biomass production increased with the number of years of cultivation for each harvest date: the minimum values were especially consistent for this trait, while the maximum values increased with the number of years of cultivation (Table 6-2 a).

The canopy height, stem number per plant, and aboveground plant volume index followed the same trend as the aboveground biomass production over the years of cultivation (Table 6-2 a). In contrast, the average of the stem diameter and flowering date were consistent over time (Table 6-2 a).

Regarding the clonal variation, the observation of the minimum and maximum values showed that the range in the canopy height, stem number per plant, and aboveground plant volume index increased with the number of years of cultivation for each harvest date (Table 6-2 a). However, the ranges corresponding to the flowering date and stem diameter remained relatively consistent over the years of cultivation (Table 6-2 a).

The average values of the traits related to the biomass composition were more consistent than the aboveground biomass production-related traits: for each harvest date, the average values of the cellulose, hemicellulose, lignin, soluble, and ash contents in the total aboveground biomass were consistent from the third to the fifth year of cultivation (Table 6-2 b). In contrast with the traits related to the biomass production, the range in the clonal variation for all the traits related to biomass composition were consistent throughout the years of cultivation for each harvest date (Table 6-2 b).

**Table 6-2: Description of the dataset of the *Miscanthus* clones grown in Northern France and harvested on two harvest dates (autumn and winter) from the second to the sixth year of cultivation for the traits related to the biomass production (a) and composition (b)**

a

Variable (Number of clones)	Year of cultivation Harvest date	2		3		4		5		6	
		Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter
Aboveground biomass production (t DM/ha) (19 clones)	Mean ± SE	2.7 ± 0.3	2.2 ± 0.2	8.0 ± 0.9	8.7 ± 0.7	14.2 ± 1.2	24.7 ± 1.8	12.8 ± 1.3	14.5 ± 1.1	14.4 ± 1.3	17.3 ± 1.2
	Min	0.1	0.1	0.3	0.6	1.2	4.7	0.9	3.4	0.0	2.4
	Max	10.6	5.8	22.7	17.2	36.4	52.0	44.9	32.4	38.2	36.9
Flowering date (DD base 10) (19 clones)	Mean ± SE	864 ± 17	na	934 ± 21	888 ± 25	888 ± 16	891 ± 17	880 ± 23	869 ± 25	904 ± 14	886 ± 14
	Min	535	na	635	639	724	726	603	586	718	744
	Max	1061	na	1187	1187	1089	1089	1208	1208	1038	1038
Canopy height (cm) (19 clones)	Mean ± SE	96 ± 4	100 ± 5	130 ± 7	144 ± 8	148 ± 8	161 ± 9	132 ± 9	156 ± 10	155 ± 10	180 ± 8
	Min	45	36	58	68	72	85	53	72	77	90
	Max	190	166	229	243	273	292	295	310	320	328
Stem number per plant (19 clones)	Mean ± SE	23 ± 2	19 ± 2	49 ± 5	57 ± 6	118 ± 13	109 ± 10	109 ± 12	104 ± 10	na	na
	Min	6	4	13	11	36	28	41	29	na	na
	Max	73	90	198	208	425	330	410	347	na	na
Stem diameter (mm) (19 clones)	Mean ± SE	na	5.8 ± 0.3	5.0 ± 0.3	5.3 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.6 ± 0.3	5.1 ± 0.3	6.0 ± 0.4	5.4 ± 0.3	5.9 ± 0.4
	Min	na	2.8	1.4	2.6	2.3	2.5	2.2	3.0	2.1	2.5
	Max	na	9.5	10.0	9.8	10.3	10.0	10.7	12.0	10.9	11.7
Aboveground plant volume index (cm <sup>3</sup> ) (19 clones)	Mean ± SE	na	588 ± 72	1291 ± 181	1784 ± 212	3251 ± 409	3792 ± 366	2758 ± 408	4221 ± 575	na	na
	Min	na	14	30	161	656	656	308	669	na	na
	Max	na	1955	6416	6612	13861	9910	11752	19605	na	na

DD, degree days; DM, dry matter; Max, maximum; Min, minimum; SE, standard error

na: Data not available

(Table 6-2 continued overleaf)

**Table 6-2 (continued)**

b

Variable (Number of clones)	Year of cultivation Harvest date	3		4		5	
		Autumn	Winter	Autumn	Winter	Autumn	Winter
Cellulose	Mean ± SE	35.7 ± 0.3	43.4 ± 0.5	35.8 ± 0.4	42.3 ± 0.4	34.3 ± 0.3	41.0 ± 0.5
(% DM)	Min	31.3	34.2	26.2	37.1	30.3	33.6
(19 clones)	Max	40.6	49.5	41.4	48.1	39.3	48.0
Hemicelluloses	Mean ± SE	34.2 ± 0.3	35.4 ± 0.5	31.9 ± 0.3	33.9 ± 0.4	35.6 ± 0.3	36.2 ± 0.4
(% DM)	Min	29.4	27.7	26.6	27.3	31.5	29.8
(19 clones)	Max	38.4	40.4	35.9	39.2	39.3	40.6
Lignins	Mean ± SE	5.3 ± 0.2	7.7 ± 0.3	5.5 ± 0.2	7.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	5.8 ± 0.2
(% DM)	Min	3.5	4.0	3.0	5.7	2.2	4.2
(19 clones)	Max	9.2	12.1	9.1	11.5	6.3	8.4
Solubles	Mean ± SE	24.8 ± 0.3	13.6 ± 0.3	26.9 ± 0.4	16.0 ± 0.3	26.2 ± 0.2	17.0 ± 0.3
(% DM)	Min	19.8	9.8	21.9	11.6	23.0	13.2
(19 clones)	Max	29.5	20.6	35.3	21.9	29.9	25.8
Ash	Mean ± SE	4.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.7 ± 0.1	3.4 ± 0.1	5.0 ± 0.1	3.5 ± 0.2
(% DM)	Min	1.8	1.2	2.6	1.5	2.8	1.5
(19 clones)	Max	5.9	5.5	6.2	5.2	6.4	10.3

DM, dry matter; Max, maximum; Min, minimum; SE, standard error

### **6.3.2 The adult aboveground biomass production and its related traits were well predicted from the younger years of cultivation, in particular from the third year**

The aboveground biomass production in the winter harvest was highly and significantly correlated between the years of cultivation, with correlation coefficients ranging from 0.69 to 0.95 (Table 6-3 a). Interestingly, the aboveground biomass production was highly and significantly correlated between two subsequent years (in the diagonal of the matrix), with correlation coefficients ranging from 0.87 to 0.95 (Table 6-3 a). In contrast, the correlations between non-sequential years were lower and a minimum correlation coefficient of 0.69 was observed (Table 6-3 a). In addition, the correlation coefficients gradually decreased when the interval between the years increased: the aboveground biomass harvested in the sixth year was highly correlated with the aboveground biomass produced in the fourth and fifth year (correlation coefficients above 0.85), whereas it was less correlated with the aboveground biomass produced in the second and third year (Table 6-3 a).

Interestingly, the relative contribution of the individual genotypes was similar throughout the years for these correlations as illustrated in Figure 6-2. In particular, the clones Flo, GiB, and GiD, which clearly stood out on the plots maintained their relative contribution (Figure 6-2).

Regarding the traits related to the biomass production, they were always correlated between the years of cultivation, with correlation coefficients ranging from 0.59 to 0.99 in the winter harvest (Table 6-3 b-f). The flowering date generally displayed the highest correlation coefficients between years followed by the stem diameter, canopy height, aboveground plant volume index, and stem number per plant (Table 6-3 b-f).

Nevertheless, these traits were more or less correlated depending on the interval between the years under consideration. The correlation coefficients decreased when the interval between the years increased for the canopy height and stem number per plant (Table 6-3 c, e). In contrast, the flowering date and stem diameter displayed consistent correlation coefficients between the years of cultivation (Table 6-3 b, d). Lastly, the coefficients were more variable for the aboveground plant volume index (Table 6-3 f).

All these inter-annual correlations observed in the winter harvest for the aboveground biomass production and its related traits were similar to those observed in the autumn harvest (See supplemental data: Table A 6-1, p 212). In addition, these correlations showed a certain predictive capability, which was assessed by a cross-validation: comparing the correlations obtained from one

block of the trial to the correlations of the two remaining blocks, a high consistency of the correlations was found between the two groups (See supplemental data: Table A 6-2, p 213).

These results indicate that the aboveground biomass production and its related traits observed in the sixth year, which is considered as an adult age of the crop, were better predicted from the third year than from the second year.

**Chapitre 6-1 - Early prediction of miscanthus biomass production and composition based on the first six years of cultivation**

**Table 6-3: Inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation in the winter harvest for the aboveground biomass production (a) and its related traits: the flowering date (b), canopy height (c), stem diameter (d), stem number per plant (e), and aboveground plant volume index (f) of 19 *Miscanthus* clones**

Pearson correlation coefficient		<b>Aboveground biomass production (t DM/ha)</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		0.88 *	0.78 *	0.72 *	0.69 *
	<b>Year 3</b>			0.87 *	0.81 *	0.76 *
	<b>Year 4</b>				0.90 *	0.85 *
a	<b>Year 5</b>					0.95 *

Pearson correlation coefficient		<b>Flowering date (DD base 10)</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		na	na	na	na
	<b>Year 3</b>			0.99 *	0.97 *	0.96 *
	<b>Year 4</b>				0.98 *	0.96 *
b	<b>Year 5</b>					0.94 *

Pearson correlation coefficient		<b>Canopy height (cm)</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		0.90 *	0.79 *	0.72 *	0.67 *
	<b>Year 3</b>			0.95 *	0.91 *	0.83 *
	<b>Year 4</b>				0.97 *	0.93 *
c	<b>Year 5</b>					0.93 *

Pearson correlation coefficient		<b>Stem diameter (mm)</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		0.94 *	0.95 *	0.94 *	0.93 *
	<b>Year 3</b>			0.93 *	0.93 *	0.95 *
	<b>Year 4</b>				0.93 *	0.94 *
d	<b>Year 5</b>					0.96 *

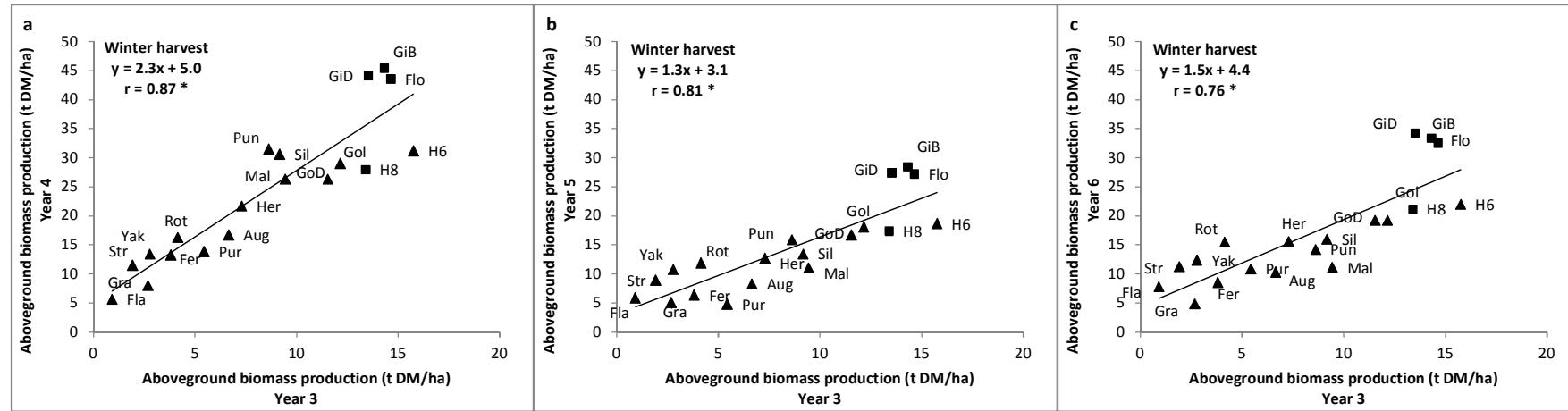
Pearson correlation coefficient		<b>Stem number per plant</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		0.84 *	0.68 *	0.59 *	na
	<b>Year 3</b>			0.92 *	0.86 *	na
	<b>Year 4</b>				0.89 *	na
e	<b>Year 5</b>					na

Pearson correlation coefficient		<b>Aboveground plant volume index (cm<sup>3</sup>)</b> (19 clones)				
		<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
	<b>Year 2</b>		0.80 *	0.70 *	0.65 *	na
	<b>Year 3</b>			0.79 *	0.88 *	na
	<b>Year 4</b>				0.67 *	na
f	<b>Year 5</b>					na

na: Data not available

\* Significant correlations at the 0.05 probability level



**Figure 6-2: Contribution of the individual *Miscanthus* clones to the inter-annual correlations between the third and fourth years of cultivation (a), the third and fifth years (b), and the third and sixth years (c) for the aboveground biomass production in the winter harvest**

A total of 19 *Miscanthus* clones were used for these plots: the filled squares represent the *M. x giganteus* clones, and the filled triangles represent the *M. sinensis* clones.

For details on the clones, see Table 6-1

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

r, Pearson correlation coefficient

### **6.3.3 The aboveground biomass production and its related traits were highly correlated between the autumn and the winter harvests, particularly from the third year of growth**

The aboveground biomass production and its related traits were significantly correlated between the autumn and winter harvests, with correlation coefficients ranging from 0.52 to 0.99 (Table 6-4 a-f). The stem diameter and flowering date generally displayed the highest correlation coefficients between the harvest dates; the coefficients varied from 0.84 to 0.99. These traits were followed by the canopy height, aboveground biomass production, aboveground plant volume index, and stem number per plant (Table 6-4 a-f).

The correlation coefficients between the second and other years were generally lower than those from the third year (Table 6-4 a-f).

These results indicate that the aboveground biomass production and its related traits were well correlated between the autumn and winter harvests, especially from the third year of growth.

**Table 6-4: Correlations between the two harvest dates, i.e., the autumn and winter harvest within and between the second, third, fourth, fifth, and sixth year of cultivation for the traits related to the aboveground biomass production from 19 *Miscanthus* clones: (a) aboveground biomass production, (b) flowering date, (c) canopy height, (d) stem diameter, (e) stem number per plant, and (f) aboveground plant volume index**

		Aboveground biomass production (t DM/ha) (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	0.78 *	0.80 *	0.77 *	0.72 *	0.74 *
	Year 3	0.77 *	0.82 *	0.81 *	0.76 *	0.76 *
	Year 4	0.68 *	0.79 *	0.84 *	0.82 *	0.80 *
	Year 5	0.68 *	0.85 *	0.92 *	0.91 *	0.87 *
	Year 6	0.63 *	0.84 *	0.92 *	0.90 *	0.89 *
a		Flowering date (DD base 10) (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	na	na	na	na	na
	Year 3	0.90 *	0.96 *	0.98 *	0.96 *	0.88 *
	Year 4	0.91 *	0.96 *	0.99 *	0.97 *	0.90 *
	Year 5	0.90 *	0.96 *	0.97 *	0.97 *	0.88 *
	Year 6	0.87 *	0.94 *	0.95 *	0.94 *	0.87 *
b		Canopy height (cm) (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	0.83 *	0.85 *	0.78 *	0.70 *	0.72 *
	Year 3	0.82 *	0.96 *	0.93 *	0.88 *	0.89 *
	Year 4	0.73 *	0.95 *	0.97 *	0.96 *	0.95 *
	Year 5	0.67 *	0.92 *	0.97 *	0.98 *	0.96 *
	Year 6	0.63 *	0.88 *	0.93 *	0.95 *	0.94 *
c		Stem diameter (mm) (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	na	0.91 *	0.84 *	0.92 *	0.93 *
	Year 3	na	0.93 *	0.91 *	0.95 *	0.95 *
	Year 4	na	0.91 *	0.86 *	0.93 *	0.94 *
	Year 5	na	0.95 *	0.90 *	0.95 *	0.95 *
	Year 6	na	0.94 *	0.92 *	0.97 *	0.97 *
d		Stem number per plant (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	0.71 *	0.64 *	0.57 *	0.52 *	na
	Year 3	0.76 *	0.86 *	0.86 *	0.83 *	na
	Year 4	0.75 *	0.85 *	0.91 *	0.86 *	na
	Year 5	0.67 *	0.83 *	0.92 *	0.92 *	na
	Year 6	na	na	na	na	na
e		Aboveground plant volume index (cm <sup>3</sup> ) (19 clones)				
		Autumn harvest				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Winter harvest	Year 2	na	0.73 *	0.57 *	0.70 *	na
	Year 3	na	0.85 *	0.80 *	0.90 *	na
	Year 4	na	0.75 *	0.64 *	0.73 *	na
	Year 5	na	0.73 *	0.77 *	0.87 *	na
	Year 6	na	na	na	na	na
f						

na: Data not available

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

### **6.3.4 The canopy height and aboveground plant volume index were the most reliable predictors of the adult aboveground biomass production, especially from the third year**

The aboveground biomass production was highly and positively correlated with the flowering date, canopy height, stem diameter, and aboveground plant volume index, with correlation coefficients varying from 0.52 to 0.94 in the winter harvest (Table 6-5). In contrast, the correlations between the aboveground biomass production and the stem number per plant were non-significant or weakly negative (Table 6-5). Nevertheless, the values of these coefficients varied over time: the correlations of the aboveground biomass production with the canopy height and aboveground plant volume index decreased from the second to the sixth year. In contrast, the correlations with the flowering date and stem diameter increased (Table 6-5).

**Table 6-5: Correlations between the aboveground biomass production (predicted variable) of the second, third, fourth, fifth and sixth years of cultivation using the following predictors: the flowering date, canopy height, stem diameter, stem number, and aboveground plant volume index using untransformed and log-transformation data observed in the second, third, and fourth years of cultivation; these correlations were performed using 19 *Miscanthus* clones observed during the winter harvest**

Predictor	Year	Predicted variable: aboveground biomass production				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
<b>Flowering date</b>	<b>Year 2</b>	na	na	na	na	na
	<b>Year 3</b>		0.52 *	0.71 *	0.78 *	0.77 *
	<b>Year 4</b>			0.75 *	0.79 *	0.79 *
<b>Canopy height</b>	<b>Year 2</b>	0.91 *	0.90 *	0.79 *	0.76 *	0.70 *
	<b>Year 3</b>		0.87 *	0.82 *	0.89 *	0.86 *
	<b>Year 4</b>			0.84 *	0.94 *	0.93 *
<b>Stem diameter</b>	<b>Year 2</b>	0.72 *	0.72 *	0.74 *	0.81 *	0.77 *
	<b>Year 3</b>		0.64 *	0.72 *	0.84 *	0.83 *
	<b>Year 4</b>			0.75 *	0.86 *	0.83 *
<b>Stem number per plant</b>	<b>Year 2</b>	ns	ns	ns	ns	ns
	<b>Year 3</b>		ns	ns	ns	ns
	<b>Year 4</b>			ns	- 0.33 *	- 0.32 *
<b>Aboveground plant volume index</b>	<b>Year 2</b>	0.90 *	0.83 *	0.82 *	0.75 *	0.68 *
	<b>Year 3</b>		0.77 *	0.85 *	0.91 *	0.90 *
	<b>Year 4</b>			0.78 *	0.85 *	0.78 *
<b>Log (Aboveground plant volume index)<sup>†</sup></b>	<b>Year 2</b>	0.95 *	0.92 *	0.86 *	0.72 *	0.63 *
	<b>Year 3</b>		0.90 *	0.91 *	0.86 *	0.83 *
	<b>Year 4</b>			0.83 *	0.90 *	0.82 *

<sup>†</sup> The correlations were calculated using the log (aboveground biomass production)

na: Data not available

ns: Not significant at the 0.05 probability level

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

As the aboveground biomass production was highly correlated with the canopy height and aboveground plant volume index, they appeared to be the best predictors of the aboveground biomass production (Table 6-5). Nevertheless, the log (aboveground plant volume index) increased the correlation coefficients with the aboveground biomass production mainly during the first years (Figure 6-3 a-h). Therefore, the canopy height and the log (aboveground plant volume index) were the best predictors of the aboveground biomass production.

The correlations between these two best predictors and the aboveground biomass produced from the second to the sixth year were higher for the predictors in the third and fourth years compared with the second year (Table 6-5). The aboveground biomass produced in the second to the fourth year was slightly more correlated with the log (aboveground plant volume index) than with the canopy height observed in the second or third year (Table 6-5). The correlations between the canopy height and the aboveground biomass produced in the fifth and sixth years were slightly higher than the log (aboveground plant volume index) (Table 6-5).

Similar trends were observed in the autumn harvest (See supplemental data, Table A 6-3, p 214).

(Following page)

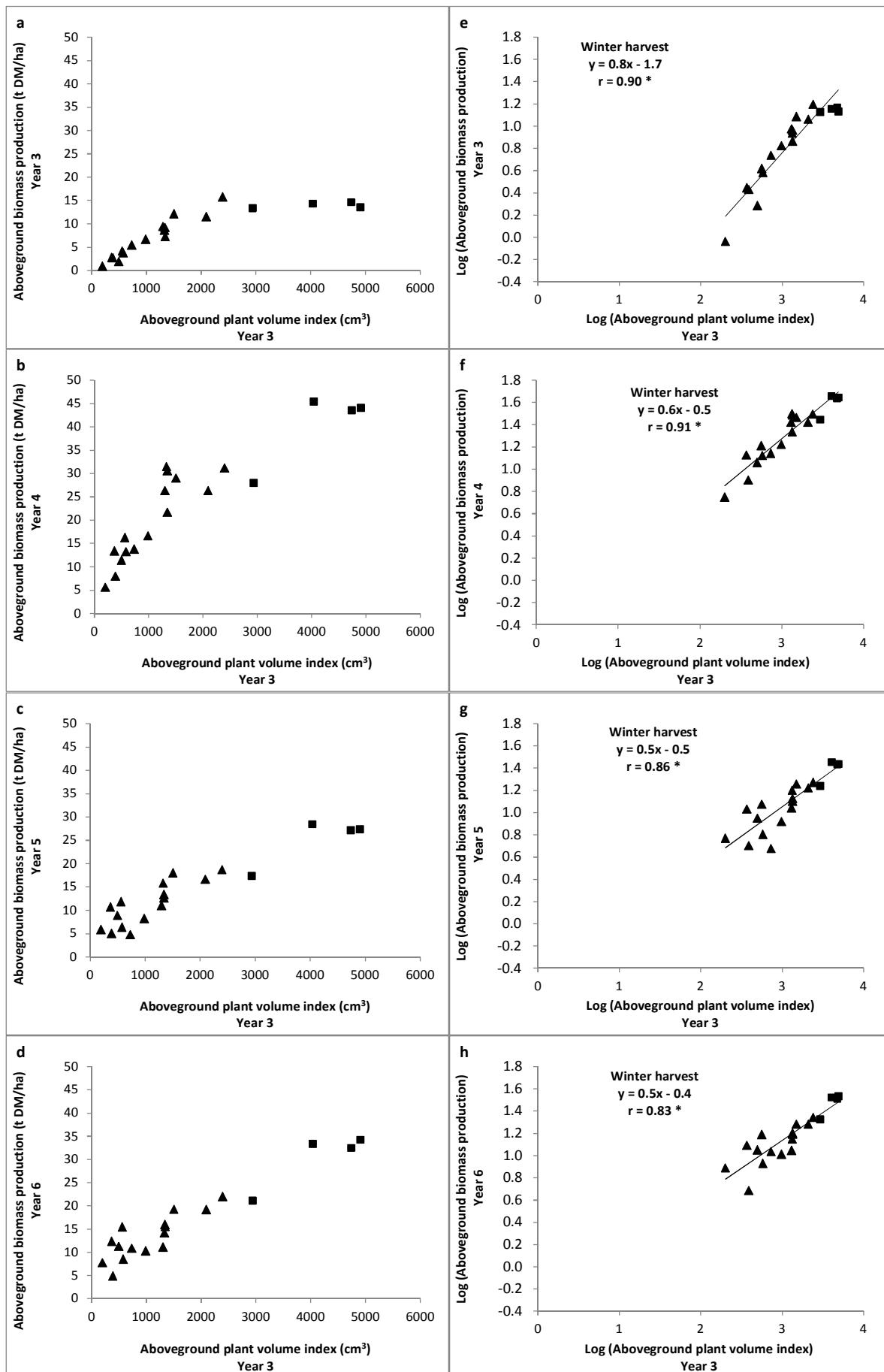
**Figure 6-3: Pairwise plots of traits between the aboveground biomass production of the third, fourth, fifth, and sixth years and the aboveground plant volume index of the third year for untransformed (a, b, c, d) and log-transformed (e, f, g, h) data; data collected in the winter harvest**

A total of 19 *Miscanthus* clones were used for these plots: the filled squares represent the *M. x giganteus* clones, and the filled triangles represent the *M. sinensis* clones. For details on the clones, see Table 6-1.

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

r, Pearson correlation coefficient

**Chapitre 6-1 - Early prediction of miscanthus biomass production and composition based on the first six years of cultivation**



### 6.3.5 The biomass composition-related traits displayed lower and more variable inter-annual correlation coefficients than the aboveground biomass production-related traits

The correlation coefficients between the years of cultivation were positive and significant for all the biomass composition traits in the winter harvest (Table 6-6 a-e). However, the correlation coefficients ranged from 0.38 to 0.85 and were generally lower than those obtained for the aboveground biomass production and its related traits.

The cellulose, hemicellulose, and lignin contents in the aboveground biomass displayed generally high inter-annual correlation coefficients, with values ranging from 0.69 to 0.85 (Table 6-6 a-c). In contrast, the correlations were lower for the soluble and ash contents (Table 6-6 d-e).

For a given trait, these coefficients varied among the years. They were low in some years: it was the case for the cellulose content measured between the third and the fifth years (Table 6-6 a) and for the lignin content measured between the fifth and fourth years (Table 6-6 c). Similarly, the ash content even displayed low correlation coefficients, especially between the third and the fifth years and between the fourth and the fifth years (Table 6-6 e).

Same trends were observed in the autumn harvest (See supplemental data, Table A 6-4 a-e, p 215).

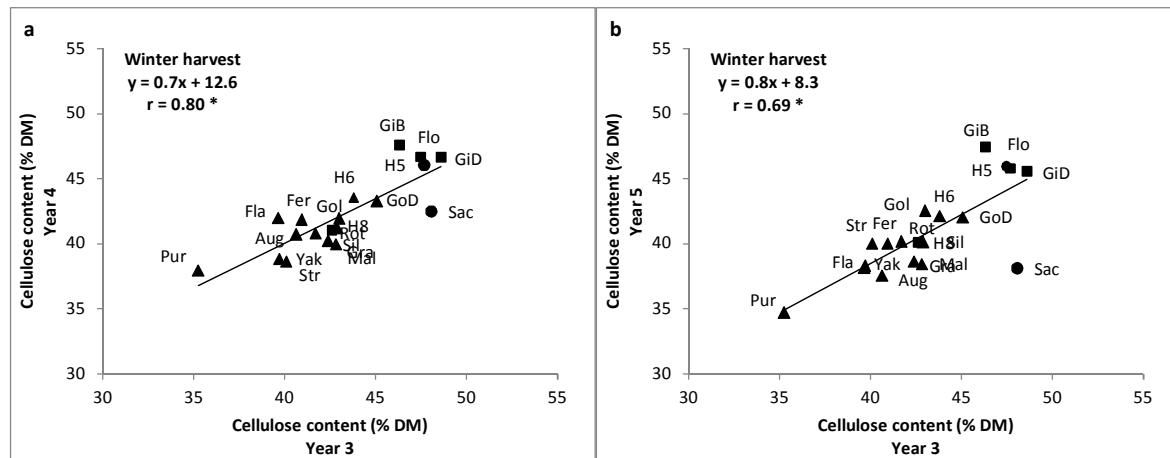
**Table 6-6: Inter-annual correlations among the third, fourth, and fifth years of cultivation in the winter harvest for the traits related to the biomass composition from 19 *Miscanthus* clones: (a) the cellulose, (b) hemicellulose, (c) lignin, (d) soluble and (e) ash contents**

Pearson correlation coefficient	Cellulose (% DM) (19 clones)			Pearson correlation coefficient	Hemicelluloses (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5		Year 3	Year 4	Year 5
a	Year 3	0.80 *	0.69 *	Year 3	0.83 *	0.83 *	
	Year 4		0.85 *	Year 4		0.82 *	
Lignins (% DM) (19 clones)			Solubles (% DM) (19 clones)				
Pearson correlation coefficient	Year 3	Year 4	Year 5	Pearson correlation coefficient	Year 3	Year 4	Year 5
c	Year 3	0.83 *	0.82 *	Year 3	0.61 *	0.50 *	
	Year 4		0.74 *	Year 4		0.68 *	
Ash (% DM) (19 clones)							
Pearson correlation coefficient	Year 3	Year 4	Year 5				
e	Year 3	0.73 *	0.38 *				
	Year 4		0.47 *				

na: Data not available

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

Despite these low correlations, the most productive clones were consistently ranked throughout the years with respect to the cellulose, hemicellulose and lignin contents (Figure 6-4 for cellulose content).



**Figure 6-4: Contribution of the individual *Miscanthus* clones to the inter-annual correlations between the third and fourth years of cultivation (a), and the third and fifth years of cultivation (b) for the cellulose content observed in the winter harvest**

A total of 19 *Miscanthus* clones were used for these plots: the filled squares represent the *M. x giganteus* clones, the filled circles represent the *M. sacchariflorus* clones, and the filled triangles represent the *M. sinensis* clones. For details on the clones, see Table 6-1

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

r, Pearson correlation coefficient

## 6.4 Discussion

This study of the prediction of the traits related to *Miscanthus* biomass production and composition in the young growth stages of the crop partially addressed our hypotheses. (i) The traits related to the biomass production were predicted with robustness in the early growth stages of the crop, but the traits related to the biomass composition were not well predicted. Moreover, (ii) the canopy height and the log (aboveground plant volume index) were reliable predictors of the biomass production.

We therefore discuss two main points directly related to our results: (i) the potential to predict *Miscanthus* biomass production and its related traits from the young stages of the crop, (ii) the traits that are reliable predictors of the biomass production, and (iii) the significance of our results for the early selection of promising *Miscanthus* clones as feedstock for 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production.

#### **6.4.1 The potential to predict biomass production and its related traits in *Miscanthus* from the young stages of the crop**

Clifton-Brown et al. (2001b) reported that the third year-biomass production of 15 *Miscanthus* clones at five sites in Europe was better correlated with the second-year biomass production than with the biomass produced in the first year. In addition, Clifton-Brown and Lewandowski (2002) studied the same clones in southern Germany for the first three years of cultivation with autumn and winter harvests and reported that the biomass production in the first year was not always related to the biomass produced in subsequent years. These authors concluded that the selection of *Miscanthus* clones showing optimal biomass production should be based on at least two years of field trials. Our results agree with these observations.

Similar trends have been described in the literature for the traits related to the biomass production, particularly for the plant height and number of stems per plant. A moderate regression coefficient ( $r = 0.67$ ) was observed between *Miscanthus* height in the first and third year of cultivation (Clifton-Brown and Lewandowski, 2002). In addition, these authors showed that the shoot density measured at the end of the first growing season, which could be associated with our measure of the stem number per plant, was poorly correlated with the shoot density measured at the end of the third growing season. We studied an extended time period, *i.e.*, longer than the three first years, and found lower correlations between traits measured in the second year compared with subsequent years. These results suggest that the plant height and stem number per plant were predicted with more reliability from the third year of cultivation than from the first two years.

In addition, our results indicated that the stem diameter consistently displayed high correlation coefficients between the second to the sixth year, which was similar to the results reported for poplar, a woody perennial crop of particular interest for the 2<sup>nd</sup>-generation bioethanol production (Kaczmarek et al., 2013). Furthermore, the aboveground plant volume index was well correlated between years, which is similar to the results reported for poplar using a comparable index (Kaczmarek et al., 2013).

#### **6.4.2 Easy-to-measure traits that are related to the biomass production and an index combining several of these traits were reliable predictors of the biomass production**

Jezowski (2008) reported that the biomass production of 6 *Miscanthus* clones harvested in winter was highly correlated with the canopy height in the second and third years of cultivation. In addition, Clifton-Brown et al. (2001b) showed that the height of 15 *Miscanthus* clones was well correlated with

the biomass harvested in autumn of the third year. Gauder et al. (2012) reported that the plant height at senescence was a reliable parameter to estimate the biomass harvested in winter. Furthermore, Robson et al. (2013) observed that the canopy height of 244 *Miscanthus* clones was better correlated with the biomass harvested in winter of the third year than the stem diameter or the maximum canopy height. Our results verified these observations and confirmed that the canopy height was generally better correlated with the biomass production than other morphological traits.

Clifton-Brown et al. (2001b) reported that the shoot density, which is similar to our measurement of the number of stems per plant, was poorly correlated with the aboveground biomass harvested in autumn of the third year. In contrast, Gauder et al. (2012) reported a relatively high and negative correlation between the yield and the shoot density in a study carried out on 14 consecutive years. Our results agree with both studies; there were no correlations between the second- and third-year data, whereas we observed negative correlations in the fourth year irrespective of the harvest dates. These results showed that the correlation between the stem number and the biomass production increased over time and suggested that the stem number did not contribute to the yield during the early growth stages compared with the later stages. Moreover, the contribution of the stem number to the biomass production could be compensated by other variables such as the height of the plants and the stem diameter. With a similar height of the plants between all the genotypes, it would be expected a better contribution of the stem number.

In addition, Zub et al. (2012b) reported that the aboveground plant volume index of *Miscanthus* was a reliable predictor of the biomass produced in the second and third years. Our results confirmed these findings over a longer time period (from the second to the sixth year). However, we showed that the aboveground plant volume index was a less reliable predictor of the biomass produced in the fifth and sixth years, compared to the canopy height. This may be due to the difficulty to determine the stem number per plant for older plants in comparison to younger plants. Therefore, we can suggest that this decreased the aboveground plant volume index reliability to predict the biomass production of older *Miscanthus* crops.

In a poplar study, Rae et al. (2004) found that the stem volume index was the best predictor of the biomass production, followed by the total basal area and the tree height at harvest, which were used to calculate the stem volume index. In addition, Scaracia-Mugnozza et al. (1997) reported that the stem volume growth of poplar well reflected the increase in tree biomass. These observations confirmed our *Miscanthus* results.

### 6.4.3 Breeding implications for the early selection of interesting *Miscanthus* clones

Selecting clones based on the aboveground biomass produced in the first and second years would be less effective than a selection based on the third year data; however, an initial screening of the most productive *Miscanthus* clones from the first and second years could be feasible because Clifton-Brown and Lewandowski (2002) showed that the most productive *Miscanthus* clones identified in the first year were generally also the most productive in the subsequent years. However, our results showed that the screening has to be continued for at least three years.

Because of the high correlations between the two harvest dates, the clone selection can be performed using a single harvest date. Under the tested conditions, this would allow the autumn harvest to be selected indirectly from the winter harvest, which is the most common practice.

In addition, the canopy height and the aboveground volume index were useful criteria to make an early selection of the most productive *Miscanthus* clones. Given the very small differences in predictive power between these two predictors, breeders should use the canopy height to accurately identify the most productive clones as it is an easy-to-measure trait. Nevertheless, we explored here a great variability regarding the height of the plants in comparison to the other traits. For a lower variability, it should be expected a greater impact of the stem number as found in switchgrass (Price and Casler, 2014). This would lead to a superiority of the aboveground plant volume index to predict the subsequent years of production in comparison to the plant height and this would require a better assessment of the stem number per plant. This is particularly interesting as the canopy height and aboveground plant volume index were non-destructive measurements.

Furthermore, the prediction of the traits related to the biomass composition was less reliable when using the first years of cultivation in comparison with the aboveground biomass production-related traits under the tested conditions. However, an initial screening can be attempted during the first few years among the most productive clones with respect to the cellulose, hemicellulose, and lignin contents because we observed that the contribution of the most productive clones were consistent over time.

## 6.5 Conclusions

This study investigated the possibility of early prediction of the traits related to *Miscanthus* biomass production and composition on a single site testing.

The biomass production and its related traits, more particularly, the stem diameter, flowering date, and canopy height, displayed high correlations between the years. These traits were better predicted from the third year of cultivation than from the second year. Moreover, the correlations between the two harvest dates were high. Therefore, to early select these traits in *Miscanthus* in the first few years of cultivation, it is more reliable to screen the genotypes for at least three years and it is possible to limit the evaluation to a single harvest date.

In addition, the biomass produced in the first years (*i.e.*, the second to fourth year) was reliably predicted using the log (aboveground plant volume index) of the second and third years; however, the biomass produced in later years (*i.e.*, in the fifth and sixth years) was better predicted using the canopy height of the second and third year.

Additionally, a first screening of the cellulose, hemicellulose and lignin contents can be attempted among the most productive genotypes during the early stages of the crop as the most productive clones were consistently ranked throughout the years with respect to these variables.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the FUTUROL project funded by Oseo, which supported this study. Particular thanks to Benoit Decaux and the staff of the UE GCIE for their valuable help in the records, harvests, and maintenance of the trial. Thanks to Yves Barrière, Jacques Le Gouis, and François-Xavier Oury for their valuable recommendations during the preparation of this text.

## References

- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of Miscanthus. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.-M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., and Mary, B. 2014.** Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6:425-438.
- Clifton-Brown, J., Long, S.P., and Jorgensen, U. 2001a.** Miscanthus productivity, in: Jones, M., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 46-67.
- Clifton-Brown, J.C., Chiang, Y.C., and Hodkinson, T.R. 2008.** Miscanthus: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production., in: Vermeris, W. (Ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, USA, pp. 273-294.
- Clifton-Brown, J.C., and Lewandowski, I. 2002.** Screening Miscanthus genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* 16:97-110.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Feng, X.P., Lourvant, K., Castric, V., Saumitou-Laprade, P., Zheng, B.S., Jiang, D., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** The Discovery of Natural Miscanthus Accessions Related to Miscanthus x giganteus Using Chloroplast DNA. *Crop Science* 54:1645-1655.
- Gauder, M., Graeff-Hönniger, S., Lewandowski, I., and Claupein, W. 2012.** Long-term yield and performance of 15 different Miscanthus genotypes in southwest Germany. *Annals of Applied Biology* 160:126-136.
- Jensen, E., Robson, P., Norris, J., Cookson, A., Farrar, K., Donnison, I., and Clifton-Brown, J. 2013.** Flowering induction in the bioenergy grass *Miscanthus sacchariflorus* is a quantitative short-day response, whilst delayed flowering under long days increases biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany* 64:541-552.
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of Miscanthus in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Jezowski, S., Glowacka, K., and Kaczmarek, Z. 2011.** Variation on biomass yield and morphological traits of energy grasses from the genus *Miscanthus* during the first years of crop establishment. *Biomass & Bioenergy* 35:814-821.
- Kaczmarek, D.J., Coyle, D.R., and Coleman, M.D. 2013.** Survival and growth of a range of *Populus* clones in central South Carolina USA through age ten: Do early assessments reflect longer-term survival and growth trends? *Biomass and Bioenergy* 49:260-272.
- Larsen, S., Jørgensen, U., Kjeldsen, J., and Lærke, P. 2014.** Long-Term Miscanthus Yields Influenced by Location, Genotype, Row Distance, Fertilization and Harvest Season. *Bioenergy Research* 7:620-635.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- Lewandowski, I., and Kicherer, A. 1997.** Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *European Journal of Agronomy* 6:163-177.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., and Christou, M. 2003b.** The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass & Bioenergy* 25:335-361.

- Miguez, F.E., Villamil, M.B., Long, S.P., and Bollero, G.A. 2008.** Meta-analysis of the effects of management factors on *Miscanthus x giganteus* growth and biomass production. Agricultural and Forest Meteorology 148:1280-1292.
- Price, D.L., and Casler, M.D. 2014.** Predictive Relationships between Plant Morphological Traits and Biomass Yield in Switchgrass. Crop Science 54:637-645.
- Qin, J., Yang, Y., Jiang, J., Yi, Z., Xiao, L., Ai, X., and Chen, Z. 2012.** Comparison of lignocellulose composition in four major species of *Miscanthus*. African Journal of Biotechnology 11:12529-12537.
- Rae, A.M., Robinson, K.M., Street, N.R., and Taylor, G. 2004.** Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere 34:1488-1498.
- Robson, P., Jensen, E., Hawkins, S., White, S.R., Kenobi, K., Clifton-Brown, J., Donnison, I., and Farrar, K. 2013.** Accelerating the domestication of a bioenergy crop: identifying and modelling morphological targets for sustainable yield increase in *Miscanthus*. Journal of Experimental Botany 64:4143-4155.
- SAS Institute Inc. 2000.** SAS user's guide: statistics. Cary, NC, USA.
- Scaracia-Mugnozza, G.E., Ceulemans, R., Heilman, P.E., Isebrands, J.G., Stettler, R.F., and Hinckley, T.M. 1997.** Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. II. Biomass components and harvest index of hybrid and parental species clones. Canadian Journal of Forest Research 27:285-294.
- van der Weijde, T., Kamei, C.L.A., Torres, A.F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R.G.F., and Trindade, L.M. 2013.** The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. Frontiers in Plant Science 4.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. Journal - Association of Official Analytical Chemists 50:50-55.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different *Miscanthus* species at two harvest dates. Biomass & Bioenergy 35:637-651.
- Zub, H.W., and Brancourt-Hulmel, M. 2010.** Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. Agronomy for Sustainable Development 30:201-214.
- Zub, H.W., Monod, H., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012b.** An Index of Competition Reduces Statistical Variability and Improves Comparisons between Genotypes of *Miscanthus*. Bioenergy Research 5:829-840.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012c.** Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones. Bioenergy Research 5:841-854.

**Table A 6-1: Inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation in the autumn harvest for the aboveground biomass production (a) and its related traits: the flowering date (b), canopy height (c), stem diameter (d), stem number per plant (e), and aboveground plant volume index (f) of 19 *Miscanthus* clones**

Pearson correlation coefficient	<b>Aboveground biomass production (t DM/ha)</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	0.79 *	0.80 *	0.82 *	0.79 *	
<b>Year 3</b>		0.93 *	0.91 *	0.87 *	
<b>Year 4</b>			0.96 *	0.90 *	
<b>a Year 5</b>				0.90 *	

Pearson correlation coefficient	<b>Flowering date (DD base 10)</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	0.88 *	0.91 *	0.89 *	0.82 *	
<b>Year 3</b>		0.95 *	0.95 *	0.91 *	
<b>Year 4</b>			0.97 *	0.88 *	
<b>b Year 5</b>				0.88 *	

Pearson correlation coefficient	<b>Canopy height (cm)</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	0.82 *	0.73 *	0.64 *	0.67 *	
<b>Year 3</b>		0.97 *	0.93 *	0.93 *	
<b>Year 4</b>			0.98 *	0.97 *	
<b>c Year 5</b>				0.96 *	

Pearson correlation coefficient	<b>Stem diameter (mm)</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	na	na	na	na	
<b>Year 3</b>		0.91 *	0.96 *	0.94 *	
<b>Year 4</b>			0.93 *	0.93 *	
<b>d Year 5</b>				0.96 *	

Pearson correlation coefficient	<b>Stem number per plant</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	0.87 *	0.67 *	0.52 *	na	
<b>Year 3</b>		0.88 *	0.79 *	na	
<b>Year 4</b>			0.93 *	na	
<b>e Year 5</b>				na	

Pearson correlation coefficient	<b>Aboveground plant volume index (cm<sup>3</sup>)</b> (19 clones)				
	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>	<b>Year 4</b>	<b>Year 5</b>	<b>Year 6</b>
<b>Year 2</b>	na	na	na	na	
<b>Year 3</b>		0.80 *	0.91 *	na	
<b>Year 4</b>			0.83 *	na	
<b>f Year 5</b>				na	

na: Data not available

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

**Chapitre 6-1** - Early prediction of miscanthus biomass production and composition  
based on the first six years of cultivation

**Table A 6-2: Predictive capability assessed by a cross-validation, which compared the means of the blocks 1 and 3 of the trial (a) and the values of the block 2 of the trial (b): inter-annual correlations among the second, third, fourth, fifth, and sixth years of cultivation for the aboveground biomass production of 19 *Miscanthus* clones**

Pearson correlation coefficient	Aboveground biomass production (t DM/ha) (19 clones)				
	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
<b>Year 2</b>	0.84 *	0.84 *	0.81 *	0.80 *	
	0.94 *	0.82 *	0.82 *	0.81 *	
<b>Year 3</b>		0.95 *	0.93 *	0.92 *	
		0.88 *	0.83 *	0.77 *	
<b>Year 4</b>			0.98 *	0.92 *	
			0.92 *	0.83 *	
<b>Year 5</b>				0.91 *	
a				0.97 *	
Pearson correlation coefficient	Aboveground biomass production (t DM/ha) (19 clones)				
	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
<b>Year 2</b>	0.81 *	0.80 *	0.86 *	0.84 *	
	0.87 *	0.79 *	0.74 *	0.68 *	
<b>Year 3</b>		0.96 *	0.96 *	0.91 *	
		0.93 *	0.90 *	0.89 *	
<b>Year 4</b>			0.95 *	0.89 *	
			0.97 *	0.94 *	
<b>Year 5</b>				0.92 *	
b				0.96 *	

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

For each trait and each year, the top number (in grey) corresponded to the autumn harvest; the bottom number (in black) corresponded to the winter harvest

The correlations obtained on one block were compared to the correlations obtained on the two remaining blocks (due to the unbalanced data, these two remaining blocks were averaged)

**Table A 6-3: Correlations between the aboveground biomass production (predicted variable) of the second, third, fourth, fifth and sixth years of cultivation using the following predictors: the flowering date, canopy height, stem diameter, stem number, and aboveground plant volume index using untransformed and log-transformation data observed in the second, third, and fourth years of cultivation; these correlations were performed using 19 *Miscanthus* clones observed during autumn harvest**

Predictor	Year	Predicted variable: aboveground biomass production				
		Year 2	Year 3	Year 4	Year 5	Year 6
Flowering date	Year 2	0.44 *	0.70 *	0.77 *	0.76 *	0.74 *
	Year 3		0.58 *	0.74 *	0.74 *	0.69 *
	Year 4			0.79 *	0.78 *	0.73 *
Canopy height	Year 2	0.90 *	0.83 *	0.79 *	0.80 *	0.75 *
	Year 3		0.93 *	0.92 *	0.91 *	0.88 *
	Year 4			0.93 *	0.93 *	0.88 *
Stem diameter	Year 2	na	na	na	na	na
	Year 3		0.81 *	0.86 *	0.89 *	0.82 *
	Year 4			0.78 *	0.79 *	0.71 *
Stem number per plant	Year 2	ns	ns	ns	ns	ns
	Year 3		ns	ns	ns	ns
	Year 4			- 0.31 *	- 0.35 *	- 0.28 *
Aboveground plant volume index	Year 2	na	na	na	na	na
	Year 3		0.88 *	0.88 *	0.89 *	0.85 *
	Year 4			0.76 *	0.71 *	0.68 *
Log (Aboveground plant volume index) <sup>†</sup>	Year 2	na	na	na	na	na
	Year 3		0.94 *	0.92 *	0.90 *	0.85 *
	Year 4			0.79 *	0.79 *	0.64 *

† The correlations were calculated using the log (aboveground biomass production)

na: Data not available

ns: Not significant at the 0.05 probability level

\* Significant correlations at the 0.05 probability level

**Chapitre 6-1** - Early prediction of miscanthus biomass production and composition based on the first six years of cultivation

**Table A 6-4: Inter-annual correlations among the third, fourth, and fifth years of cultivation in the autumn harvest for the traits related to the biomass composition from 19 *Miscanthus* clones: (a) the cellulose, (b) hemicellulose, (c) lignin, (d) soluble and (e) ash contents**

Pearson correlation coefficient	Cellulose (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5
<b>Year 3</b>		0.75 *	0.72 *
<b>a Year 4</b>		0.63 *	
Pearson correlation coefficient	Hemicelluloses (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5
<b>Year 3</b>		0.78 *	0.67 *
<b>b Year 4</b>		0.63 *	
Pearson correlation coefficient	Lignins (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5
<b>Year 3</b>		0.90 *	0.90 *
<b>c Year 4</b>		0.85 *	
Pearson correlation coefficient	Solubles (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5
<b>Year 3</b>		0.72 *	0.57 *
<b>d Year 4</b>		0.37 *	
Pearson correlation coefficient	Ash (% DM) (19 clones)		
	Year 3	Year 4	Year 5
<b>Year 3</b>		0.87 *	0.75 *
<b>e Year 4</b>		0.72 *	

\* Significant correlations at the 0.05 probability level



## **Chapitre 6-2**

**Mise au point d'équations de prédiction  
par spectroscopie proche infra-rouge  
pour évaluer la composition de la biomasse  
chez le miscanthus**



## **6.1 Introduction**

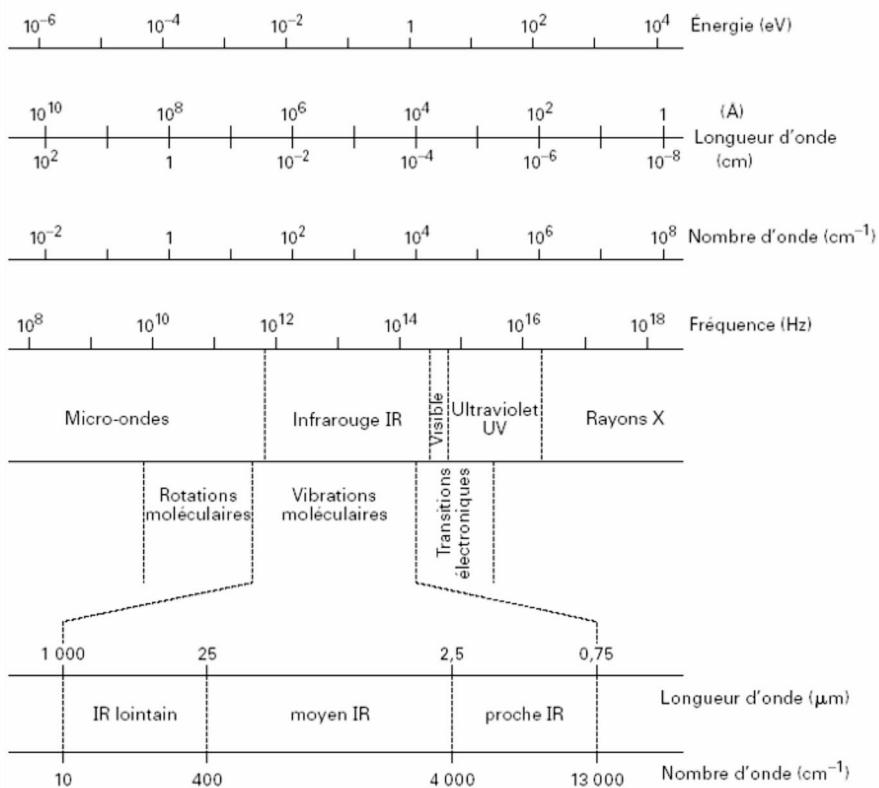
Depuis ces dernières années, le miscanthus suscite un intérêt particulier en tant que culture candidate pour la production de bioénergies, et plus particulièrement, de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération (Cf Chapitre 2). Il est notamment reconnu pour sa forte production de biomasse et ses faibles impacts environnementaux (Cf Chapitre 1). Cependant, la composition de sa biomasse doit également être prise en compte pour ce débouché car la composition et la digestibilité de la paroi végétale influencent le procédé de conversion de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. La présence de lignine contribue notamment à réduire l'efficacité des étapes de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique (Boudet et al., 2003; Klimiuk et al., 2010; Monlau et al., 2013). L'amélioration de la conversion de la biomasse constitue donc aujourd'hui un enjeu majeur pour optimiser l'efficacité de la production du bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération (Liu et al., 2013).

Dans ce cadre, différentes études se penchent sur la composition de la biomasse de cette culture (Hodgson et al., 2010b; Allison et al., 2011; Zhao et al., 2013). Des techniques pratiques et rapides telle que la Spectroscopie Proche Infra-Rouge (SPIR), NIRS en anglais pour Near Infra-Red Spectroscopy, ont été mises au point. Elles sont essentielles pour évaluer la composition chimique de la biomasse dans l'objectif de sélectionner des espèces et variétés de miscanthus adéquates en termes de composition pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

La SPIR permet d'estimer la teneur de très nombreux composés. Elle est ainsi utilisée dans le domaine industriel (chimie, pharmacie, agro-industrie) pour de nombreuses applications. Pour les produits agricoles, elle vise l'analyse de la valeur alimentaire des fourrages, les études de digestibilité ou encore l'analyse de la qualité des sous-produits de récolte (CIRAD).

C'est une technique de dosage indirect basée sur l'absorption des rayonnements infra-rouges par la matière organique, soit en transmission (mesure de la lumière traversant l'échantillon) soit en réflexion (mesure de la lumière réfléchie par l'échantillon). L'absorption variant selon la structure moléculaire de l'échantillon, il est possible d'en estimer la composition par la mesure de son absorption.

Le rayonnement électromagnétique est décomposé en différents domaines : le domaine des micro-ondes, le domaine de l'infra-rouge et du proche infra-rouge, le domaine du visible, le domaine de l'ultra-violet, et celui des rayons X. Le domaine du rayonnement proche infra-rouge correspond aux longueurs d'ondes directement supérieures à celles du domaine de la lumière visible, c'est à dire comprises entre 800 et 2500 nm, soit entre 13000 et 4000 cm<sup>-1</sup> si l'on parle en nombre d'ondes, cette grandeur étant proportionnelle au nombre d'oscillations qu'effectue une onde par une unité de longueur (Dalibart and Servant, 2000) (Figure 6-5).



**Figure 6-5 : Domaines spectraux du rayonnement électromagnétique** (d'après Dalibart and Servant (2000))

Chaque type de liaison chimique est capable d'absorber certaines longueurs d'ondes qui lui sont propres. Plus une liaison chimique est présente, plus l'absorption qui lui correspond est importante. C'est grâce à cette propriété qu'il est possible de mettre en relation l'absorption de la lumière avec la composition d'un échantillon.

Lors de l'analyse, l'échantillon est éclairé successivement par différentes longueurs d'onde et l'absorption recueillie pour chacune de ces longueurs d'onde constitue le spectre de l'échantillon. Un spectre peut être constitué de centaines de longueurs d'onde dont on a mesuré l'absorbance. Chaque spectre est caractéristique d'un échantillon et contient de nombreuses informations intrinsèques sur sa composition organique. La difficulté réside dans l'interprétation de ces spectres. Pour cette interprétation, on réalise une équation de régression linéaire permettant de mettre en relation les spectres avec les analyses chimiques réalisées sur les mêmes échantillons, c'est la phase de « calibration » (Figure 6-6). Chaque équation obtenue est spécifique d'un paramètre chimique pour une matière première donnée. Une fois que les équations ont été obtenues, il suffit de mesurer le spectre d'absorbance d'un échantillon pour déterminer directement sa composition chimique.

## Développer un modèle SPIR

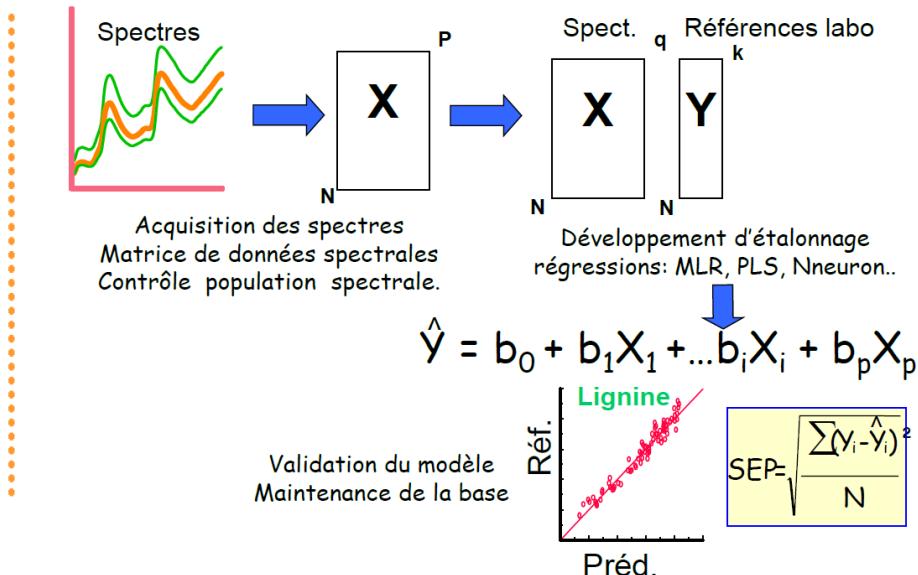


Figure 6-6 : Principales étapes de la mise au point d'une équation de calibration SPIR (CIRAD)

Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à l'analyse de composition chimique classique :

- Elle est plus rapide : quelques minutes suffisent à recueillir le spectre d'absorption contre plusieurs jours pour l'analyse chimique. Cet avantage est particulièrement appréciable lorsque l'on a un grand nombre d'échantillons à traiter.
- Elle est non destructive : cela permet de conserver l'échantillon pour des analyses ultérieures.
- Elle est peu coûteuse : quelques grammes suffisent pour réaliser les spectres et, une fois l'équipement disponible, le coût de passage d'un échantillon est très faible en comparaison aux analyses chimiques classiques.
- Elle est simple : une fois les équations de calibration réalisées, l'utilisation de l'appareil pour recueillir les spectres ne nécessite pas de connaissances techniques particulières hormis une familiarisation avec le logiciel associé à l'appareil.

En raison de ces avantages, cette technique a été largement utilisée pour évaluer la composition de la biomasse de nombreuses cultures (Sanderson et al., 1996; Cozzolino et al., 2001; Wolfrum et al., 2009; Sabatier et al., 2012), malgré quelques inconvénients (prédiction qui n'est pas parfaite et qui dépend des échantillons utilisés, du broyage, ou encore de l'appareil de mesure).

Ce n'est que récemment qu'elle est utilisée chez le miscanthus (Hodgson et al., 2010b; Allison et al., 2011; Hayes, 2012; Haffner et al., 2013; Liu et al., 2013).

L'utilisation de cette technique SPIR sur le miscanthus nécessite cependant une étape préalable de mise au point, avec notamment, l'établissement de courbes de calibration pour les constituants de la biomasse d'intérêt qui lui soient adaptées. En effet, des équations de calibration adaptées au miscanthus ont été mises au point et utilisées dans quelques études pour prédire différents constituants de la biomasse, mais ces équations n'ont pas été publiées (Allison et al., 2011; Hodgson et al., 2010b).

Il s'agit donc, au sein de ce chapitre, de mettre au point les équations de calibration spécifiques au miscanthus pour les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres de la biomasse, constituants d'intérêt pour la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération.

Pour ce faire, nous comparons les données de composition de biomasse obtenues par des analyses chimiques classiques et les mesures au spectromètre proche infra-rouge qui ont été réalisées sur 351 échantillons, c'est-à-dire sur les 21 clones étudiés dans ce travail pendant trois années de culture et selon deux dates de récolte. Nous avons précédemment montré que les constituants de la biomasse sont majoritairement influencés par la date de récolte (Cf Chapitre 4). Ainsi, nous allons mettre au point une équation de calibration pour chacune des deux dates de récolte individualisées, et ce, pour chacun des constituants de la biomasse étudiés (cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres).

La mise au point de ces courbes de calibration sur miscanthus nous permettra de disposer d'un outil de sélection rapide et robuste pour l'évaluation des potentialités de différents clones de miscanthus en termes de composition de biomasse et ce, dans l'objectif de sélection de clones adaptés à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

## 6.2 Matériel et méthodes

### 6.2.1 Site expérimental

Le site expérimental où est implanté l'essai se situe dans le Nord de la France, dans le département de la Somme (80), à l'INRA d'Estrées-Mons (49°53 N, 3°00 E). Le climat est océanique et le sol est homogène de type limon profond (Orthic Luvisol, FAO classification). Les caractéristiques climatiques de ce site pour les années d'étude sont présentées dans le chapitre 3.

## 6.2.2 Description du dispositif expérimental

### a. Matériel végétal

L'essai regroupe 21 clones de miscanthus répartis en 3 espèces (Table 6-7) :

- 4 clones appartenant à l'espèce *M. x giganteus*, dont le clone H8 que nous avons considéré comme de type *M. x giganteus* car c'est un hybride inter-spécifique entre *M. sacchariflorus* et *M. sinensis*, et le clone Flo, appartenant assurément à l'espèce *M. x giganteus*,
- 15 clones appartenant à l'espèce *M. sinensis* et,
- 2 clones appartenant à l'espèce *M. sacchariflorus*.

**Table 6-7 : Présentation des 21 clones de miscanthus utilisés dans l'essai incluant leur code, leur nom, leur espèce, leur niveau de ploïdie, et leur provenance**

Code	Nom du clone	Espèce	Niveau de ploïdie <sup>a</sup>	Provenance
H8 <sup>b</sup>	Hybride 8	<i>M. x giganteus</i>	2x	Université d'Aarhus, Danemark
Flo	<i>M. x giganteus</i> Floridulus <sup>c</sup>	<i>M. x giganteus</i>	3x	Chombart, France
GiB	<i>M. x giganteus</i> Britannique	<i>M. x giganteus</i>	3x	ADAS, Royaume-Uni
GiD	<i>M. x giganteus</i> Danois	<i>M. x giganteus</i>	4x	Nordic Biomass, Danemark
Aug	<i>M. sinensis</i> August Feder	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Fer	<i>M. sinensis</i> Ferner Osten	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Fla	<i>M. sinensis</i> Flamingo	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Gra	<i>M. sinensis</i> Graziella	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Her	<i>M. sinensis</i> Herman Müssel	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Mal	<i>M. sinensis</i> Malepartus	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Pun	<i>M. sinensis</i> Punktchen	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Pur	<i>M. sinensis</i> Purpurescence	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
Rot	<i>M. sinensis</i> Rotsilber	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Sil	<i>M. sinensis</i> Silberspinne	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Str	<i>M. sinensis</i> Strictus	<i>M. sinensis</i>	2x	Chombart, France
Yak	<i>M. sinensis</i> Yaku Jima	<i>M. sinensis</i>	2x	Bruckeveld, Belgique
H6 <sup>b</sup>	Hybride 6	<i>M. sinensis</i>	4x <sup>d</sup>	Université d'Aarhus, Danemark
GoD	<i>M. sinensis</i> Goliath Danois	<i>M. sinensis</i>	4x	Nordic Biomass, Danemark
Gol	<i>M. sinensis</i> Goliath	<i>M. sinensis</i>	4x	Chombart, France
Sac	<i>M. sacchariflorus</i>	<i>M. sacchariflorus</i>	2x	Chombart, France
H5 <sup>b</sup>	Hybride 5	<i>M. sacchariflorus</i>	4x	Université d'Aarhus, Danemark

<sup>a</sup> Déterminé par cytométrie de flux par Zub et al. (2012c)

<sup>b</sup> Clones déjà étudiés par Clifton-Brown et al. (2001b) et Lewandowski et al. (2003a)

<sup>c</sup> Il s'agit assurément d'un clone appartenant à l'espèce *M. x giganteus* (Rambaud, communication personnelle) ; nous supposons que le nom variétal est Floridulus mais sans certitude puisqu'il peut exister des confusions taxonomiques notamment pour du matériel végétal provenant de pépiniéristes

<sup>d</sup> Déterminé par cytométrie de flux par Rambaud (communication personnelle)

### **b. Modalités de récolte**

Deux dates de récolte sont étudiées dans cet essai :

- Une récolte automnale réalisée, chaque année, en septembre/octobre, soit 200 degrés jours après la date de floraison des clones selon leur précocité.
- Une récolte hivernale réalisée, chaque année, en février.

Les détails concernant la réalisation de ces récoltes sont présentés dans le chapitre 3.

### **c. Structure du dispositif**

L'essai a été implanté selon un dispositif en split-plot comprenant deux facteurs : la 'date de récolte' comme facteur principal et le 'clone' comme second facteur. Les modalités du facteur principal 'date de récolte' sont randomisées dans les grandes parcelles de l'essai. Les modalités du second facteur 'clone' sont randomisées dans les petites parcelles qui composent chacune des grandes parcelles.

Le facteur 'date de récolte' possède deux modalités : une récolte automnale et une récolte hivernale. Le facteur 'clone' possède 21 modalités, soit 21 clones. Ces 21 clones sont répartis dans les petites parcelles selon une randomisation tenant compte de la hauteur des plantes pour éviter des effets d'ombrage entre grandes et petites plantes (programme de randomisation d'Hervé Monod sous S+, communication personnelle).

Le dispositif comprend 3 blocs.

De plus amples informations concernant la description du dispositif expérimental sont présentées dans le chapitre 3.

### **6.2.3 Evaluation de la composition de biomasse aérienne**

#### **a. Récolte des échantillons**

Au cours des 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, et 5<sup>ème</sup> années de culture (2009 à 2011), des échantillonnages ont été réalisés au moment de chacune des deux dates de récolte : au moment de la récolte automnale sur les parcelles dédiées à la récolte automnale, et au moment de la récolte hivernale sur les parcelles destinées à la récolte hivernale.

Pour ce faire, chaque parcelle de l'essai a été entièrement récoltée en coupant les parties aériennes à environ 5 cm du sol. Pour chaque parcelle récoltée, un échantillon d'environ 500 g de matière fraîche a été prélevé de façon aléatoire.

#### **b. Préparation des échantillons pour les analyses chimiques et les mesures d'absorbance par SPIR**

Les échantillons prélevés sur chacune des parcelles à la récolte ont été séchés à l'étuve à 65°C pendant 4 jours. Ils ont ensuite été pré-broyés à l'aide d'un broyeur à végétaux (Viking, modèle GE 220, France) puis broyés à l'aide d'un broyeur équipé d'une grille d'1 mm (modèle Gondard Productions, France). Les poudres obtenues ont été homogénéisées et conservées dans des piluliers. Ces échantillons ont ensuite été entreposés en chambre froide à une température de 6°C et une hygrométrie régulée pour assurer leur conservation. Les poudres obtenues pour chaque échantillon ont été subdivisées en deux et utilisées à la fois pour les analyses chimiques et pour les mesures d'absorbance par la SPIR.

#### **c. Evaluation de la composition de la biomasse aérienne par analyses chimiques**

La composition chimique de la biomasse a été déterminée sur les échantillons de 3 années successives : les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, et 5<sup>ème</sup> années de culture.

Les dosages chimiques de la cellulose, des hémicelluloses, des lignines, des solubles, et des cendres ont été réalisés par le Laboratoire Agronomique de Normandie (LANO) sur les échantillons préalablement broyés.

La méthode Van Soest (Van Soest, 1967) a été utilisée. C'est une méthode gravimétrique basée sur la différence de solubilité des constituants dans deux types de détergents : un détergent neutre et un détergent acide.

Elle permet de quantifier la fraction NDF (Neutral Detergent Fiber), la fraction ADF (Acid Detergent Fiber), la fraction ADL (Acid Detergent Lignin), et la fraction soluble (Figure 6-7).

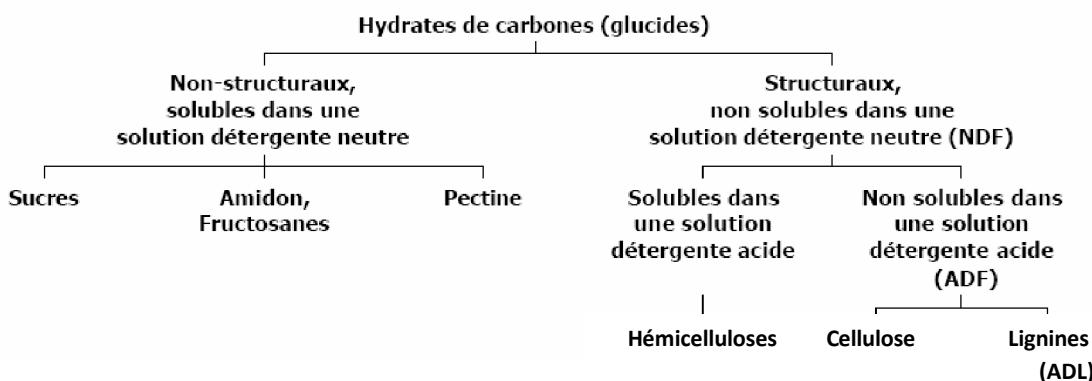


Figure 6-7 : Schéma des différentes étapes de la méthode Van Soest

- L'échantillon est tout d'abord mélangé avec une solution au détergent neutre pour séparer la partie soluble et la partie insoluble des hydrates de carbones (glucides). On obtient ainsi deux fractions :
  - la **fraction « soluble »**, contenant les glucides dits « non-structuraux », c'est-à-dire, qui ne sont pas contenus dans la paroi des végétaux ;
  - la fraction organique insoluble, appelée **fraction « Neutral Detergent Fiber » (NDF)**, contenant les glucides dits « structuraux » constituant la paroi végétale ; cette fraction représente la somme des polymères de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines, et de pectines de la paroi végétale, sachant que les plantes monocotylédones, et plus particulièrement le miscanthus, possèdent très peu de pectines.
- La fraction NDF est ensuite soumise à l'action d'une solution au détergent acide. On obtient ainsi la **fraction « Acide Detergent Fiber » (ADF)** ; cette fraction ADF représente la somme des polymères de cellulose et de lignines.
- Enfin, la fraction ADF obtenue précédemment est ensuite reprise dans une solution d'acide sulfurique diluée ; on obtient ainsi la **fraction « Acid Detergent Lignin » (ADL)** ; cette fraction représente les lignines seules.

## **Chapitre 6-2 - Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus**

Par différences successives de masse, il est possible de quantifier chaque fraction de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines, et de solubles (en % de matière sèche) :

$$\text{Hémicelluloses} = \text{NDF} - \text{ADF} \quad (1)$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL} \quad (2)$$

$$\text{Lignines} = \text{ADL} \quad (3)$$

$$\text{Solubles} = 100 - \text{NDF} \quad (4)$$

Enfin, la teneur en **cendres** (en % de matière sèche) représente la masse restante après calcination des échantillons à 550°C pendant 12h.

### **d. Mesures de l'absorbance des échantillons par la SPIR**

De même que pour les analyses chimiques, les mesures de l'absorbance ont été réalisées sur les échantillons de 3 années successives : les 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, et 5<sup>ème</sup> années de culture.

Les échantillons préalablement broyés sont homogénéisés puis répartis en une couche épaisse et uniforme dans une coupelle en quartz. La réflexion des longueurs d'onde est mesurée par un spectrophotomètre « PERKINELMER precisely, Spectrum 400 FT-IR / FT-NIR Spectrometer » équipé d'un porteur rotatif « NIRA sample spinner ». La mesure est effectuée 64 fois par échantillon pendant la rotation de la coupelle et ces répétitions techniques sont moyennées afin de s'affranchir de l'hétérogénéité des échantillons.

L'appareil est piloté par ordinateur à l'aide du logiciel « Spectrum » qui va récolter l'absorbance des échantillons pour des nombres d'ondes allant de 10000 à 4000 cm<sup>-1</sup> avec une résolution de 8 cm<sup>-1</sup>. Les absorbances ainsi récoltées sont traduites en spectres propres à chaque échantillon par le logiciel, ce sont ces spectres qui seront utilisés par la suite pour la détermination des courbes de calibration via le logiciel R.

## 6.2.4 Analyses statistiques des données

Le logiciel R a été utilisé pour la mise au point des équations de calibration (R Development Core Team, 2012).

### a. Traitement des spectres

Les nombres d'ondes les plus représentatifs des composants analysés dans notre étude sont ceux allant de 8000 à 4000 cm<sup>-1</sup> (INRA Orléans, Charpentier, communication personnelle). C'est pourquoi seules les longueurs allant de 8000 à 4000 cm<sup>-1</sup> ont été utilisées pour la mise au point des équations de calibration.

L'homogénéité des données spectrales des individus a été vérifiée à l'aide d'une Analyse en Composantes Principales (ACP).

Afin d'obtenir des équations de calibration aussi robustes que possible, les spectres acquis *via* l'appareil « PERKINELMER » et le logiciel « Spectrum » ont été analysés après avoir subi différentes transformations mathématiques destinées à limiter l'impact du bruit de fond :

- 1<sup>ère</sup> transformation : Normalisation
- 2<sup>ème</sup> transformation : Dérivée 1<sup>ère</sup>
- 3<sup>ème</sup> transformation : Dérivée 2<sup>nde</sup>
- 4<sup>ème</sup> transformation : Dérivée 1<sup>ère</sup> puis normalisation
- 5<sup>ème</sup> transformation : Dérivée 2<sup>nde</sup> puis normalisation
- 6<sup>ème</sup> transformation : Normalisation puis dérivée 1<sup>ère</sup>
- 7<sup>ème</sup> transformation : Normalisation puis dérivée 2<sup>nde</sup>

### b. Construction du modèle

Comme mentionné précédemment, nous allons construire un modèle pour chaque date de récolte et pour chacun des constituants de la biomasse étudiés : cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres. Nous allons ainsi croiser les données spectrales et les mesures chimiques obtenues par les analyses Van Soest de 181 individus pour la récolte automnale [(21 clones x 3 blocs x 3 années) – 8 données manquantes] et 170 individus pour la récolte hivernale [(21 clones x 3 blocs x 3 années) – 19 données manquantes].

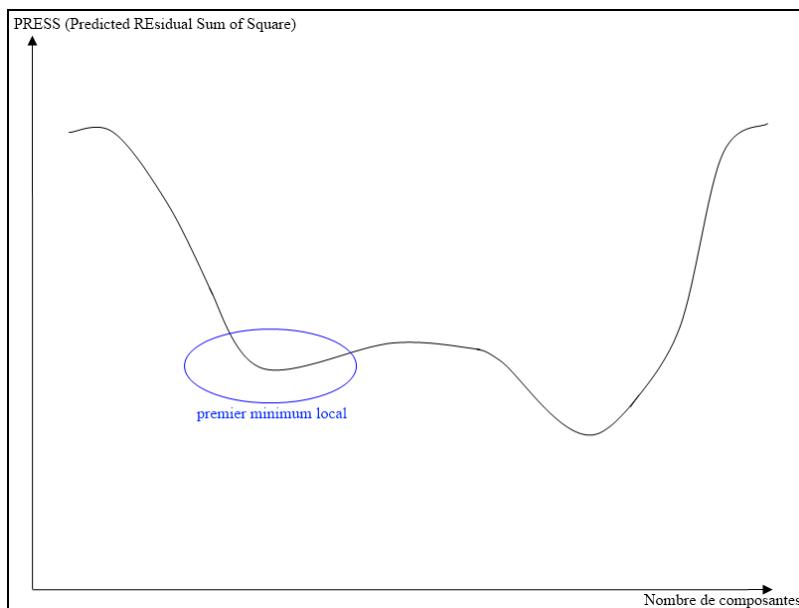
Différentes phases sont réalisées pour cela :

- **Identification des données aberrantes**

Pour commencer, on réalise une identification des échantillons aberrants, dits « outliers », dont les données spectrales sont distantes des données du reste de la population d'échantillons analysée. En effet, il est essentiel d'identifier ces « outliers » car ils sont susceptibles de diminuer la qualité prédictive du modèle. L'identification de ces « outliers » a été réalisée par la méthode « leave-one out » en régression PLS (Partial Least Square).

Cette méthode est un procédé itératif : pour chaque itération, on détermine le nombre de composantes PLS pour lesquelles le PRESS (Predicted Residual Sum of Square) atteint son premier minimum local (Figure 6-8) ; à chaque itération, un individu aléatoire et différent est enlevé de la population.

Les individus dont la présence induit une modification significative (au risque  $\alpha = 0,05$ ) par rapport à la population sont considérés comme « outliers » et ne sont pas pris en compte pour l'élaboration du modèle.



**Figure 6-8 : Représentation du premier minimum local du PRESS**

- **Obtention du modèle**

L'obtention du modèle a été réalisée par la méthode « PLS four-fold cross validation » (approche Monte-Carlo Cross Validation MCCV) qui consiste à construire le modèle (croisement des données spectrales et chimiques de chaque échantillon) à partir des  $\frac{3}{4}$  des données et à valider le modèle sur le  $\frac{1}{4}$  restant. Cette opération est répétée 500 fois en changeant les groupes d'individus utilisés pour la construction et pour l'évaluation de façon aléatoire.

De plus, certaines bandes spectrales peuvent diminuer la qualité prédictive du modèle. Le modèle est donc réalisé soit sur la base de l'ensemble des longueurs d'ondes du spectre, soit en éliminant de manière itérative les longueurs d'onde dont la présence diminue la qualité prédictive du modèle.

Cette méthode est appliquée aux spectres bruts et à chacune des transformations mathématiques des spectres. *In fine* le modèle de calibration le plus robuste parmi les 16 modèles obtenus sera choisi.

- **Critères de choix du modèle**

Le choix du modèle est une question délicate et les critères de choix à prendre en compte sont assez nombreux. Nous avons ici basé nos choix sur l'expérience acquise par l'INRA d'Orléans sur peuplier (Unité AGPF). Le choix du modèle le plus fiable se fait selon 5 critères majeurs :

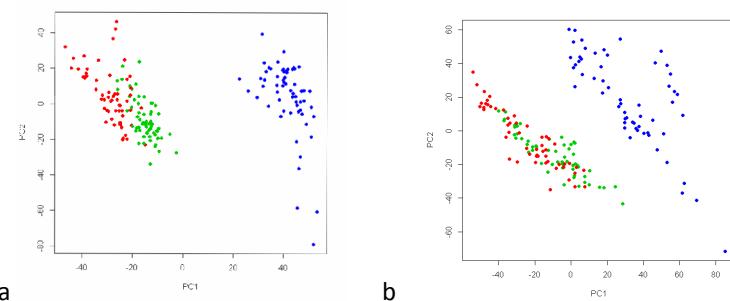
- Le **coefficient de détermination R<sup>2</sup>**, qui doit être le plus proche possible de 1, à la fois pour le R<sup>2</sup> de la calibration (R<sup>2</sup>c) et pour le R<sup>2</sup> de la validation croisée (R<sup>2</sup>cv).
- La **RMSEcv** (Root Mean Square Error of cross validation) (racine carrée du carré moyen résiduel de la validation croisée) ; ce critère doit être le plus faible possible. La gamme de variation des valeurs chimiques comparée à la RMSEcv permet, entre-autres, de juger de la validité du modèle. Ce critère n'est pas comparable entre variables différentes.
- La **RPDcv** (Ratio of Prediction to Deviation of cross validation =  $\sqrt{(\text{variance})/\text{RMSEcv}}$ ) (ratio entre la prédiction et la déviation de la validation croisée). Ce paramètre permet de savoir si le modèle de calibration développé prédit bien les données de référence (issues des analyses chimiques). Sa valeur est considérée comme acceptable si elle est supérieure ou égale à 2,5. Ce critère, contrairement au précédent, est comparable entre différentes variables.
- D'une manière générale, un bon modèle doit avoir un **nombre** aussi faible que possible **d'outliers**.
- Enfin, le modèle ne doit pas comporter un trop grand **nombre de composantes PLS**. Dans cette analyse, la limite acceptable a été fixée à 5 (selon l'expertise de l'INRA d'Orléans sur peuplier, Unité AGPF).

Ces critères nous permettront de choisir l'un des 7 modèles les plus robustes issus des 7 transformations des spectres (Cf § 6.2.4 a).

## 6.3 Résultats

### 6.3.1 Répartition des individus analysés

La répartition des individus (Figure 6-9) est hétérogène entre années en récolte automnale comme en récolte hivernale avec notamment une séparation franche entre les individus de l'année de culture 5 et ceux des années de culture 3 et 4. Il est également observé que, pour une même année, les individus récoltés en récolte automnale sont relativement bien groupés alors que ceux récoltés en récolte hivernale sont plus dispersés. Néanmoins ces fortes différences entre années ne signifient pas qu'il est impossible de réaliser des modèles robustes de prédiction de la composition pour l'ensemble des individus analysés.



**Figure 6-9 : Analyse en composantes principales des données spectrales des individus de miscanthus en récolte automnale (a) et des individus de miscanthus en récolte hivernale (b)**  
Rouge = Année 3, Vert = Année 4, Bleu = Année 5

### 6.3.2 Comparaison des modèles obtenus après transformations mathématiques des spectres bruts

Les différentes transformations mathématiques réalisées sur les données spectrales ont des effets sur la ligne de base (correspondant au bruit de fond), mais également sur la dispersion des spectres (Figure 6-10).

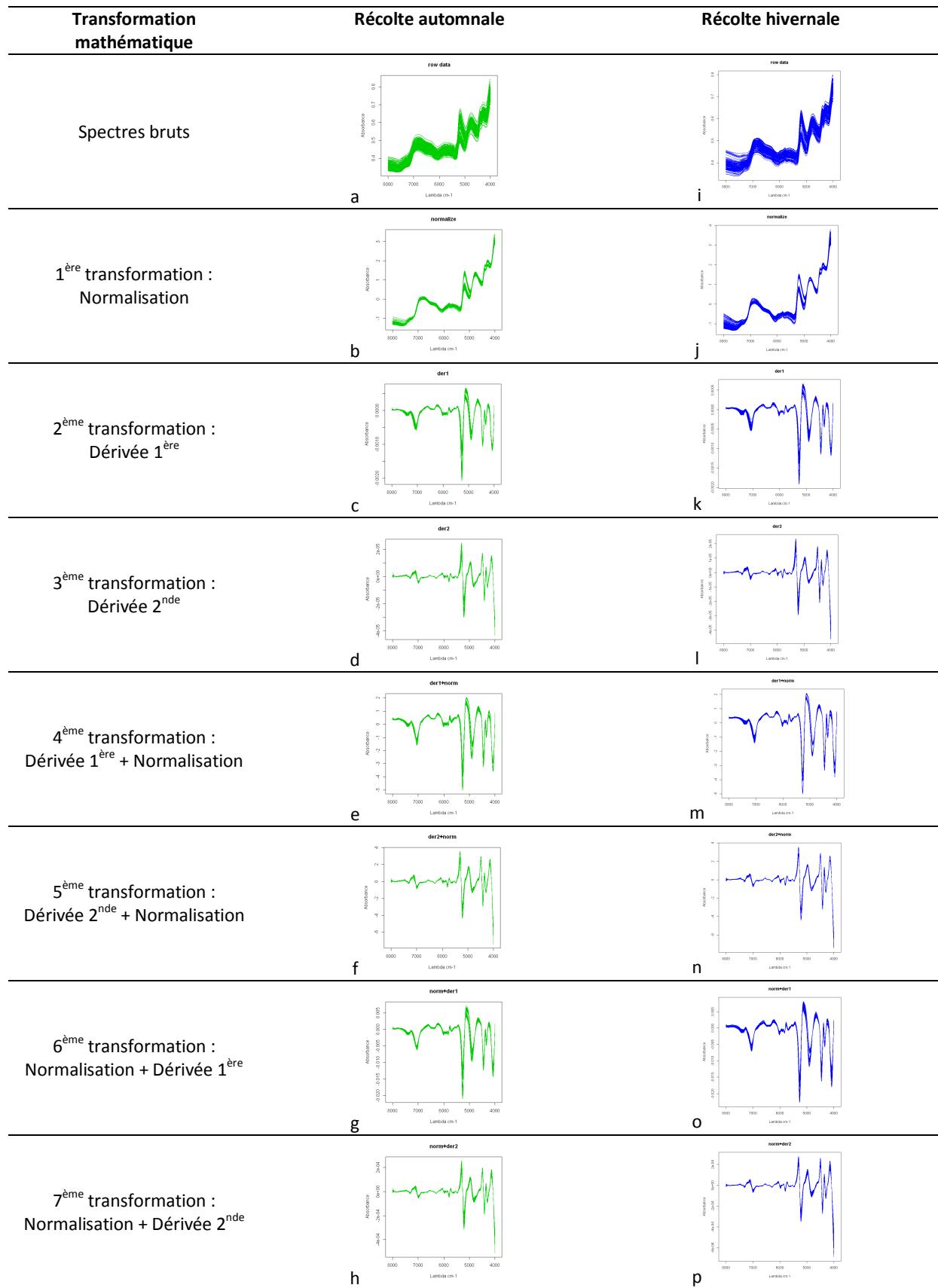


Figure 6-10 : Transformations mathématiques des données spectrales des individus de miscanthus en récolte automnale (a,b,c,d,e,f,g,h) et des individus de miscanthus en récolte hivernale (i,j,k,l,m,n,o,p)

Ces différences spectrales selon les transformations mathématiques se traduisent par des modèles aux qualités prédictives très différentes (données non montrées). D'une manière générale, les données spectrales ayant subi une simple dérivation d'ordre 1 ou 2 et suivies ou non d'une normalisation permettent d'obtenir les meilleurs modèles prédictifs, notamment lorsque l'on couple ceux-ci avec la sélection de bandes spectrales (Table 6-8 a). En revanche les données spectrales n'ayant pas subi de transformation, celles ayant été normalisées et celles ayant subi une normalisation suivie d'une dérivation d'ordre 1 ou 2 ne permettent pas d'obtenir des modèles d'une qualité prédictive suffisante en raison d'un nombre de composantes PLS trop élevées ou d'un coefficient de corrélation trop faible (données non montrées).

Les modèles obtenus pour la prédiction de la composition du miscanthus en récolte automnale sont assez satisfaisants pour ce premier travail exploratoire. En effet, les coefficients de détermination  $R^2c$  et  $R^2cv$  ( $\geq 0,83$ ), les RPDcv (proche de 2,5), et le nombre d'outliers ( $\leq 3$ ) obtenus pour les meilleurs modèles correspondent aux critères d'un modèle considéré comme robuste (Table 6-8 a). En revanche, le nombre de composantes PLS obtenu pour les différents modèles, variant de 5 à 8, est globalement plus important que celui fixé pour un modèle robuste (nombre de composantes PLS  $\leq 5$ ). Les valeurs de RMSEcv varient entre 0,19 et 1,04 et sont assez faibles et tout à fait correctes au regard des gammes de variations des différents caractères (Table 6-8 a). Ces valeurs de RMSEcv sont notamment les plus faibles pour les cendres et la lignine, ce qui coïncide avec la faible gamme de variation de ces caractères par rapport aux autres (Table 6-8 a). Les modèles obtenus en récolte automnale sont donc globalement satisfaisants pour les variables étudiées. Celui obtenu pour la lignine est particulièrement satisfaisant puisqu'il respecte l'ensemble des seuils fixés pour les différents critères (faibles  $R^2c$ ,  $R^2cv$ , RMSEcv, nombre d'outliers, et nombre de composantes PLS, et RPDcv  $\geq 2,5$ ).

Les modèles obtenus pour la prédiction de la composition du miscanthus en récolte hivernale sont également assez satisfaisants. En effet, les coefficients de détermination  $R^2c$  et  $R^2cv$  ( $\geq 0,87$ ), les RPDcv ( $\geq 2,75$ ) et le nombre d'outliers ( $\leq 6$ ) obtenus pour les meilleurs modèles correspondent aux critères d'un modèle considéré comme robuste (Table 6-8 b). En revanche, le nombre de composantes PLS obtenu pour les différents modèles est plus important que celui fixé pour un modèle robuste (nombre de composantes PLS  $\leq 5$ ). Les valeurs de RMSEcv varient de 0,19 à 0,96 et sont globalement faibles au regard des gammes de variation des différents caractères (Table 6-8 b). Même si la lignine présente une valeur de RMSEcv un peu plus forte que les cendres, les valeurs de RMSEcv obtenues pour ces deux caractères sont les plus faibles, ce qui coïncide avec la faible gamme de variation de ces caractères par rapport aux autres (Table 6-8 b). Les modèles semblent donc globalement satisfaisants. Les modèles obtenus pour la cellulose et les solubles respectent

rigoureusement les seuils fixés pour la majeure partie des critères (faibles  $R^2c$ ,  $R^2cv$ , nombre d'outliers, et nombre de composantes PLS, et  $RPDcv \geq 2,5$ ).

D'une manière générale, on observe que les coefficients de détermination et le  $RPDcv$  sont plus élevés pour les modèles obtenus pour la prédiction de la composition du miscanthus en récolte hivernale que pour ceux obtenus pour la récolte automnale (Table 6-8). Les modèles obtenus pour la récolte hivernale sont donc globalement plus robustes. Les corrélations entre les valeurs mesurées par analyses chimiques et les valeurs prédictives par les modèles sélectionnés pour les teneurs des différents constituants dans la partie aérienne totale sont présentées en annexe 3.

**Chapitre 6-2 - Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus**

**Table 6-8 : Meilleurs modèles obtenus pour la prédiction de la teneur en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles et cendres chez le miscanthus en récoltes automnale (a) et hivernale (b)**

Paramètre à prédire	Valeurs chimiques des paramètres à prédire (% MS) Moyenne ± écart type (Min - Max) (Etendue)	Modèles sélectionnés pour la calibration des échantillons en récolte automnale						
		Traitement	Nombre de composantes PLS	R <sup>2</sup> c	R <sup>2</sup> cv	RMSEcv (% MS)	RPDcv	Nombre d'outliers
<b>Cellulose</b>	35,2 ± 2,5 (26,2 - 41,4) (15,2)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	6	0,89	0,87	0,85	2,81	3
<b>Hémicelluloses</b>	33,9 ± 2,6 (26,6 - 39,3) (12,8)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	6	0,86	0,84	1,04	2,47	1
<b>Lignines</b>	4,9 ± 1,5 (2,2 - 9,2) (7,0)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	5	0,86	0,83	0,63	2,41	1
<b>Solubles</b>	25,9 ± 2,5 (19,8 - 35,3) (15,5)	Dérivée 2 <sup>nde</sup>	7	0,88	0,84	0,94	2,53	1
<b>Cendres</b>	4,7 ± 0,9 (1,8 - 6,4) (4,7)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	8	0,97	0,96	0,19	4,93	0

Paramètre à prédire	Valeurs chimiques des paramètres à prédire (% MS) Moyenne ± écart type (Min - Max) (Etendue)	Modèles sélectionnés pour la calibration des échantillons en récolte hivernale						
		Traitement	Nombre de composantes PLS	R <sup>2</sup> c	R <sup>2</sup> cv	RMSEcv (% MS)	RPDcv	Nombre d'outliers
<b>Cellulose</b>	42,2 ± 3,3 (33,6 - 49,5) (15,9)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	5	0,93	0,91	0,92	3,41	5
<b>Hémicelluloses</b>	35,2 ± 3,2 (27,3 - 40,6) (13,2)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	6	0,93	0,91	0,91	3,41	2
<b>Lignines</b>	7,1 ± 1,9 (4,0 - 12,1) (8,1)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	6	0,93	0,92	0,54	3,56	3
<b>Solubles</b>	15,5 ± 2,8 (9,8 - 25,8) (16,0)	Dérivée 2 <sup>nde</sup>	5	0,89	0,87	0,96	2,75	2
<b>Cendres</b>	3,3 ± 1,0 (1,2 - 10,3) (9,1)	Dérivée 2 <sup>nde</sup> + Normalisation	7	0,96	0,95	0,19	4,58	6

Max : maximum ; Min : minimum ; MS : Matière Sèche ; R<sup>2</sup>c : coefficient de détermination de la calibration ; R<sup>2</sup>cv : coefficient de détermination de la validation croisée (cv : cross validation) ; RMSEcv : Root Mean Square Error of cross-validation ; RPDcv : Ratio of Prediction to Deviation of cross validation

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Comparaison de la calibration des modèles et de la validation croisée

Sur miscanthus, certaines études utilisent la technique SPIR pour évaluer la composition de la biomasse de différents clones (Hodgson et al., 2010b ; Allison et al., 2011) mais peu donnent des informations sur les modèles de calibration qu'ils ont utilisés.

Dans cette partie, nous élargirons donc la discussion à des cultures proches du miscanthus d'un point de vue taxonomique telles que la canne à sucre ou le maïs. Le sorgho n'est pas cité car les publications existantes sur la SPIR font référence à d'autres composants que ceux traités ici.

La Table 6-9, sur laquelle nous nous appuierons pour la discussion, synthétise les données sur les différents paramètres de modèles de calibration obtenus dans la littérature et dans notre étude.

Chapitre 6-2 - Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus

**Table 6-9 : Comparaison de différents paramètres de modèles de calibration obtenus dans notre étude et dans la littérature**

Paramètre à prédire	Référence	Culture	Valeurs chimiques des paramètres à prédire (% MS) Moyenne ± écart type (Min - Max)	Date de récolte	Nombre d'échantillons utilisés dans la calibration	Nombre de composantes PLS	R <sup>2</sup> c	R <sup>2</sup> cv	RMSEcv	RPD cv
Cellulose	Notre étude	Miscanthus	35,2 ± 2,5 (26,2 - 41,4)	A	n = 181	6	0,89	0,87	0,85	2,81
			42,2 ± 3,3 (33,6 - 49,5)	H	n = 170	5	0,93	0,91	0,92	3,41
Sabatier et al. (2012)	Canne à sucre	<b>36,3 ± 4,9 (24,4 - 50,4)</b>		<b>n = 456</b>	nd	<b>0,92</b>	<b>0,90</b>	nd	<b>4,2</b>	
Hémicelluloses	Notre étude	Miscanthus	33,9 ± 2,6 (26,6 - 39,3)	A	n = 181	6	0,86	0,84	1,04	2,47
			35,2 ± 3,2 (27,3 - 40,6)	H	n = 170	6	0,93	0,91	0,91	3,41
Sabatier et al. (2012)	Canne à sucre	31,5 ± 2,5 (23,9 - 37,7)		n = 456	nd	0,75	0,63	nd	1,9	
Cozzolino et al. (2001)	Maïs	35,5 ± 3,7 (26,3 - 38,2)		n = 200	nd	0,72	nd	nd	nd	
Lignines	Notre étude	Miscanthus	4,9 ± 1,5 (2,2 - 9,2)	A	n = 181	5	0,86	0,83	0,63	2,41
			7,1 ± 1,9 (4,0 - 12,1)	H	n = 170	6	0,93	0,92	0,54	3,56
Hodgson et al. (2010b)	Miscanthus	nd	A et H	n = 73	nd	0,82	0,75	nd	nd	
Haffner et al. (2013)	<b>Miscanthus</b>	<b>20,6 ± 1,2 (17,5 - 23,2)</b>	A et H	<b>n = 172</b>	<b>6</b>	<b>0,98</b>	<b>0,98</b>	<b>0,26</b>	nd	
Sabatier et al. (2012)	Canne à sucre	6,5 ± 2,4 (1,2 - 12,2)		n = 456	nd	0,84	0,80	nd	1,9	
Solubles	Notre étude	Miscanthus	25,9 ± 2,5 (19,8 - 35,3)	A	n = 181	7	0,88	0,84	0,94	2,53
			15,5 ± 2,8 (9,8 - 25,8)	H	n = 170	5	0,89	0,87	0,96	2,75
Sabatier et al. (2012)	Canne à sucre	<b>20,3 ± 5,1 (7,6 - 41,1)</b>		<b>n = 456</b>	nd	<b>0,91</b>	<b>0,87</b>	nd	<b>3,8</b>	
Cendres	Notre étude	Miscanthus	4,7 ± 0,9 (1,8 - 6,4)	A	n = 181	8	0,97	0,96	0,19	4,93
			3,3 ± 1,0 (1,2 - 10,3)	H	n = 170	7	0,96	0,95	0,19	4,58
Haffner et al. (2013)	<b>Miscanthus</b>	<b>3,1 ± 1,0 (1,6 - 6,1)</b>	A et H	<b>n = 172</b>	<b>8</b>	<b>0,98</b>	<b>0,97</b>	<b>0,22</b>	nd	
Sabatier et al. (2012)	Canne à sucre	<b>5,4 ± 3,4 (0,8 - 17,4)</b>		<b>n = 456</b>	nd	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	nd	<b>5,6</b>	
Cozzolino et al. (2001)	Maïs	<b>6,9 ± 3,8 (1,5 - 16,0)</b>		<b>n = 320</b>	nd	<b>0,98</b>	nd	nd	nd	

A : automnale ; H : hivernale ; Max : maximum ; Min : minimum ; R<sup>2</sup>c : coefficient de détermination de la calibration ; R<sup>2</sup>cv : coefficient de détermination de la validation croisée (cv : cross validation) ; RMSEcv : Root Mean Square Error of cross-validation ; RPDcv : Ratio of Prediction to Deviation of cross validation ; nd : donnée non disponible

Les lignes en gras correspondent aux modèles de calibration équivalents ou meilleurs que ceux que nous avons obtenus sur miscanthus.

Pour le modèle de calibration concernant la teneur en cellulose, Sabatier et al. (2012) obtiennent sur canne à sucre des valeurs de  $R^2c$  et  $R^2cv$  similaires à celles que nous obtenons pour notre modèle en récolte hivernale. En revanche, leurs valeurs sont supérieures à celles que nous obtenons pour notre modèle en récolte automnale. Sabatier et al. (2012) obtiennent également une valeur de RPDcv meilleure que celles que nous obtenons. Le modèle de calibration développé par Sabatier et al. (2012) pour la prédiction de la teneur en cellulose semble donc meilleur que les nôtres.

Pour le modèle de calibration concernant la teneur en hémicelluloses, Sabatier et al. (2012) obtiennent des valeurs de  $R^2c$ , de  $R^2cv$ , et de RPDcv moins bonnes que les nôtres. Sur maïs, Cozzolino et al. (2001) obtiennent également de moins bonnes valeurs de  $R^2c$  que nous. Nos modèles de calibration pour la teneur en hémicelluloses en récolte automnale et en récolte hivernale semblent donc meilleurs que celui obtenu par Sabatier et al. (2012). Nos modèles semblent également meilleurs que celui obtenu par Cozzolino et al. (2001), même si la comparaison n'est faite que sur un seul paramètre.

Pour le modèle de calibration concernant la teneur en lignines, Hodgson et al. (2010b) ont obtenu, sur miscanthus, des valeurs de  $R^2c$  et de  $R^2cv$  moins bonnes que les nôtres. En revanche, Haffner et al. (2013) ont obtenu sur miscanthus de meilleures valeurs que les nôtres avec notamment des valeurs de  $R^2c$  et de  $R^2cv$  supérieures aux nôtres et une valeur de RMSEcv plus faible que les nôtres au regard d'une gamme de variation des valeurs chimiques un peu plus faible que celles obtenues dans notre étude. Le nombre de composantes utilisées pour leur modèle est en adéquation avec ce que nous obtenons. Enfin, sur canne à sucre, Sabatier et al. (2012) obtiennent, quant à eux, des valeurs de  $R^2c$ , de  $R^2cv$ , et de RPDcv moins fortes que les nôtres. Nos modèles de calibration pour la teneur en lignine semblent donc plus satisfaisants que ceux obtenus par Hodgson et al. (2010b) et Sabatier et al. (2012) mais moins bons que celui obtenu par Haffner et al. (2013).

Pour le modèle de calibration concernant la teneur en solubles, Sabatier et al. (2012) obtiennent des valeurs de  $R^2c$  et de  $R^2cv$  qui sont meilleures que celles que nous avons obtenues pour notre modèle en récolte automnale mais similaires à celles que nous obtenons pour notre modèle en récolte hivernale. Les valeurs de RPDcv que nous obtenons sont néanmoins plus faibles que celles obtenues par Sabatier et al. (2012). Il semblerait donc que le modèle de calibration mis au point par Sabatier et al. (2012) pour la teneur en solubles dans la canne à sucre soit meilleur que les nôtres obtenus sur miscanthus.

Pour le modèle de calibration concernant la teneur en cendres, Haffner et al. (2013) ont obtenu un modèle sur miscanthus avec des valeurs de  $R^2c$  et de  $R^2cv$  qui sont un peu meilleures que les nôtres. Ils obtiennent également une valeur de RMSEcv faible de 0,22, du même ordre que celles que nous avons obtenues, et ce, pour une gamme de variation des valeurs chimiques de la même ampleur entre les deux études, notamment pour notre récolte automnale. Enfin, le modèle proposé

par Haffner et al. (2013) utilise 8 composantes PLS, tout comme les nôtres. Sur canne à sucre, Sabatier et al. (2012) obtiennent de meilleures valeurs de  $R^2c$ , de  $R^2cv$ , et de RPDcv que les nôtres. Enfin, sur maïs, Cozzolino et al. (2001) obtiennent une valeur de  $R^2c$  sur le maïs qui est légèrement supérieure aux nôtres. Les modèles de calibration que nous avons obtenus pour la teneur en cendres semblent donc être un peu moins bons que ceux obtenus par Haffner et al. (2013) et Sabatier et al. (2012). La comparaison de nos modèles avec le modèle obtenu par Cozzolino et al. (2001) est en revanche plus délicate à faire étant donné que nous ne comparons qu'un seul paramètre.

Les valeurs des différents paramètres que nous avons obtenues pour nos modèles de calibration pour les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignine, solubles, et cendres chez miscanthus se placent donc globalement dans la gamme de valeurs obtenues dans d'autres modèles robustes de calibration. Les valeurs de RMSEcv que nous obtenons pour les différents caractères sont assez faibles en comparaison aux gammes de variation des valeurs chimiques ; nous pouvons donc considérer nos modèles comme satisfaisants pour prédire les composantes de la biomasse étudiées ici chez miscanthus par la SPIR.

#### **6.4.2 Améliorations de la calibration des modèles et de leur qualité de prédiction**

Les valeurs des différents paramètres permettant de statuer sur la robustesse des modèles de calibration SPIR varient selon les études. Certains modèles de calibration développés pour les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres, semblent être plus satisfaisants que ceux que nous avons établis. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences : (i) la méthode d'analyse chimique de référence utilisée, (ii) la qualité du broyage et l'humidité de l'échantillon broyé, et (iii) la gamme de variation pour les caractères à prédire couverte par les échantillons utilisés pour la calibration.

Haffner et al. (2013) obtiennent globalement un meilleur modèle de prédiction de la lignine que les nôtres et ceux obtenus par Hodgson et al. (2010b) et Sabatier et al. (2012). Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils ont utilisé la méthode de la lignine Klason comme méthode de référence alors que Hodgson et al. (2010b), Sabatier et al. (2012), et nous-mêmes, avons utilisé la méthode Van Soest, qui peut sous-estimer la teneur en lignine par rapport à la lignine Klason (Brigitte Chabbert, Communication personnelle). Ainsi, on dispose d'une gamme de variation plus importante avec la méthode Klason qu'avec la méthode Van Soest, ce qui contribue à améliorer la prédiction du modèle à RMSE équivalente.

Hayes (2012) a développé des modèles de calibration à partir de différents types d'échantillons de miscanthus : humides et non broyés, séchés et non broyés, séchés et broyés (granulométrie inférieure à 850 µm), séchés, broyés et tamisés (granulométrie comprise entre 180 et 850 µm). Il en a conclu que les meilleurs modèles de calibration étaient obtenus avec les échantillons séchés et broyés le plus finement possible (granulométrie entre 180 et 850 µm). Haffner et al. (2013) ont utilisé des échantillons de miscanthus séchés et broyés à une granulométrie inférieure à 100 µm. Ils obtiennent de meilleures valeurs pour leurs paramètres de calibration que Hayes (2012). Ils supposent qu'une plus faible granulométrie permet d'obtenir un échantillon plus homogène et donc d'obtenir des spectres plus représentatifs du caractère de composition à mesurer. Enfin, chez la canne à sucre, Sabatier et al. (2011) ont obtenu de meilleurs modèles de calibration pour certains constituants de la biomasse en utilisant ensemble des échantillons broyés à deux granulométries différentes (1mm et 2mm) par rapport à des échantillons broyés à une seule granulométrie. Des échantillons séchés, et broyés finement mais à plusieurs granulométries permettraient d'obtenir des modèles de prédiction de la composition de la biomasse relativement robustes.

Enfin, Sabatier et al. (2012) mettent en avant, sur canne à sucre, que l'utilisation d'échantillons amenant une plus grande gamme de variation dans les teneurs des constituants à prédire permet d'obtenir des modèles de calibration plus robustes pour la prédiction des teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, et cendres chez la canne à sucre. En effet, pour la cellulose, les solubles et les cendres, Sabatier et al. (2012) utilisent des échantillons couvrant une plus grande gamme de variation que ceux que nous avons utilisés, et leurs modèles s'avèrent plus satisfaisants que les nôtres (Table 6-9). C'est également le cas pour le modèle mis au point par Cozzolino et al. (2001) pour les cendres (Table 6-9).

## **6.5 Conclusions et perspectives**

Ce travail a permis l'obtention de modèles de calibration satisfaisants pour différents caractères associés à la composition de biomasse chez le miscanthus par la Spectroscopie du Proche Infra Rouge. Les meilleurs modèles sont obtenus pour la prédiction de la composition en récolte hivernale. Ce résultat est particulièrement intéressant car la composition de biomasse en récolte hivernale s'avère plus adaptée pour la production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération que celle en récolte automnale (Cf Chapitre 2).

A ce stade, il est cependant encore nécessaire d'améliorer encore la robustesse des modèles et, de valider la capacité des modèles à prédire de façon robuste les teneurs en cellulose, hémicelluloses, lignines, solubles, et cendres chez le miscanthus. Pour ce faire, (i) il serait judicieux d'agrandir la variabilité pour la composition de biomasse des individus utilisés en incluant, par exemple, de nouveaux individus dont la composition de biomasse est différente de celle des individus utilisés jusqu'alors. (ii) Il serait également pertinent de tester un broyage plus fin des échantillons ainsi qu'un séchage juste avant la prise des spectres puisque ces paramètres peuvent contribuer à améliorer la robustesse des modèles de calibration. (iii) L'obtention des modèles de calibration a été réalisée par la méthode « PLS » (partial least squares regression), la plus couramment utilisée. Il serait également intéressant de tester d'autres méthodes qui pourraient améliorer les modèles de calibration telles que la « MLR » (multiple linear regression), la « PCR » (Principal Component Regression), ou encore la « ANN » (artificial neutral network, en tant que technique non linéaire). Enfin, (iv), il serait judicieux de valider la prédiction des modèles en utilisant des échantillons indépendants de ceux utilisés ici pour la calibration, en testant en particulier d'autres fonds génétiques.

## 6.6 Références

- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of Miscanthus. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., and Goffner, D. 2003.** Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8:576-581.
- CIRAD.** La spectroscopie dans le proche infrarouge.4 p.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Cozzolino, D., Fassio, A., and Gimenez, A. 2001.** The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:142-146.
- Dalibart, M., and Servant, L. 2000.** « Spectroscopie dans l'infrarouge », Techniques de l'Ingénieur.2845.
- Haffner, F., Mitchell, V., Arundale, R., and Bauer, S. 2013.** Compositional analysis of Miscanthus giganteus by near infrared spectroscopy. *Cellulose* 20:1629-1637.
- Hayes, D.J. 2012.** Development of near infrared spectroscopy models for the quantitative prediction of the lignocellulosic components of wet Miscanthus samples. *Bioresource Technology* 119:393-405.
- Hodgson, E.M., Lister, S.J., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J., and Donnison, I.S. 2010.** Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of Miscanthus in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass & Bioenergy* 34:652-660.
- Klimiuk, E., Pokoj, T., Budzynski, W., and Dubis, B. 2010.** Theoretical and observed biogas production from plant biomass of different fibre contents. *Bioresource Technology* 101:9527-9535.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- Liu, C., Xiao, L., Jiang, J., Wang, W., Gu, F., Song, D., Yi, Z., Jin, Y., and Li, L. 2013.** Biomass properties from different Miscanthus species. *Food and Energy Security* 2:12-19.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.P., and Carrere, H. 2013.** Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43:260-322.
- Sabatier, D., Dardenne, P., and Thuries, L. 2011.** Near infrared reflectance calibration optimisation to predict lignocellulosic compounds in sugarcane samples with coarse particle size. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 19:199-209.
- Sabatier, D., Thuries, L., Bastianelli, D., and Dardenne, P. 2012.** Rapid prediction of the lignocellulosic compounds of sugarcane biomass by near infrared reflectance spectroscopy: comparing classical and independent cross-validation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 20:371-385.
- Sanderson, M.A., Agblevor, F., Collins, M., and Johnson, D.K. 1996.** Compositional analysis of biomass feedstocks by near infrared reflectance spectroscopy. *Biomass & Bioenergy* 11:365-370.

**Chapitre 6-2 - Mise au point d'équations de prédiction par spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus**

- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. Journal - Association of Official Analytical Chemists 50:50-55.
- Wolfrum, E.J., Lorenz, A.J., and deLeon, N. 2009.** Correlating detergent fiber analysis and dietary fiber analysis data for corn stover collected by NIRS. Cellulose 16:577-585.
- Zhao, H., Li, Q., He, J., Yu, J., Yang, J., Liu, C., and Peng, J. 2014.** Genotypic variation of cell wall composition and its conversion efficiency in *Miscanthus sinensis*, a potential biomass feedstock crop in China. GCB Bioenergy 6:768-776.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012c.** Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones. Bioenergy Research 5:841-854.



## **Chapitre 7**

### **Conclusions et perspectives**



La problématique centrale de ce travail de thèse consiste à contribuer à la définition d'idéotypes de miscanthus valorisables pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération et à donner des perspectives en sélection. Pour y répondre, nous avons établi plusieurs objectifs, formulé des hypothèses et mis en place une démarche expérimentale adaptée. Ainsi, nous avons structuré notre travail en 6 axes correspondant à 6 objectifs : (i) l'évaluation de la variabilité existante pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de biomasse chez le miscanthus, (ii) l'étude des relations entre ces caractères d'intérêt, (iii) l'évaluation de la qualité technologique des clones de miscanthus *via* leur aptitude à être transformés en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, (v) le développement d'outils de sélection adaptés au miscanthus, à travers l'étude des corrélations inter-annuelles pour les caractères d'intérêt et la mise au point d'équations de prédiction par la spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus et (vi) la proposition de pistes en sélection.

Dans ce chapitre, après avoir présenté les intérêts et les limites de la démarche expérimentale adoptée, nous rappellerons les principaux résultats et acquis, puis nous proposerons quelques perspectives pour des travaux futurs.

## 7.1 Intérêts et limites de la démarche expérimentale adoptée

### 7.1.1 Dispositif expérimental

#### a. Taille et représentativité de l'échantillon de clones testés

L'expérimentation réalisée dans le cadre de ce travail s'est appuyée sur un dispositif expérimental comprenant 21 clones de miscanthus, répartis dans trois espèces de *Miscanthus*, *M. x giganteus*, *M. sinensis* et *M. sacchariflorus*. Il s'avère que ces 21 clones répartis dans seulement trois espèces, ne sont pas représentatifs de la variabilité existante au sein du genre *Miscanthus* qui contient une vingtaine d'espèces. Cependant, ces 3 espèces figurent parmi les 3 espèces d'intérêt dans la littérature (Cf Chapitre 2).

De plus, si l'on compare la variabilité obtenue sur les 21 clones à celle trouvée dans la littérature pour les caractères d'intérêt (Cf Chapitre 2), nous couvrons globalement une bonne part de la variabilité constatée dans la revue bibliographique.

Des précautions doivent cependant être prises pour une éventuelle généralisation de nos résultats à l'ensemble du genre puisque nous avons travaillé sur un nombre limité d'espèces.

### b. Représentativité du lieu de l'étude

L'expérimentation a été réalisée sur un seul lieu dans des conditions pédo-climatiques de la région Picardie. De par l'unique lieu de cette étude, les résultats obtenus dans ce travail pourraient avoir une portée limitée. Dans l'optique de proposer des variétés de miscanthus adaptées à des pédo-climats variés, il sera bien sûr indispensable par la suite de prendre en compte la diversité pédo-climatique en mettant en place des expérimentations couvrant une gamme plus large de conditions.

Cependant, il s'avère que les conditions pédo-climatiques du site d'étude (Estrées-Mons, 80) sont considérées comme particulièrement favorables et non limitantes avec des sols profonds et drainants ayant une bonne réserve utile. Ces conditions permettent ainsi de bénéficier de l'homogénéité des conditions de milieu et également de se placer dans des conditions potentielles de production. Il s'agit d'un élément essentiel pour pouvoir comparer des génotypes en les plaçant dans des conditions optimales de comparaison. De plus, les résultats de ce travail peuvent servir de référence dans le cadre de l'étude de l'effet d'une contrainte de milieu spécifique, comme par exemple la sécheresse ou le froid. Ce type d'étude serait particulièrement intéressant dans le cas où l'on envisagerait d'implanter du miscanthus à côté d'usines de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération établies dans des zones de milieu contraint.

### c. Représentativité des années de culture étudiées

Cette étude a été menée sur 6 années consécutives, de la 2<sup>ème</sup> année à la 6<sup>ème</sup> année de culture. Cette large séquence nous a permis de prendre en compte à la fois les stades juvéniles de la culture et les stades plus âgés. En effet, selon l'étude bibliographique réalisée (Cf Chapitre 2), peu d'études sur miscanthus sont menées sur un nombre important d'années. La plupart des études traitent uniquement des trois premières années de culture, correspondant au stade jeune de la culture. Deux études menées par Cadoux et al. (2014) et Christian et al. (2008) abordent une plus large séquence d'années (4 et 14 années successives respectivement) mais elles ne concernent qu'un clone de *M. x giganteus*. Une autre étude évalue les caractères associés à la production de biomasse de 15 clones appartenant aux espèces *M. x giganteus*, *M. sinensis* et *M. sacchariflorus* sur 14 années successives (Gauder et al., 2012). Nos résultats obtenus en 6<sup>ème</sup> année de culture pour les caractères associés à la production de biomasse présentent des similitudes avec ceux obtenus par ces auteurs en 14<sup>ème</sup> année de culture. Nous pouvons ainsi supposer que les résultats que nous avons obtenus en 6<sup>ème</sup> année sont assez représentatifs de ce qui peut se passer pendant les années ultérieures pour les caractères associés à la production de biomasse.

En outre, notre étude apporte de nouveaux éléments, en particulier pour la composition de la biomasse qui n'a pas été étudiée chez différents clones de miscanthus sur le long terme dans la littérature.

#### **d. Prise en compte de deux dates de récolte**

Nous avons choisi de prendre en compte deux dates de récolte, l'une réalisée en sortie d'hiver et l'autre réalisée plus précocement en automne. Ce choix a été fait car nous n'avions pas de recul pour statuer sur la date de récolte la mieux adaptée à une valorisation du miscanthus en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. En effet, l'étude conjointe de deux dates de récolte n'est pas souvent rencontrée dans la littérature pour les caractères étudiés (Cf Chapitre 2). Ce travail apporte donc des éléments nouveaux par rapport à ces deux dates de récolte et permet de répondre aux hypothèses concernant la date de récolte la mieux adaptée à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

#### **7.1.2 Caractères étudiés**

En ce qui concerne l'évaluation des caractères associés à la production de biomasse, nous avons choisi de travailler sur les caractères les plus pertinents d'après les résultats de la thèse d'Hélène Zub menée sur miscanthus (Zub et al., 2011).

Pour évaluer la production de biomasse, nous avons été confrontés à la question de la représentativité de l'échantillon à prélever liée aux hétérogénéités entre plantes qu'il pouvait y avoir au sein d'une même parcelle. Afin d'assurer une bonne représentativité de la production de biomasse à l'hectare, nous avons choisi de récolter l'ensemble de chacune des parcelles, soit une surface de 15,36 m<sup>2</sup>. Notre surface de prélèvement est supérieure à la surface de 3m<sup>2</sup> évaluée par Knorzer et al. (2013) pour obtenir une variance peu élevée et pouvoir évaluer correctement la production de biomasse. Elle est, de plus, généralement supérieure aux surfaces de prélèvement utilisées pour l'évaluation de la production de biomasse du miscanthus dans la littérature qui varient entre 2 m<sup>2</sup> et 36 m<sup>2</sup> avec une surface moyenne de 11,5 m<sup>2</sup> pour les études utilisées dans le Chapitre 2.

En ce qui concerne l'évaluation des caractères de composition de la biomasse, nous avons fait le choix de travailler sur les teneurs des constituants de la biomasse en les exprimant par rapport à la matière sèche totale, qui s'avère être cohérente avec notre objectif puisque c'est la biomasse aérienne totale qui sera utilisée dans le procédé de transformation. L'expression de ces teneurs par rapport au pourcentage de paroi (% NDF) et non plus en pourcentage de la matière sèche totale permettrait cependant de déceler d'éventuelles différences liées à la quantité de paroi qui pourrait

varier entre clones ou qui pourrait évoluer en fonction des années et des dates de récolte. Cette démarche plus analytique serait intéressante à investiguer et pourrait constituer une perspective de ce travail. Enfin, nous avons privilégié, dans cette thèse, l'analyse de certains constituants de la biomasse : la cellulose, les hémicelluloses, les lignines, les solubles de type NDF et les cendres, que nous avons considéré comme étant les principaux constituants à prendre en compte pour ce travail. Nous nous sommes intéressés dans cette étude à la composition de la biomasse. Il serait également intéressant d'investiguer les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de la paroi afin d'en diminuer sa récalcitrance au prétraitement et à l'hydrolyse enzymatique. On pourrait notamment étudier la porosité de la paroi, la structure des microfibrilles de cellulose, ou encore la cristallinité de la cellulose, qui peuvent avoir un effet sur la transformation de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Enfin, lors des tests réalisés au sein du pilote FUTUROL, nous n'avons pas dosé les produits générés au cours du prétraitement tels que les acides phénoliques, coumariques, ou les composés furfuraux. Ces molécules pouvant inhiber la fermentation au cours du procédé, il serait intéressant de réaliser de tels dosages par la suite.

## **7.2 Principaux résultats et acquis : vers la définition d'idéotypes et la proposition de pistes en sélection**

Plusieurs résultats émanent de ce travail de thèse. Nous présenterons ici les plus marquants en relation avec les hypothèses formulées au début de ce mémoire.

### **7.2.1 Variabilité existante pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de la biomasse chez le miscanthus**

La première partie de ce travail concerne l'évaluation de la variabilité existante pour les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de biomasse chez le miscanthus. L'évaluation combinée de ces caractères, qui n'avait pas encore été réalisée au début de ce travail, constitue une étape primordiale pour pouvoir envisager le développement de programmes d'amélioration du miscanthus pour une valorisation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

L'étude bibliographique réalisée a permis de mettre en évidence une forte variabilité pour les caractères d'intérêt de production et de composition de biomasse chez les 3 espèces de *Miscanthus* les plus étudiées actuellement, *M. x giganteus*, *M. sacchariflorus* et *M. sinensis*. Cette variabilité est liée à la fois aux variations génotypiques et environnementales. L'espèce *M. x giganteus* et certains clones de l'espèce *M. sinensis* se démarquent comme étant les plus productifs. L'espèce *M. sinensis*

et un hybride interspécifique de type *M. x giganteus* présentent notamment de faibles teneurs en lignines dans leur biomasse et seraient donc plus adaptés pour le procédé de transformation de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. L'espèce *M. sacchariflorus* paraît également intéressante de par sa faible teneur en cendres, les cendres étant susceptibles d'encrasser les installations. Enfin, en étudiant la variabilité liée à l'année de culture et à la date de récolte, il s'avère que des différences sont observées en termes de production et de composition de biomasse.

### **7.2.2 Relations entre les caractères associés à la production et à la composition de biomasse chez les clones de miscanthus**

La deuxième partie de ce travail concerne l'étude des relations entre les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de biomasse qui n'ont jamais été étudiées préalablement dans la littérature sur miscanthus. Pourtant, la connaissance de ces relations entre caractères est capitale pour le développement de programmes d'amélioration du miscanthus. Nous avions émis deux hypothèses : (i) l'existence de relations significatives, synergiques ou antagonistes, entre ces caractères et (ii) la stabilité de ces relations en fonction du temps et de la date de récolte. L'expérimentation menée dans ce travail sur 21 clones de miscanthus nous a permis de valider ces deux hypothèses.

Nous avons mis en évidence qu'une forte production de biomasse est corrélée avec une hauteur importante, une floraison tardive, un fort diamètre des tiges, et de fortes teneurs en cellulose et en lignines dans la partie aérienne de la plante ; en revanche, cette forte production de biomasse est associée à de faibles teneurs en hémicelluloses, cendres et solubles. Il s'avère que ces relations sont stables entre les deux dates de récolte et entre les trois années étudiées.

En plus de valider les deux hypothèses émises, nous avons également mis en évidence que les caractères associés à la production de biomasse sont majoritairement influencés par l'année de culture et par le clone. En revanche, les caractères associés à la composition de biomasse sont majoritairement influencés par la date de récolte et le clone. Pour ces deux types de caractères, il existe des interactions du clone avec l'année ou la date de récolte mais elles sont très faibles au regard de l'importance des effets principaux précédés.

Enfin, cette étude nous a permis de déceler des clones potentiellement intéressants et de formuler de premières pistes d'amélioration : les clones de l'espèce *M. x giganteus*, Flo, GiB et GiD, sont les plus productifs et présentent la plus forte teneur en cellulose dans leur biomasse. Ils ont cependant le désavantage d'avoir une forte teneur en lignines. Ils ont également de plus fortes teneurs en hémicelluloses et de plus faibles teneurs en lignines dans leurs feuilles que dans leurs tiges. Certains clones de miscanthus identifiés dans ce travail ne perdent pas leurs feuilles entre

l'automne et l'hiver, contrairement aux clones les plus productifs cités ci-dessus. Ainsi, la composition des feuilles et le ratio feuilles/tiges pourraient constituer des critères de sélection intéressants dans l'objectif de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, où l'on recherche notamment à maximiser les teneurs en cellulose et en hémicelluloses mais à minimiser les teneurs en lignines. Enfin, le clone H5, appartenant à l'espèce *M. sacchariflorus*, présente de faibles teneurs en solubles et en cendres, ce qui en fait un candidat intéressant à considérer pour le développement de programmes d'amélioration.

### **7.2.3 Aptitude de différents clones de miscanthus à être transformés au cours du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

Outre l'étude de la biomasse native du miscanthus, il est également essentiel de s'intéresser à la transformation de cette biomasse au cours du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. En effet, plusieurs études mettent en avant l'influence de la composition de la biomasse native sur l'efficacité de ce procédé. Ayant mis en évidence précédemment une variabilité pour la composition de la biomasse des 21 clones étudiés (Cf Chapitre 4), nous avons émis deux hypothèses : (i) le clone *M. x giganteus* actuellement cultivé ne présente pas la composition la plus optimale pour la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération et certains clones de miscanthus ont une meilleure aptitude à la transformation que ce dernier, et (ii) des clones contrastés pour leur composition ont une aptitude variable à la transformation au cours du procédé. Nous avons donc testé, au sein du pilote industriel FUTUROL, 5 clones de miscanthus choisis parmi les 21 clones utilisés dans ce travail comme étant contrastés pour leur composition de biomasse (principalement cellulose, hémicelluloses et lignines).

Ces tests nous ont permis de valider les deux hypothèses de départ. En effet, des différences entre clones ont été révélées après l'étape de prétraitement et après l'étape d'hydrolyse enzymatique. Les clones Flo et GiB de l'espèce *M. x giganteus*, qui sont les plus lignifiés, présentent les moins bonnes aptitudes à la transformation. Au contraire, le clone Rot, appartenant à l'espèce *M. sinensis* et qui est le moins lignifié, présente la plus grande quantité en xylose potentiellement disponible après le prétraitement, le meilleur rendement de glucose extrait après hydrolyse enzymatique et, par conséquent, le meilleur potentiel en éthanol. En comparaison aux 4 autres clones, nous avons ainsi conclu que le clone Rot de l'espèce *M. sinensis* présentait la meilleure aptitude à la transformation pour les étapes du procédé testées et nous avons supposé que cette meilleure aptitude était due à la faible teneur en lignines de ce clone.

En prenant en compte la production de biomasse des 5 clones, nous avons évalué le rendement en éthanol à l'hectare. Ce sont les clones Flo et GiB qui donnent les meilleurs rendements en éthanol

à l'hectare avec une valeur maximale de 6909 L d'éthanol pour le clone Flo. Nous avons expliqué cette supériorité par les fortes productions de biomasse de ces clones qui compensent leur moins bonne aptitude à être prétraités et hydrolysés. Néanmoins, on pourrait espérer un gain de 20 % en termes de production d'éthanol à l'hectare si ces clones possédaient une aptitude à la transformation équivalente à celle du clone Rot, qui présente la meilleure aptitude parmi les clones testés.

Enfin, ces tests au pilote industriel nous ont permis de mettre en avant l'impact négatif de la teneur en lignines sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. La teneur en lignines de la biomasse s'avère donc être un critère important à considérer en sélection dans l'objectif d'optimiser l'efficacité du procédé de transformation. De futurs tests devront cependant être réalisés pour évaluer l'aptitude de ces clones à la fermentation et à la distillation.

#### **7.2.4 Développement d'outils de phénotypage adaptés au miscanthus**

Notre étude permet de proposer des outils de phénotypage utilisables en sélection pour le miscanthus.

##### **a. Etude des corrélations inter-annuelles pour les caractères d'intérêt**

Le miscanthus étant une plante pérenne qui atteint son stade adulte au bout de plusieurs années, nous nous sommes intéressés à la possibilité de prédire les caractères d'intérêt dès les premières années de culture dans l'objectif d'accélérer la sélection. Nous avons formulé deux hypothèses : (i) les caractères d'intérêt associés à la production et à la composition de biomasse peuvent être prédits avec fiabilité dès les premières années de culture, et (ii) la production de biomasse d'une culture âgée peut être prédite à partir de caractères plus simples à mesurer dès les premières années de culture.

L'étude de corrélations inter-annuelles pour les différents caractères à partir des résultats obtenus sur les 21 clones et les 6 années d'étude, nous a permis de valider ces deux hypothèses.

Les caractères associés à la production de biomasse sont assez fortement corrélés entre les 2<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> années de culture mais ces corrélations sont meilleures à partir de la 3<sup>ème</sup> année. De plus, ces corrélations sont fortes entre les deux dates de récolte étudiées. Cette étude a également mis en évidence des prédicteurs fiables de la production de biomasse des stades adultes : le volume aérien de la plante s'avère le meilleur prédicteur en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années de culture pour prédire la production de biomasse des 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> années. En revanche, c'est la hauteur de végétation de la plante observée en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années qui prédit le mieux la production de biomasse des 5<sup>ème</sup> et

6<sup>ème</sup> années. Enfin, les corrélations inter-annuelles pour les caractères associés à la composition de la biomasse sont plus variables que celles obtenues pour les caractères associés à la production de biomasse. En revanche, le classement des clones les plus productifs identifiés dans l'étude pour les teneurs en cellulose, hemicelluloses et lignines, ne varie pas entre années.

Ces résultats nous permettent d'orienter la sélection : il semble préférable pour le sélectionneur d'attendre au moins 3 ans pour évaluer avec fiabilité le potentiel des clones pour les caractères d'intérêt. En revanche, il pourra bénéficier de mesures plus simples pour évaluer la production de biomasse dès les stades jeunes. Il pourra également faire un premier tri des clones présentant les caractères favorables dès les premières années de culture pour ensuite affiner ce tri en 3<sup>ème</sup> année de culture.

**b. Mise au point d'équations de prédiction par la spectroscopie proche infrarouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus**

Dans l'optique de fournir au sélectionneur des outils de sélection fiables, rapides et peu couteux sur miscanthus, nous nous sommes orientés vers la technique de spectroscopie proche infra-rouge pour évaluer la composition de la biomasse chez le miscanthus.

Ce travail a permis de mettre au point des modèles de calibration pour ces caractères qui s'avèrent satisfaisants de par leurs valeurs de R<sup>2</sup>, RMSEcv, RPDcv et leur nombre de composantes PLS. Les meilleurs modèles sont obtenus pour la prédiction de la composition en récolte hivernale, ce qui est particulièrement intéressant car (i) la composition de biomasse en récolte hivernale s'avère plus adaptée pour la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération que celle en récolte automnale et (ii) la récolte hivernale est plus intéressante au niveau agronomique de par la remobilisation des nutriments des parties aériennes vers le rhizome pendant l'hiver. Bien que la prédiction donnée par ces modèles doive être validée sur d'autres fonds génétiques, ces résultats sont encourageants et font de la spectroscopie proche infra-rouge un outil utilisable sur miscanthus par les sélectionneurs.

### **7.3 Apports et perspectives de la thèse par rapport aux enjeux de la filière bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération**

Les résultats acquis dans le cadre de ce travail de thèse sur le miscanthus nous permettent d'apporter des éléments et de proposer des perspectives par rapport aux enjeux de la filière de production de bioéthanol 2<sup>ème</sup> génération.

### 7.3.1 Enjeux pour la filière bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération

Certains aspects généraux sont à prendre en compte chez le miscanthus pour mettre en place une filière durable de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Nous pouvons notamment citer le coût élevé de l'implantation qui nécessite d'optimiser la production de matériel végétal par rhizome ou par *culture in vitro* pour les variétés à multiplication végétative ou de produire des variétés à partir de graines. Il y a en outre la nécessité de stérilité et d'absence d'invasivité de la culture, ou encore d'une empreinte environnementale positive.

Du point de vue plus spécifique des industriels, qui est le point auquel nous nous sommes plus spécifiquement attachés dans ce travail de thèse, il s'agit d'optimiser l'efficacité de transformation de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

Les industriels doivent disposer d'une quantité de biomasse qui soit suffisante et adaptée aux différents environnements où seront placées les usines. En effet, le scénario le plus probable vise à construire des usines de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération locales et dont les cultures produisant la matière première soient implantées à proximité. Cela permettrait de limiter les transports de la matière première et ainsi, de réduire les coûts de production et l'émission des GES sur l'ensemble de la filière.

En plus de la question de la disponibilité de la ressource lignocellulosique, la composition de cette biomasse est également une préoccupation majeure de l'industriel pour optimiser l'efficacité du procédé de transformation de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. En effet, elle impacte fortement l'efficacité des différentes étapes du procédé de transformation. Les industriels ont trois préoccupations majeures :

- la difficulté à dégrader efficacement la lignocellulose de la biomasse en sucres fermentescibles, de par la composition et la structure complexe de la paroi végétale ;
- l'efficacité de l'étape d'hydrolyse enzymatique, principalement réduite par la présence de lignines voire des hémicelluloses, engendrant une récalcitrance de la paroi à l'hydrolyse, et,
- la maximisation du rendement en éthanol produit, qui passe par une maximisation des quantités de cellulose et d'hémicelluloses produites à l'hectare.

### **7.3.2 Propositions d'idéotypes de miscanthus et de critères de sélection au vu de nos résultats et des enjeux de la filière**

Pour répondre aux enjeux industriels de la filière, les idéotypes de miscanthus recherchés pour un usage en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération doivent combiner de façon durable :

- (i) une forte production de biomasse à l'hectare, et ce pour une gamme variée de pédo-climats,
- (ii) une composition de biomasse optimale pour le procédé industriel de transformation de la biomasse en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, avec des teneurs en cellulose et hémicelluloses maximisées, mais des teneurs en lignines, solubles et cendres qui soient les plus faibles possibles, et,
- (iii) une empreinte environnementale positive.

Au vu des résultats de ce travail de thèse, aucun des 21 clones de miscanthus testés ne combine tous ces caractères à l'état favorable.

Ce travail a néanmoins permis d'identifier des critères de sélection importants à prendre en compte dans une démarche d'amélioration génétique du miscanthus pour une valorisation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

**La production de biomasse et plusieurs caractères qui lui sont associés comme la date de floraison, la hauteur de végétation de la plante et le diamètre des tiges sont des critères de sélection importants à considérer pour maximiser la production de biomasse. Le ratio feuilles/tiges constitue également un critère à prendre en compte. Le nombre de tiges par plante, quant à lui, n'apparaît pas comme un critère majeur pour cette maximisation compte-tenu de la variabilité génétique étudiée. Son amélioration pourrait néanmoins constituer une marge de progrès intéressante en vue de la maximisation de la production de biomasse.**

**Concernant la composition de la biomasse, la teneur en lignines s'avère être le critère majeur à prendre en compte dans la sélection afin d'en réduire sa teneur. Les teneurs en cellulose et en hémicelluloses doivent également être considérées pour être maximisées. Enfin, la prise en compte de la composition des feuilles et non seulement des tiges comme critère de sélection semble également important à considérer dans une démarche de sélection.**

### **7.3.3 Perspectives en sélection : proposition de stratégies et d'outils de sélection à développer**

Pour construire des idéotypes de miscanthus adaptés à la production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, différentes stratégies sont envisageables, celles-ci pouvant être menées conjointement.

Elles consistent à (i) élargir la variabilité génétique, (ii) développer des populations élites de sélection et (iii) étudier le déterminisme génétique des caractères d'intérêt identifiés dans ce travail.

### a. Elargir la variabilité génétique

Pour élargir la gamme de variétés de miscanthus adaptées au débouché bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération, différentes options peuvent être envisagées, en particulier :

- les échanges de matériel dans le cadre de collaborations avec d'autres équipes travaillant sur le miscanthus au niveau international et ayant déjà constitué des collections de ressources génétiques : l'institut IBERS (Institute of Biological, Environmental, and Rural Sciences) à Aberystwyth au Pays de Galle, l'Université de Wageningen aux Pays-Bas...
- la prospection pour collecter de nouvelles accessions dans les centres d'origine et/ou les zones de culture du genre *Miscanthus*.

### b. Développer des populations élites de sélection

Au vu de nos résultats, plusieurs géniteurs peuvent être proposés pour développer des populations élites de sélection.

Parmi les 21 clones testés, les clones de l'espèce *M. x giganteus* Flo, GiB et GiD sont les meilleurs producteurs de biomasse et présentent également les plus fortes teneurs en cellulose. Ils constituent donc des géniteurs de choix pour développer des **populations élites de *M. x giganteus*** pour ces deux caractères. Pour pouvoir croiser entre eux ces clones, il faudrait cependant passer par une étape préalable de polyploïdisation pour rendre fertiles les clones GiB et Flo qui sont stériles de par un niveau de ploïdie impair (3x). Ainsi, la faisabilité de cette étape de polyploïdisation doit être évaluée auparavant. Le clone GiD, quant à lui, est fertile de par son niveau de ploïdie tétraploïde (4x) et peut ainsi être directement utilisé en tant que géniteur.

Nous pourrions également envisager de développer des **populations élites de *M. sinensis***. En effet, parmi les clones de *M. sinensis* testés, les clones Gol, GoD et H6 sont les meilleurs producteurs de biomasse et présentent également les plus fortes teneurs en cellulose. Ainsi, ils constituent d'intéressants géniteurs. De par leur niveau de ploïdie tétraploïde (4x), ils sont fertiles et peuvent donc être croisés directement entre eux. De la même façon, on pourrait constituer des populations élites pour une faible teneur en lignines en utilisant le clone Rot comme géniteur. Le clone H8, qui ne perd pas ses feuilles, pourrait également constituer un bon géniteur si l'on souhaite sélectionner ce caractère.

Une autre possibilité pour développer des populations élites pour les caractères d'intérêt serait de **resynthétiser des hybrides interspécifiques de type *M. x giganteus*** à partir d'individus élites choisis au sein des espèces *M. sacchariflorus* et *M. sinensis*. Par exemple, le clone H5 appartenant à l'espèce *M. sacchariflorus*, de par sa forte production de biomasse et ses faibles teneurs en solubles et en cendres, pourrait constituer un géniteur de choix. Le clone Rot, appartenant à l'espèce *M. sinensis* pourrait être un bon géniteur pour être croisé avec le clone H5. En effet, ce clone combine deux caractères favorables, sa faible teneur en lignines et son aptitude à la transformation au cours des étapes de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique du procédé de production de bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Ces deux clones sont fertiles (niveaux de ploïdie de 4x et 2x pour H5 et Rot respectivement) et peuvent donc être croisés directement.

c. **Etudier le déterminisme génétique des caractères d'intérêt identifiés dans ce travail**

L'étude du déterminisme génétique des caractères d'intérêt pour la production et la composition identifiés dans ce travail est indispensable pour la mise en œuvre de programmes de sélection assistée par marqueurs (SAM) et nécessite en premier lieu le développement de populations pour la détection de QTL.

Dans le cadre du projet Investissements d'avenir « Biomass For the Future » (BFF) lancé en 2012, une **population de cartographie de *M. sinensis*** a été développée et est en cours d'étude pour les caractères de production et de composition de biomasse.

On pourrait également envisager de construire d'autres populations. Par exemple, si dans les **populations élites intra-spécifiques de *M. x giganteus* ou de *M. sinensis*** proposées précédemment, des individus transgressaient pour les caractères d'intérêt, nous pourrions les utiliser en tant que parents pour la détection de QTL.

Par ailleurs, nous pourrions également utiliser des **parents contrastés** pour construire ces populations de cartographie. Nous pourrions par exemple proposer, **au niveau intra-spécifique**, des **parents contrastés provenant de l'espèce *M. sinensis*** :

i) ce travail nous a permis de mettre en évidence que la teneur en lignines est un critère majeur à prendre en compte en sélection pour une valorisation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération ; ainsi, le clone Rot (niveau de ploïdie 2x) pourrait constituer un parent de choix de par sa faible teneur en lignines et sa bonne aptitude à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération ; il pourrait être

croisé avec le clone Str (niveau de ploïdie 2x), contenant d'assez fortes teneurs en lignines parmi les clones de *M. sinensis* 2x testés.

ii) il serait également intéressant de développer des populations de cartographies basées sur d'autres caractères d'intérêt identifiés comme importants dans ce travail tels que la production de biomasse, les teneurs en cellulose, en solubles et en cendres. Ainsi, nous pourrions envisager de croiser les clones Pun ou Sil (niveau de ploïdie 2x), assez productifs parmi les clones de *M. sinensis* 2x testés, avec les clones Fla ou Fer (niveau de ploïdie 2x), situés parmi les clones les moins productifs. Les clones Gol, Gold ou H6 (niveau de ploïdie 4x), étant les plus productifs et contenant les plus fortes quantités en cellulose et en lignines et de faibles teneurs en hémicelluloses, en solubles et en cendres parmi les clones de l'espèce *M. sinensis* testés, pourraient être croisés avec les clones Fla ou Fer (niveau de ploïdie 2x), situés parmi les clones les moins productifs contenant de faibles teneurs en cellulose et en lignines et d'assez fortes teneurs en hémicelluloses, en cendres et en solubles.

Nous pourrons également proposer des populations de cartographie réalisées à partir de **croisements inter-spécifiques de parents contrastés**. Par exemple, le clone H5 de l'espèce *M. sacchariflorus* (niveau de ploïdie 4x) pourrait constituer un parent de choix de par sa forte production de biomasse, ses faibles teneurs en solubles et en cendres et sa teneur en lignines assez élevée. Il pourrait être croisé avec un clone de l'espèce *M. sinensis* tel que le clone Fla (niveau de ploïdie 2x) qui est peu productif et contient des teneurs en cendres et en solubles assez importantes et de faibles teneurs en lignines.

D'autres croisements peuvent être proposés puisque certains clones présentent des caractéristiques similaires pour un ou plusieurs caractères d'intérêt, notamment au sein des clones 2x de l'espèce *M. sinensis*. Le choix des parents pourra être guidé par le(s) caractère(s) d'intérêt ciblé(s). Ce choix devra également être fait en fonction de la facilité de croisement entre les parents.

Chez le miscanthus, outre la création et l'étude de populations de cartographie, une autre possibilité à explorer pour la détection de QTL, est la génétique d'association qui permet de travailler sur la base de la diversité allélique d'une collection de ressources génétiques.

Enfin, les connaissances génétiques acquises sur d'autres cultures taxonomiquement proches du miscanthus peuvent également constituer une aide précieuse pour l'étude du déterminisme génétique des caractères d'intérêt chez le miscanthus. En effet, les connaissances génétiques acquises sur le miscanthus sont encore limitées. La proximité taxonomique du maïs et du sorgho pourrait notamment faciliter l'identification des régions chromosomiques associées aux caractères d'intérêt par une approche de génomique comparative. Cette approche est prévue dans le projet « Biomass For the Future » entre le miscanthus, le maïs et le sorgho. Les résultats de la thèse

montrent l'importance qu'il faudra accorder aux caractères liés à la composition de la biomasse, le clone le plus cultivé actuellement en France ne présentant pas une aptitude optimale à la transformation en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération. Les connaissances génétiques acquises notamment sur la digestibilité de la paroi du maïs et du sorgho pourraient ainsi être mises à profit pour l'amélioration de la transformation du miscanthus en bioéthanol de 2<sup>ème</sup> génération.

## Bibliographie

- Acaroglu, M., and Aksoy, A.S. 2005.** The cultivation and energy balance of *Miscanthus x giganteus* production in Turkey. *Biomass & Bioenergy* 29:42-48.
- Allison, G.G., Morris, C., Clifton-Brown, J., Lister, S.J., and Donnison, I.S. 2011.** Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of *Miscanthus*. *Biomass & Bioenergy* 35:4740-4747.
- Amougou, N., Bertrand, I., Machet, J.M., and Recous, S. 2011.** Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization. *Plant and Soil* 338:83-97.
- Angelini, L.G., Ceccarini, L., Di Nassa, N.N.O., and Bonari, E. 2009.** Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass & Bioenergy* 33:635-643.
- Argillier, O., Hebert, Y., and Barriere, Y. 1995.** RELATIONSHIPS BETWEEN BIOMASS YIELD, GRAIN PRODUCTION, LODGING SUSCEPTIBILITY AND FEEDING VALUE IN SILAGE MAIZE. *Maydica* 40:125-136.
- Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use: genotypic and environmental variability and implications for breeding. *Bioenergy Research*. DOI: 10.1007/s12155-014-9524-7.
- Arnoult, S., Quillet, M.C., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** Miscanthus Clones Display Large Variation in Floral Biology and Different Environmental Sensitivities Useful for Breeding. *Bioenergy Research* 7:430-441.
- Arundale, R., Dohleman, F., Voigt, T., and Long, S. 2014a.** Nitrogen Fertilization Does Significantly Increase Yields of Stands of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* in Multiyear Trials in Illinois. *Bioenergy Research*:1-9.
- Arundale, R.A., Dohleman, F.G., Heaton, E.A., McGrath, J.M., Voigt, T.B., and Long, S.P. 2014b.** Yields of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* decline with stand age in the Midwestern USA. *Global Change Biology Bioenergy* 6:1-13.
- Baxter, X.C., Darvell, L.I., Jones, J.M., Barraclough, T., Yates, N.E., and Shield, I. 2012.** Study of *Miscanthus x giganteus* ash composition - Variation with agronomy and assessment method. *Fuel* 95:50-62.
- Beale, C.V., Bint, D.A., and Long, S.P. 1996.** Leaf photosynthesis in the C-4-grass *Miscanthus x giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England. *Journal of Experimental Botany* 47:267-273.
- Behnke, G.D., David, M.B., and Voigt, T.B. 2012.** Greenhouse Gas Emissions, Nitrate Leaching, and Biomass Yields from Production of *Miscanthus x giganteus* in Illinois, USA. *Bioenergy Research* 5:801-813.
- Bhandari, H.S., Walker, D.W., Bouton, J.H., and Saha, M.C. 2014.** Effects of ecotypes and morphotypes in feedstock composition of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *GCB Bioenergy* 6:26-34.
- Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., and Goffner, D. 2003.** Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* 8:576-581.
- Brancourt-Hulmel, M., Demay, C., Rosiau, E., Ferchaud, F., Bethencourt, L., Arnoult, S., Dauchy, C., Beaudoin, N., and Boizard, H. 2014.** Miscanthus Genetics and Agronomy for Bioenergy Feedstock, in: Karlen, D.L. (Ed.), Cellulosic Energy Cropping Systems. 2014 Wiley J & Sons, Ltd, United Kingdom, pp. 43-74.
- Cadoux, S., Ferchaud, F., Demay, C., Boizard, H., Machet, J.-M., Fourdinier, E., Preudhomme, M., Chabbert, B., Gosse, G., and Mary, B. 2014.** Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy* 6:425-438.

- Cadoux, S., Ferchaud, F., Preudhomme, M., Demay, C., Fourdinier, E., Strullu, L., Mary, B., Machet, J.M., Boizard, H., and Gosse, G. 2010.** Production de biomasse et impacts environnementaux des cultures énergétiques, Colloque final du programme REGIX, Lyon, France, pp. 27-39.
- Cadoux, S., Riche, A.B., Yates, N.E., and Machet, J.-M. 2012.** Nutrient requirements of Miscanthus x giganteus: Conclusions from a review of published studies. *Biomass and Bioenergy* 38:14-22.
- Chang, V.S., and Holtapple, M.T. 2000.** Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-6:5-37.
- Christian, D.G., and Haase, E. 2001.** Agronomy of miscanthus, in: Jones, M.B., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 21-45.
- Christian, D.G., Riche, A.B., and Yates, N.E. 2008.** Growth, yield and mineral content of Miscanthus x giganteus grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops and Products* 28:320-327.
- CIRAD.** La spectroscopie dans le proche infrarouge.4 p.
- CITEPA, 2013.** Dioxyde de carbone - CO<sub>2</sub>. <http://www.citepa.org/fr/pollution-et-climat/polluants/effet-de-serre/dioxyde-de-carbone> (Access date: 14/04/2014).
- Clifton-Brown, J., Long, S.P., and Jorgensen, U. 2001a.** Miscanthus productivity, in: Jones, M., Walsh, M. (Eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James and james, London, pp. 46-67.
- Clifton-Brown, J.C., and Lewandowski, I. 2002.** Screening Miscanthus genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy* 16:97-110.
- Clifton-Brown, J.C., Chiang, Y.C., and Hodkinson, T.R. 2008.** Miscanthus: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production., in: Vermerris, W. (Ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, USA, pp. 273-294.
- Clifton-Brown, J.C., Lewandowski, I., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Kjeldsen, J.B., Jorgensen, U., Mortensen, J.V., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2001b.** Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Clifton-Brown, J.C., Stampfl, P.F., and Jones, M.B. 2004.** Miscanthus biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. *Global Change Biology* 10:509-518.
- Commission Européenne, 2012.** L'innovation au service d'une croissance durable: une bioéconomie pour l'Europe, Communication de la Commission au Parlement Européen, au Conseil, au Comité économique et social Européen et au Comité des régions. 11 p.
- Cosentino, S.L., Patane, C., Sanzone, E., Copani, V., and Foti, S. 2007.** Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of Miscanthus x giganteus Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25:75-88.
- Cozzolino, D., Fassio, A., and Gimenez, A. 2001.** The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the composition of whole maize plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:142-146.
- Dagnelie, P. 1969.** Théorie et méthodes statistiques. Presses agronomiques, Gembloux, Belgique.
- Dalibart, M., and Servant, L. 2000.** « Spectroscopie dans l'infrarouge », Techniques de l'Ingénieur.2845.
- Danalatos, N.G., Archontoulis, S.V., and Mitsios, I. 2007.** Potential growth and biomass productivity of Miscanthus x giganteus as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass & Bioenergy* 31:145-152.
- De Cara, S., Goussebaïle, A., Grateau, R., Levert, F., Quemener, J., and Vermont, B. 2012.** Revue critique des études évaluant l'effet des changements d'affectation des sols sur les bilans environnementaux des biocarburants, Rapport final.96 p.
- de Cesare, M., Hodkinson, T.R., and Barth, S. 2010.** Chloroplast DNA markers (cpSSRs, SNPs) for Miscanthus, Saccharum and related grasses (Panicoideae, Poaceae). *Molecular Breeding* 26:539-544.
- DGEC, 2010.** L'industrie des énergies décarbonées en 2010, 1 : Biocarburants, Définitions et technologies. 13 p.

- DGEC, 2013.** Rapport de la France, Au titre du paragraphe 2 de l'article 3 de la décision n°280/2004/CE du Parlement européen et du Conseil du 11 février 2004, Extrait thématique, Actualisation 2013. 16 p.
- Dillen, S.Y., Djomo, S.N., Al Afas, N., Vanbeveren, S., and Ceulemans, R. 2013.** Biomass yield and energy balance of a short-rotation poplar coppice with multiple clones on degraded land during 16 years. *Biomass and Bioenergy* 56:157-165.
- Dohleman, F.G., and Long, S.P. 2009.** More Productive Than Maize in the Midwest: How Does Miscanthus Do It? *Plant Physiology* 150:2104-2115.
- Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Arundale, R.A., and Long, S.P. 2012.** Seasonal dynamics of above- and below-ground biomass and nitrogen partitioning in *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* across three growing seasons. *GCB Bioenergy* 4:534-544.
- Dohleman, F.G., Heaton, E.A., Leakey, A.D.B., and Long, S.P. 2009.** Does greater leaf-level photosynthesis explain the larger solar energy conversion efficiency of Miscanthus relative to switchgrass? *Plant Cell and Environment* 32:1525-1537.
- Drewer, J., Finch, J.W., Lloyd, C.R., Baggs, E.M., and Skiba, U. 2012.** How do soil emissions of N2O, CH4 and CO2 from perennial bioenergy crops differ from arable annual crops? *Global Change Biology Bioenergy* 4:408-419.
- ECF. 2010.** Roadmap 2050: A Practical Guide to a Prosperous, Low-Carbon Europe, Technical Analysis.100 p.
- Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., and Bonari, E. 1999.** Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of Miscanthus. *Field Crops Research* 63:3-11.
- EREC. 2010.** RE-thinking 2050, A 100% Renewable Energy Vision for the European Union.76 p.
- Eurelectric. 2011.** Power Choices Pathways to Carbon-Neutral Electricity in Europe by 2050, Full Report, Union of the Electricity Industry.100 p.
- Fahmi, R., Bridgwater, A., Donnison, I., Yates, N., and Jones, J.M. 2008.** The effect of lignin and inorganic species in biomass on pyrolysis oil yields, quality and stability. *Fuel* 87:1230-1240.
- Feng, X.P., Lourvant, K., Castric, V., Saumitou-Laprade, P., Zheng, B.S., Jiang, D., and Brancourt-Hulmel, M. 2014.** The Discovery of Natural Miscanthus Accessions Related to *Miscanthus × giganteus* Using Chloroplast DNA. *Crop Science* 54:1645-1655.
- Gabrielle, B., Bamière, L., Caldes, N., De Cara, S., Decocq, G., Ferchaud, F., Loyce, C., Pelzer, E., Perez, Y., Wohlfahrt, J., and Richard, G. 2014b.** Paving the way for sustainable bioenergy in Europe: Technological options and research avenues for large-scale biomass feedstock supply. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:11-25.
- Gabrielle, B., Gagnaire, N., Massad, R.S., Dufosse, K., and Bessou, C. 2014a.** Environmental assessment of biofuel pathways in Ile de France based on ecosystem modeling. *Bioresource Technology* 152:511-518.
- Gauder, M., Graeff-Hönninger, S., Lewandowski, I., and Claupein, W. 2012.** Long-term yield and performance of 15 different Miscanthus genotypes in southwest Germany. *Annals of Applied Biology* 160:126-136.
- Glowacka, K., Jezowski, S., and Kaczmarek, Z. 2010.** In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two Miscanthus species. *Industrial Crops and Products* 32:88-96.
- Godin, B., Agneessens, R., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Gerin, P.A., and Delcarte, J. 2011.** Review on analytical methods for lignocellulosic biomass structural polysaccharides. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 15:165-182.
- Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Goffart, J.P., Gerin, P.A., Stilmant, D., and Delcarte, J. 2010.** Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash contents in various lignocellulosic crops for second generation bioethanol production. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement* 14:549-560.

- Godin, B., Lamaudière, S., Agneessens, R., Schmit, T., Goffart, J.-P., Stilmant, D., Gerin, P.A., and Delcarte, J.** 2013a. Chemical characteristics and biofuel potential of several vegetal biomasses grown under a wide range of environmental conditions. *Industrial Crops and Products* 48:1-12.
- Godin, B., Lamaudière, S., Agneessens, R., Schmit, T., Goffart, J.-P., Stilmant, D., Gerin, P.A., and Delcarte, J.** 2013b. Chemical characteristics and biofuels potentials of various plant biomasses: influence of the harvesting date. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:3216-3224.
- Greef, J.M., and Deuter, M.** 1993. SYNTAXONOMY OF MISCANTHUS-X-GIGANTEUS GREEF-ET-DEU. *Angewandte Botanik* 67:87-90.
- Greef, J.M., Deuter, M., Jung, C., and Schondelmaier, J.** 1997. Genetic diversity of European Miscanthus species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:185-195.
- Greenpeace.** 2013. Scénario de transition énergétique. 27 p.
- Haffner, F., Mitchell, V., Arundale, R., and Bauer, S.** 2013. Compositional analysis of Miscanthus giganteus by near infrared spectroscopy. *Cellulose* 20:1629-1637.
- Haines, S.A., Gehl, R.J., Havlin, J.L., and Ranney, T.G.** 2014. Nitrogen and Phosphorus Fertilizer Effects on Establishment of Giant Miscanthus. *Bioenergy Research*:1-11.
- Han, K.J., Pitman, W.D., Kim, M., Day, D.F., Alison, M.W., McCormick, M.E., and Aita, G.** 2013. Ethanol production potential of sweet sorghum assessed using forage fiber analysis procedures. *Global Change Biology Bioenergy* 5:358-366.
- Hastings, A., Clifton-Brown, J., Wattenbach, M., Stampfl, P., Mitchell, C.P., and Smith, P.** 2008. Potential of Miscanthus grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development* 28:465-472.
- Hayes, D.J.** 2012. Development of near infrared spectroscopy models for the quantitative prediction of the lignocellulosic components of wet Miscanthus samples. *Bioresource Technology* 119:393-405.
- Hayes, D.J.M.** 2013. Mass and compositional changes, relevant to biorefining, in Miscanthus x giganteus plants over the harvest window. *Bioresource Technology* 142:591-602.
- Heaton, E., Voigt, T., and Long, S.P.** 2004. A quantitative review comparing the yields of two candidate C-4 perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass & Bioenergy* 27:21-30.
- Heaton, E.A., Dohleman, F.G., and Long, S.P.** 2008. Meeting US biofuel goals with less land: the potential of Miscanthus. *Global Change Biology* 14:2000-2014.
- Himken, M., Lammel, J., Neukirchen, D., CzypionkaKrause, U., and Olf, H.W.** 1997. Cultivation of Miscanthus under west European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant and Soil* 189:117-126.
- Hodgson, E.M., Fahmi, R., Yates, N., Barraclough, T., Shield, I., Allison, G., Bridgwater, A.V., and Donnison, I.S.** 2010a. Miscanthus as a feedstock for fast-pyrolysis: Does agronomic treatment affect quality? *Bioresource Technology* 101:6185-6191.
- Hodgson, E.M., Lister, S.J., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J., and Donnison, I.S.** 2010b. Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of Miscanthus in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass & Bioenergy* 34:652-660.
- Hodgson, E.M., Nowakowski, D.J., Shield, I., Riche, A., Bridgwater, A.V., Clifton-Brown, J.C., and Donnison, I.S.** 2011. Variation in Miscanthus chemical composition and implications for conversion by pyrolysis and thermo-chemical bio-refining for fuels and chemicals. *Bioresource Technology* 102:3411-3418.
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., and Renvoize, S.A.** 2002. Characterization of a genetic resource collection for Miscanthus (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany* 89:627-636.
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Lledo, M.D., Salamin, N., and Renvoize, S.A.** 2002. Phylogenetics of Miscanthus, Saccharum and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *Journal of Plant Research* 115:381-392.

- Hodkinson, T.R., Chase, M.W., Takahashi, C., Leitch, I.J., Bennett, M.D., and Renvoize, S.A. 2002.** The use of DNA sequencing (ITS and trnL-F), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany* 89:279-286.
- Huisman, W., Venturi, P., and Molenaar, J. 1997.** Costs of supply chains of *Miscanthus giganteus*. *Industrial Crops and Products* 6:353-366.
- Hulle, S., Waes, C., Vliegher, A., Baert, J., and Muylle, H. 2012.** Comparison of dry matter yield of lignocellulosic perennial energy crops in a long-term Belgian field experiment, in: Golinski, P., Warda, M., Stypinski, P. (Eds.), *Grassland - a European resource? Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation, Lublin, Poland, 3-7 June 2012*. Polskie Towarzystwo akarskie (Polish Grassland Society), Poznan, Poland, pp. 499-501.
- IEA, 2013.** Redrawing the energy-climate map, *World Energy Outlook Special Report, Executive Summary*.  
[http://www.iea.org/media/freepublications/2013pubs/WEO2013\\_Climate\\_Excerpt\\_ES\\_WEB.pdf](http://www.iea.org/media/freepublications/2013pubs/WEO2013_Climate_Excerpt_ES_WEB.pdf) (Access date: 13/04/2014) 8 p.
- IEA/OECD. 2006.** *Perspectives des Technologies de l'Energie, Scénarios et Stratégies à l'horizon 2050, Synthèse et Implications Stratégiques*.15 p.
- IFPEN, 2014.** La fabrication des biocarburants : 3 générations.  
<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/espace-decouverte/les-grands-debats/quel-avenir-pour-les-biocarburants/la-fabrication-des-biocarburants-3-generations> (Access date: 09/03/2014).
- Jakob, K., Zhou, F.S., and Paterson, A. 2009.** Genetic improvement of C4 grasses as cellulosic biofuel feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45:291-305.
- Jensen, E., Robson, P., Norris, J., Cookson, A., Farrar, K., Donnison, I., and Clifton-Brown, J. 2013.** Flowering induction in the bioenergy grass *Miscanthus sacchariflorus* is a quantitative short-day response, whilst delayed flowering under long days increases biomass accumulation. *Journal of Experimental Botany* 64:541-552.
- Jezowski, S. 2008.** Yield traits of six clones of *Miscanthus* in the first 3 years following planting in Poland. *Industrial Crops and Products* 27:65-68.
- Jezowski, S., Glowacka, K., and Kaczmarek, Z. 2011.** Variation on biomass yield and morphological traits of energy grasses from the genus *Miscanthus* during the first years of crop establishment. *Biomass & Bioenergy* 35:814-821.
- Kaack, K., Schwarz, K.U., and Brander, P.E. 2003.** Variation in morphology, anatomy and chemistry of stems of *Miscanthus* genotypes differing in mechanical properties. *Industrial Crops and Products* 17:131-142.
- Kaczmarek, D.J., Coyle, D.R., and Coleman, M.D. 2013.** Survival and growth of a range of *Populus* clones in central South Carolina USA through age ten: Do early assessments reflect longer-term survival and growth trends? *Biomass and Bioenergy* 49:260-272.
- Kalembasa, D., Jezowski, S., Pude, R., and Malinowska, E. 2005.** The content of carbon, hydrogen and nitrogen in different development stage of some clones of *Miscanthus*. *Polish Journal of Soil Science* 38:169-177.
- Karp, A., and Shield, I. 2008.** Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179:15-32.
- Kim, S.J., Kim, M.Y., Jeong, S.J., Jang, M.S., and Chung, I.M. 2012.** Analysis of the biomass content of various *Miscanthus* genotypes for biofuel production in Korea. *Industrial Crops and Products* 38:46-49.
- Klimiuk, E., Pokoj, T., Budzynski, W., and Dubis, B. 2010.** Theoretical and observed biogas production from plant biomass of different fibre contents. *Bioresource Technology* 101:9527-9535.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., and Ahring, B.K. 2004.** Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:10-26.

- Larsen, S., Jørgensen, U., Kjeldsen, J., and Lærke, P. 2014.** Long-Term Miscanthus Yields Influenced by Location, Genotype, Row Distance, Fertilization and Harvest Season. *Bioenergy Research* 7:620-635.
- Le Ngoc Huyen, T., Rémond, C., Dheilly, R.M., and Chabbert, B. 2010.** Effect of harvesting date on the composition and saccharification of *Miscanthus x giganteus*. *Bioresource Technology* 101:8224-8231.
- Lemus, R., Brummer, E.C., Moore, K.J., Molstad, N.E., Burras, C.L., and Barker, M.F. 2002.** Biomass yield and quality of 20 switchgrass populations in southern Iowa, USA. *Biomass and Bioenergy* 23:433-442.
- Lesur, C., Jeuffroy, M.H., Makowski, D., Riche, A.B., Shield, I., Yates, N., Fritz, M., Formowitz, B., Grunert, M., Jorgensen, U., Laerke, P.E., and Loyce, C. 2013.** Modeling long-term yield trends of *Miscanthus x giganteus* using experimental data from across Europe. *Field Crops Research* 149:252-260.
- Lewandowski, I., and Heinz, A. 2003.** Delayed harvest of miscanthus - influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19:45-63.
- Lewandowski, I., and Kicherer, A. 1997.** Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *European Journal of Agronomy* 6:163-177.
- Lewandowski, I., and Schmidt, U. 2006.** Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture Ecosystems & Environment* 112:335-346.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D.G., Jorgensen, U., Jones, M.B., Riche, A.B., Schwarz, K.U., Tayebi, K., and Teixeira, F. 2003a.** Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- Lewandowski, I., Scurlock, J.M.O., Lindvall, E., and Christou, M. 2003b.** The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass & Bioenergy* 25:335-361.
- Littell, R.C., Henry, P.R., and Ammerman, C.B. 1998.** Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science* 76:1216-1231.
- Littell, R.C., Pendegast, J., and Natarajan, R. 2000.** Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in Medicine* 19:1793-1819.
- Liu, C., Xiao, L., Jiang, J., Wang, W., Gu, F., Song, D., Yi, Z., Jin, Y., and Li, L. 2013.** Biomass properties from different *Miscanthus* species. *Food and Energy Security* 2:12-19.
- Mantino, M., D'Agosta, G.M., Copani, V., Patane, C., and Cosentino, S.L. 2009.** Biomass yield and energy balance of three perennial crops for energy use in the semi-arid Mediterranean environment. *Field Crops Research* 114:204-213.
- McCann, M.C., and Carpita, N.C. 2008.** Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11:314-320.
- Meehan, P.G., Finn, J.M., and Mc Donnell, K.P. 2013.** The effect of harvest date and harvest method on the combustion characteristics of *Miscanthus x giganteus*. *Global Change Biology Bioenergy* 5:487-496.
- Mendes, F.M., Siqueira, G., Carvalho, W., Ferraz, A., and Milagres, A.M.F. 2011.** Enzymatic Hydrolysis of Chemithermomechanically Pretreated Sugarcane Bagasse and Samples with Reduced Initial Lignin Content. *Biotechnology Progress* 27:395-401.
- Miguez, F.E., Villamil, M.B., Long, S.P., and Bollero, G.A. 2008.** Meta-analysis of the effects of management factors on *Miscanthus x giganteus* growth and biomass production. *Agricultural and Forest Meteorology* 148:1280-1292.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.P., and Carrere, H. 2013.** Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43:260-322.

- Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Guo, X.M., Latrille, E., Trably, E., Steyer, J.-P., and Carrere, H. 2012.** Predictive Models of Biohydrogen and Biomethane Production Based on the Compositional and Structural Features of Lignocellulosic Materials. *Environmental Science & Technology* 46:12217-12225.
- Mos, M., Banks, S.W., Nowakowski, D.J., Robson, P.R.H., Bridgwater, A.V., and Donnison, I.S. 2013.** Impact of Miscanthus x giganteus senescence times on fast pyrolysis bio-oil quality. *Bioresource Technology* 129:335-342.
- Murray, S.C., Rooney, W.L., Mitchell, S.E., Sharma, A., Klein, P.E., Mullet, J.E., and Kresovich, S. 2008.** Genetic Improvement of Sorghum as a Biofuel Feedstock: II. QTL for Stem and Leaf Structural Carbohydrates. *Crop Science* 48:2180-2193.
- Nissim, W.G., Pitre, F.E., Teodorescu, T.I., and Labrecque, M. 2013.** Long-term biomass productivity of willow bioenergy plantations maintained in southern Quebec, Canada. *Biomass & Bioenergy* 56:361-369.
- Office of Science and Technology Policy, 2012.** National Bioeconomy Blueprint. 48 p.
- Pachauri, R.K., and Reisinger, A. 2007.** Bilan 2007 des changements climatiques, Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. 103 p.
- Palmer, I.E., Gehl, R.J., Ranney, T.G., Touchell, D., and George, N. 2014.** Biomass yield, nitrogen response, and nutrient uptake of perennial bioenergy grasses in North Carolina. *Biomass & Bioenergy* 63:218-228.
- Price, D.L., and Casler, M.D. 2014.** Predictive Relationships between Plant Morphological Traits and Biomass Yield in Switchgrass. *Crop Science* 54:637-645.
- Qin, J., Yang, Y., Jiang, J., Yi, Z., Xiao, L., Ai, X., and Chen, Z. 2012.** Comparison of lignocellulose composition in four major species of Miscanthus. *African Journal of Biotechnology* 11:12529-12537.
- R Development Core Team. 2012.** version « 2.15.1 ».
- Rabelo, S.C., Carrere, H., Filho, R.M., and Costa, A.C. 2011.** Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 102:7887-7895.
- Rae, A.M., Robinson, K.M., Street, N.R., and Taylor, G. 2004.** Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 34:1488-1498.
- Robson, P., Jensen, E., Hawkins, S., White, S.R., Kenobi, K., Clifton-Brown, J., Donnison, I., and Farrar, K. 2013.** Accelerating the domestication of a bioenergy crop: identifying and modelling morphological targets for sustainable yield increase in Miscanthus. *Journal of Experimental Botany* 64:4143-4155.
- Rubin, E.M. 2008.** Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454:841-845.
- Sabatier, D., Dardenne, P., and Thuries, L. 2011.** Near infrared reflectance calibration optimisation to predict lignocellulosic compounds in sugarcane samples with coarse particle size. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 19:199-209.
- Sabatier, D., Thuries, L., Bastianelli, D., and Dardenne, P. 2012.** Rapid prediction of the lignocellulosic compounds of sugarcane biomass by near infrared reflectance spectroscopy: comparing classical and independent cross-validation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 20:371-385.
- Sanderson, M.A., Agblevor, F., Collins, M., and Johnson, D.K. 1996.** Compositional analysis of biomass feedstocks by near infrared reflectance spectroscopy. *Biomass & Bioenergy* 11:365-370.
- Sanderson, M.A., and Adler, P.R. 2008.** Perennial forages as second generation bioenergy crops. *International Journal of Molecular Sciences* 9:768-788.
- Sarath, G., Dien, B., Saathoff, A.J., Vogel, K.P., Mitchell, R.B., and Chen, H. 2011.** Ethanol yields and cell wall properties in divergently bred switchgrass genotypes. *Bioresource Technology* 102:9579-9585.
- SAS Institute Inc. 2000.** SAS user's guide: statistics. Cary, NC, USA.

- Scaracia-Mugnozza, G.E., Ceulemans, R., Heilman, P.E., Isebrands, J.G., Stettler, R.F., and Hinckley, T.M. 1997.** Production physiology and morphology of *Populus* species and their hybrids grown under short rotation. II. Biomass components and harvest index of hybrid and parental species clones. Canadian Journal of Forest Research 27:285-294.
- Segura, V., Cilas, C., and Costes, E. 2008.** Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: mixed linear modelling of repeated spatial and temporal measures. New Phytologist 178:302-314.
- Slavov, G., Allison, G., and Bosch, M. 2013.** Advances in the genetic dissection of plant cell walls: tools and resources available in Miscanthus. Front. Plant Sci. 4:217.
- Souza, A., Grandis, A., Leite, D.C., and Buckeridge, M. 2014.** Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. Bioenergy Research 7:24-35.
- Sticklen, M. 2006.** Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. Current Opinion in Biotechnology 17:315-319.
- Strullu, L., Cadoux, S., Preudhomme, M., Jeuffroy, M.H., and Beaudoin, N. 2011.** Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus x giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. Field Crops Research 121:381-391.
- Tayot, X., Chartier, M., Varlet-Grancher, C., and Lemaire, G. 1995.** Potential above-ground dry matter production of miscanthus in north-central France compared to sweet sorghum, in: Chartier, P., Beenackers, A., Grassi, G. (Eds.), Biomass for energy, environment, agriculture and industry. Elsevier, Oxford, pp. 556-564.
- Tran, A.V., and Chambers, R.P. 1985.** RED OAK WOOD DERIVED INHIBITORS IN THE ETHANOL FERMENTATION OF XYLOSE BY PICHIA-STIPITIS CBS-5776. Biotechnology Letters 7:841-845.
- Van den Heuvel, E.M.J.T. 1995.** Pretreatment technologies for energy crops. Final Report of Novem Project 355300/0302:69 p.
- van der Weijde, T., Kamei, C.L.A., Torres, A.F., Vermerris, W., Dolstra, O., Visser, R.G.F., and Trindade, L.M. 2013.** The potential of C4 grasses for cellulosic biofuel production. Frontiers in Plant Science 4.
- Van Hulle, S., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., and Muylle, H. 2010.** Comparison of Different Low-Input Lignocellulosic Crops as Feedstock for Bio-ethanol Production, in: Huyghe, C. (Ed.), Proceedings of the Conference of the Eucarpia Fodder and Amenity Species Section: Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding, pp. 365-368.
- Van Soest, P.J.a.W., R.H. 1967.** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 50:50-55.
- Vermerris, W. 2011.** Survey of Genomics Approaches to Improve Bioenergy Traits in Maize, Sorghum and Sugarcane. Free Access. Journal of Integrative Plant Biology 53:105-119.
- Wagoner, P. 1990.** PERENNIAL GRAIN DEVELOPMENT - PAST EFFORTS AND POTENTIAL FOR THE FUTURE. Critical Reviews in Plant Sciences 9:381-408.
- Wolfinger, R., and Chang, M. 1998.** Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measures. <http://www.ats.ucla.edu/stat/sas/library/mixedglm.pdf> (Access date: 12/04/2014).
- Wolfrum, E.J., Lorenz, A.J., and deLeon, N. 2009.** Correlating detergent fiber analysis and dietary fiber analysis data for corn stover collected by NIRS. Cellulose 16:577-585.
- Xu, N., Zhang, W., Ren, S.F., Liu, F., Zhao, C.Q., Liao, H.F., Xu, Z.D., Huang, J.F., Li, Q., Tu, Y.Y., Yu, B., Wang, Y.T., Jiang, J.X., Qin, J.P., and Peng, L.C. 2012.** Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatments in *Miscanthus*. Biotechnology for Biofuels 5.
- Xu, W.Z., Zhang, X.Q., Huang, L.K., Nie, G., and Wang, J.P. 2013.** Higher genetic diversity and gene flow in wild populations of *Miscanthus sinensis* in southwest China. Biochemical Systematics and Ecology 48:174-181.
- Zegada-Lizarazu, W., Parrish, D., Berti, M., and Monti, A. 2013.** Dedicated crops for advanced biofuels: Consistent and diverging agronomic points of view between the USA and the EU-27. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 7:715-731.

- Zhao, H., Li, Q., He, J., Yu, J., Yang, J., Liu, C., and Peng, J. 2014.** Genotypic variation of cell wall composition and its conversion efficiency in *Miscanthus sinensis*, a potential biomass feedstock crop in China. *GCB Bioenergy* 6:768-776.
- Zhao, X., Zhang, L., and Liu, D. 2012.** Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 6:465-482.
- Zub, H.W., and Brancourt-Hulmel, M. 2010.** Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30:201-214.
- Zub, H.W., Arnoult, S., and Brancourt-Hulmel, M. 2011.** Key traits for biomass production identified in different *Miscanthus* species at two harvest dates. *Biomass & Bioenergy* 35:637-651.
- Zub, H.W., Arnoult, S., Younous, J., Lejeune-Hénaut, I., and Brancourt-Hulmel, M. 2012a.** The frost tolerance of *Miscanthus* at the juvenile stage: Differences between clones are influenced by leaf-stage and acclimation. *European Journal of Agronomy* 36:32-40.
- Zub, H.W., Monod, H., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012b.** An Index of Competition Reduces Statistical Variability and Improves Comparisons between Genotypes of *Miscanthus*. *Bioenergy Research* 5:829-840.
- Zub, H.W., Rambaud, C., Béthencourt, L., and Brancourt-Hulmel, M. 2012c.** Late Emergence and Rapid Growth Maximize the Plant Development of *Miscanthus* Clones. *Bioenergy Research* 5:841-854.



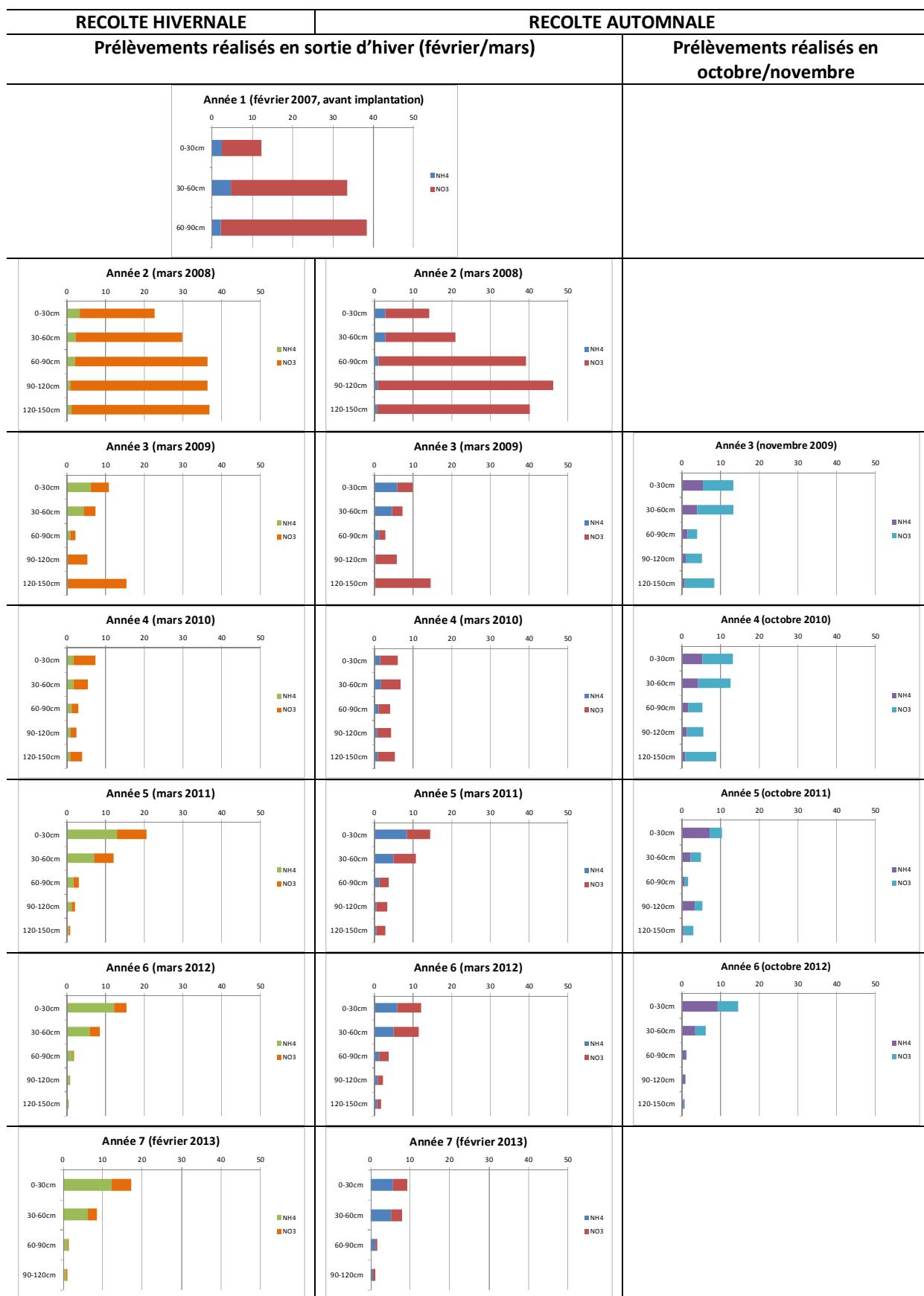
## || Annexes



## Annexe 1

### **Suivi des reliquats azotés pendant l'expérimentation**

**Annexe 1 - Suivi des reliquats azotés pendant l'expérimentation**



**Figure A 1-1 : Quantités moyennes de NH4 et NO3 restant dans le sol en octobre/novembre et en sortie d'hiver pour chacune des deux modalités de récolte, automnale et hivernale, et pour les années d'expérimentation 1 (2007) à 7 (2013)**

## **Annexe 2**

### **Protocole d'analyse chimique de la composition de la biomasse utilisé par le laboratoire LANO**

**1 Obtention de la fraction NDF [NEUTRAL DETERGENT FIBER] :**

**1.1 Préparation de la solution**

Solution détergent neutre :

Dodécylhydrogénosulfate de sodium	N° 140	30 g
Borax [tétraborate de sodium]	N° 92	6,81 g
EDTA	N°253	18,61 g
Na2HPO4 anhydre	N°132	4,56 g
Eau distillée		QSP 1000 ml

Chauffer légèrement pour favoriser la dissolution [attention aux émanations irritantes, utiliser masque, gants, lunettes et travailler sous la hotte). Si besoin, ajuster la solution à pH 6,9 [acide phosphorique ou soude].

**1.2 Procédure**

Utiliser les sacs spécifiques [NDF/ADF].

- Les sacs utilisés et les bêchers doivent avoir été préalablement séchés à 105° pendant au moins une nuit.
- Tarer le bécher qui sera utilisé tout au long de l'essai [T]. Tarer également le bécher et le sac vide [TS].
- Introduire l'échantillon dans le sac. La masse introduite est de 1 g environ [mesurer la valeur exacte). Peser la masse obtenue [bécher + sac + échantillon, M0].
- Introduire un support de sac [élément en verre très FRAGILE) dans chaque sac et placer les sacs sur le carrousel en métal.
- 360 mL de solution NDF sont introduits dans le bécher de l'appareil, ainsi que des billes de verre [possibilité d'ajouter de l'antimousse également).
- Porter à ébullition [thermostat max)
- Introduire DOUCEMENT le carrousel dans le bécher au moyen de la manette. Mélanger légèrement avec la manette afin que la solution pénètre bien dans tous les sacs.
- Placer le bécher sur la plaque chauffante ainsi que le ballon de refroidissement et porter à ébullition [3-5 min à chauffage maximum), puis réduire la puissance de chauffe afin d'obtenir un bouillonnement régulier [au niveau indiqué sur le bouton du thermostat].
- Mesurer exactement 60 minutes à partir du démarrage de l'ébullition.
- Après les 60 minutes, enlever le bécher de la plaque chauffante, retirer le carrousel [toujours avec la manette) et rincer le carrousel à l'eau chaude, puis à l'eau distillée chaude plusieurs fois [3 à 5 fois).
- Rincer ensuite chaque sac à l'eau distillée de manière à ce que toute trace du détergent soit éliminée [tripoter les sacs). Attention à ne pas perdre de produit en retirant les portes sacs en verre.
- Placer chaque sac dans le bécher d'origine.
- Placer les creusets à l'étuve à 105° [une nuit) et peser M1.
- Délasser [doucement) le solide dans le sac avant de passer à l'étape suivante. L'objectif est de désagglomérer les grumeaux. Attention à ne pas percer les sacs.

**2 Obtention de la fraction ADF [ACID DETERGENT FIBER]**

**2.1 Solution détergent acide**

N-cétyl NNN-triméthyl ammonium [bromure de]		
= bromure d'hexadécyltriméthylammonium	N°163	20 g
H2SO4 à 96%	N°329	28,8 ml
Eau distillée		QSP 1000 mL

La solution doit être stockée dans le noir à 18-20°C.

## **2.2 Procédure**

- Introduire un support de sac dans chaque sac et placer les sacs sur le carrousel en métal.
- 360 mL de solution ADF sont introduits dans le bêcher de l'appareil, ainsi que des billes de verre [possibilité d'ajouter de l'antimousse également].
- Introduire DOUCEMENT le carrousel dans le bêcher au moyen de la manette. Mélanger légèrement avec la manette afin que la solution pénètre bien dans tous les sacs.
- Placer le bêcher sur la plaque chauffante, le ballon de refroidissement et porter à ébullition [3-5 min à chauffage maximum), puis réduire la puissance de chauffe afin d'obtenir un bouillonnement régulier.
- Mesurer exactement 60 minutes à partir du démarrage de l'ébullition.
- Après les 60 minutes, enlever le bêcher de la plaque chauffante, retirer le carrousel [toujours avec la manette) et rincer le carrousel à l'eau chaude, puis à l'eau distillée chaude plusieurs fois [3 à 5 fois].
- Rincer ensuite chaque sac à l'eau distillée de manière à ce que toute trace du détergent soit éliminée [tripoter les sacs].
- Placer chaque sac dans le même bêcher.
- Placer les creusets à l'étuve à 105° [une nuit) et peser.
- Détasser [doucement) le solide dans le sac avant de passer à l'étape suivante. L'objectif est de désagglomérer les grumeaux. Attention à ne pas percer les sacs.

## **3 Destruction acide**

Cette étape nécessite de prendre des précautions de sécurité [gants, lunettes) car elle met en jeu de l'acide sulfurique concentré à 72%.

Toujours utiliser la bouteille d'acide sulfurique à 72% ! [Ne pas faire de dilution à partir d'acide à 96%).

## **3.1 Procédure**

- Désagglomérer les grumeaux dans les sacs [attention à ne pas les percer, travailler délicatement).
- Immerger chaque sac dans un petit bêcher contenant 40 mL d'acide sulfurique à 72%. Laisser agir 3 heures.
- Retirer les sacs et rincer abondamment à l'eau chaude [distillée).
- Rincer ensuite à l'eau distillée.
- Placer chaque sac dans le même creuset [ou bêcher en PYREX).
- Placer les creusets à l'étuve à 105°C [une nuit) et peser [M3].
- Placer les creusets au four à 550°C [2 h). Peser [M4].

## **4 Calculs**

Nous notons les différentes pesées successives :

T : tare du creuset ou bêcher

TS : masse du becher + sac

M0 : masse du becher + sac + échantillon

M1 : pesée après extraction NDF et séchage ;

M2 : pesée après extraction ADF et séchage ;

M3 : pesée après extraction ADL et séchage ;

M4 : pesée après calcination.

**Annexe 2** - Protocole d'analyse chimique de la composition de la biomasse du miscanthus utilisé par le laboratoire LANO

Nous notons également \_ms et \_mo les teneurs en matière sèche et en matière organique,

Calcul des résidus

Les résidus [NDF, ADF, ADL] s'expriment en fraction de la matière organique totale. Chaque résidu est calculé comme le reste après séchage moins le reste après calcination. Une correction par rapport à la masse du sac est effectuée [99,2% de la masse du sac est calcinée lors du passage à 550°C].

$$\text{NDF} = [[\text{M1}-\text{M4}-0,992)*[\text{TS}-\text{T})]/[[\text{MO}-\text{TS})*\tau_{\text{ms}}*\tau_{\text{mo}}$$

$$\text{ADF} = [[\text{M2}-\text{M4}-0,992)*[\text{TS}-\text{T})]/[[\text{MO}-\text{TS})*\tau_{\text{ms}}*\tau_{\text{mo}}$$

$$\text{ADL} = [[\text{M3}-\text{M4}-0,992)*[\text{TS}-\text{T})]/[[\text{MO}-\text{TS})*\tau_{\text{ms}}*\tau_{\text{mo}}$$

Calcul des fractions

A partir des résidus, nous pouvons calculer les quantités représentées par chaque fraction [les résultats sont exprimés en fraction de la matière organique] :

$$\text{SOLU} \text{ [fraction soluble]} = 1-\text{NDF}$$

$$\text{HEMI} \text{ [hémicellulose]} = \text{NDF}-\text{ADF}$$

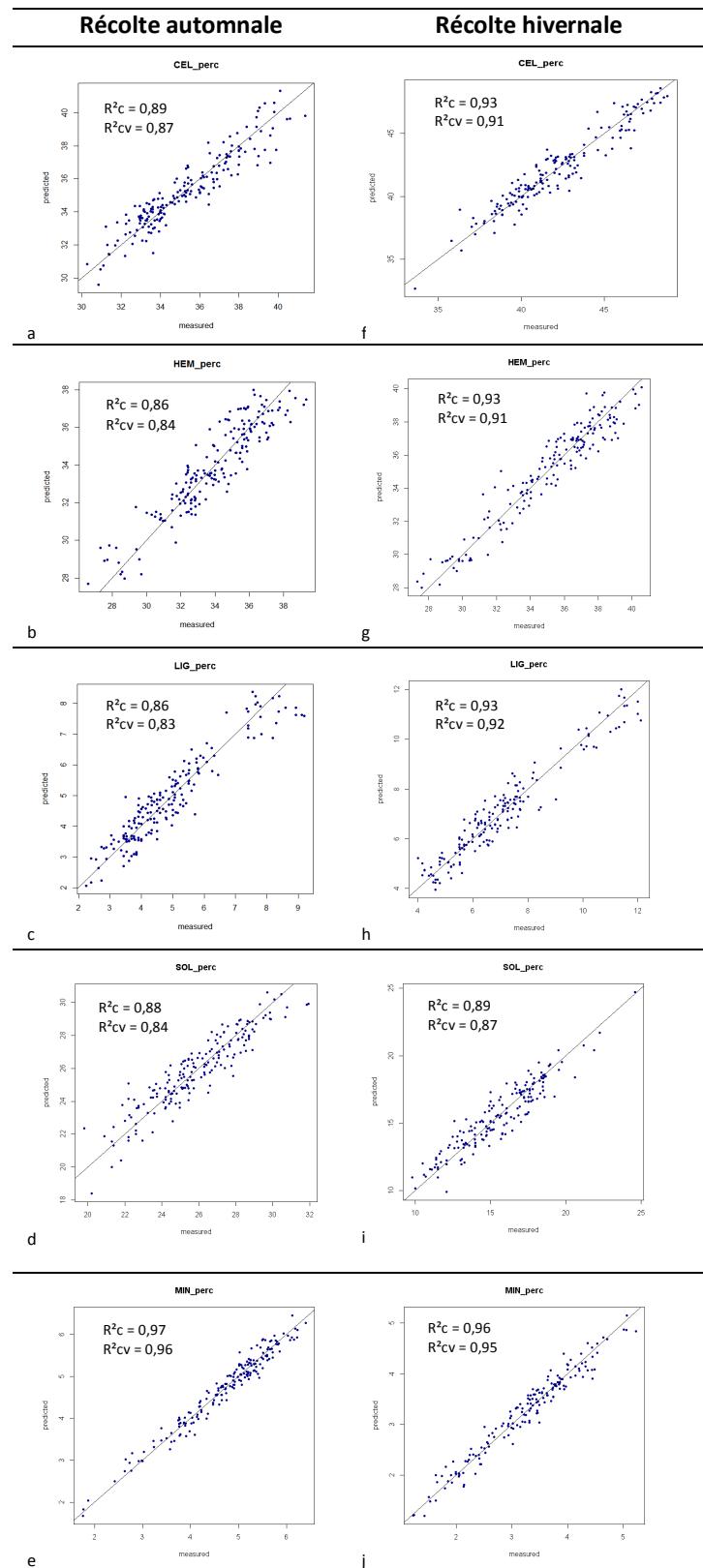
$$\text{CELL} \text{ [cellulose]} = \text{ADF}-\text{ADL}$$

$$\text{LIGN} \text{ [lignine]} = \text{ADL}$$

## **Annexe 3**

**Spectroscopie proche infra-rouge :  
corrélations entre les valeurs mesurées par  
analyses chimiques et les valeurs prédictes  
pour les différents constituants de la  
biomasse étudiés chez le miscanthus**

**Annexe 3 - Spectroscopie proche infra-rouge : corrélations entre les valeurs mesurées par analyses chimiques et les valeurs prédites pour les différents constituants de la biomasse étudiés chez le miscanthus**



**Figure A 3-1 : Corrélations entre les valeurs mesurées par analyses chimiques et les valeurs prédites par les modèles sélectionnés pour les teneurs des différents constituants de la biomasse étudiés**

Teneurs en cellulose (a, f), hemicelluloses (b, g), lignines (c, h), solubles (d, i), et cendres (e, j) des parties aériennes totales des individus en récolte automnale (colonne de gauche), et en récolte hivernale (colonne de droite). Abscisse = Teneur mesurée (%MS), Ordonnée = Teneur prédictée (%MS) ;  $R^2c$  = coefficient de détermination de la calibration ;  $R^2cv$  = coefficient de détermination de la validation croisée