



HAL
open science

Descripteurs physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in-situ

Joël Passicouset

► **To cite this version:**

Joël Passicouset. Descripteurs physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in-situ. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2019. Français. NNT : 2019IAVF0004 . tel-03200181

HAL Id: tel-03200181

<https://pastel.hal.science/tel-03200181>

Submitted on 16 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2019 IAVFF 0004

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement
(AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Génie des procédés

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Joël PASSICOUSSET

**Descripteurs physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique en
hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation *in-situ***

Directeur de thèse : Nicolas LOPES-FERREIRA

Co-encadrement de la thèse : Séverine HUMBERT, Fabienne GUILLON et Marie-Françoise DEVAUX

Thèse présentée et soutenue à Solaize, le 22 janvier 2019 :

Composition du jury :

M. Gabriel PAËS, Directeur de recherche, INRA de Reims
M. Stéphane GRELIER, Professeur, Université de Bordeaux
M. Dominique LACHENAL, Professeur, INP-PAGORA
M. Mathieu PETRISSANS, Professeur, Université de Lorraine
M. Nicolas LOPES-FERREIRA, Directeur de recherche, IFP Energies nouvelles
Mme Séverine HUMBERT, Ingénieure de recherche, IFP Energies nouvelles
Mme Fabienne GUILLON, Directrice de recherche, INRA de Nantes-Angers

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrante de thèse
Co-encadrante de thèse

IFP Energies Nouvelles
Etablissement de Lyon
rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3
69360 Solaize
France

Remerciements

Je remercie tout d'abord mes encadrants Séverine Humbert, Nadège Charon, Fabienne Guillon, Marie-Françoise Devaux, et Damien Hudebine, pour leur pour leurs aiguillages pertinents et leur investissement remarquable au cours de cette thèse. Le domaine d'expertise de chacun a pu être utile à différents moments de la thèse, et cette participation a été très appréciée. En particulier, je remercie Séverine et Nadège pour leur accompagnement quotidien, leur enthousiasme, leurs relectures, leur confiance, leurs conseils, leur patience et leur conciliation, qui ont été un support conséquent pendant ces trois années. Je remercie bien sûr mon directeur de thèse Nicolas Lopes-Ferreira pour ses diverses contributions qui m'ont permis de réaliser ces recherches dans un cadre scientifique privilégié.

Je tiens également à remercier les membres des différentes directions de l'IFPEN qui m'ont permis de travailler dans leurs locaux, ainsi qu'aux personnes qui ont pu participer en amont à l'émergence de ce projet de thèse.

Je remercie M. Gabriel Paës, M. Dominique Lachenal, M. Stéphane Grelier, et M. Mathieu Pétrissans, membres du jury de thèse, pour leur participation dans l'évaluation de mon travail, pour leurs remarques constructives et bienveillantes qui m'ont permis d'opérer des corrections judicieuses à ce manuscrit, et de regarder sous un autre angle le travail réalisé.

Mes remerciements vont également aux techniciens et ingénieurs des différents laboratoires qui ont été impliqués dans ce projet et sans qui ce travail n'aurait pas été accompli : Florent Moreau, Marion Lacoue-Nègre, Marie-Françoise Devaux, Nicolas Girod, Noémie Caillol, Laurent Lemaître, Philippe Lecour, Olivier Delpoux, Mickael Rivallan, Emmanuel Soyer, Amandine Ginet, Serge Boivineau, Michel Chalençon, Oualid Baroudi, Bastien Gay, Michael Legast, Jérémy Gajan, Yannick Blouet, Frédéric Neyret, Isabelle Cléménçon, Jérémie Barbier, Yves Benoît, Loïc Sorbier et Maxime Moreaud.

Je tiens également à remercier Charlotte Loustau-Cazalet avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans le cadre de nos deux thèses respectives, pour son travail complémentaire, son aide et ses explications toujours opportunes. Je te souhaite le plus grand succès pour la suite !

Je tiens à remercier le personnel de la ligne de lumière DISCO, Frédéric Jamme et Matthieu Réfrégiers qui m'ont formé et accompagné dans cette entreprise.

Je remercie Christine Chirat de l'école INP Pagora pour sa participation aux réunions annuelles de comité de pilotage, conjointement avec Frédéric Jamme.

Je remercie aussi les membres de l'INRA de Nantes-Angers avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui ont contribué de manière certaine à ce travail, Brigitte Boucher, Camille Alvarado, Sylvie Durand, Estelle Bonin, Laurent Helary, Loïc Foucat, et Xavier Falourd.

Je remercie Virginie Goncalves pour sa patience envers moi et les autres doctorants de la direction, concernant les aspects administratifs qui nous paraissent parfois complexes et bien mystérieux.

Je suis également reconnaissant envers les doctorants que j'ai pu rencontrer durant ces 3 années, certains devenus des amis, et qui dans tous les cas ont participé à la bonne humeur générale, Damien Dussol, Alexis Dubuis, Angélique Jallais, Federico Bussolati, Carole Reymond, Adrien Reynaud, Lina Jolivet, Etienne Girel, Charlotte Loustau-Cazalet, Caroline Urmès, Emile Moser, Larissa Brito Sousa, Sophie Bernadet, Ana Rita Costa Da Cruz, Venkat Nehru, Julie Guillemant, Ana Theresa Fialho Batista, Paul Hazeman, Mahmoud Kamaleddine, Jean-Jérôme Da Coasta Soares, Julien Crépier, Fabien Caron, Wei Zhao, Marisa De Sousa Duarte, Leonor Duarte Mendes Cartita, Svetan Kolitcheff, Coralie Demaret Rick Arneil Arançon, Céline Pagis, Clément Lesage, Maroua Moula, Ariane Albers, André Morgado Lopes, et ceux que j'oublie à cet instant.

J'ai une pensée particulière pour mes collègues de bureau qui m'ont supporté et aidé notamment les derniers temps de thèse, et retiendrai longtemps vos discussions sur la chromatographie, le fameux protocole miracle LLE, les super pouvoirs des couplages CPC-LC-UV/MS-SEC-SFC (tout en variant le

pH !), l'énigmatique LIBS, et bien sûr vos misères avec le mythique IT-ToF, sources inépuisables de discussions ! J'espère avoir été aussi enrichissant pour vous que vous ne l'avez été pour moi !

En dehors du cadre professionnel, je tiens à remercier mes amis, et en particulier Cyrille Barbay pour la période de fin de thèse, ma famille et ma belle-famille, dont le soutien et la joie de vivre ont constitué un socle essentiel. Je finirai par remercier ma moitié, Bertille Lescot-Renon, qui a toujours cru en moi, et dont l'énergie et la richesse de sa personne constituent une source inépuisable de force et d'inspiration.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
II.	Etat de l'art	5
1.	Introduction.....	5
a.	Contexte.....	5
b.	Les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en biocarburant.....	7
2.	Description multi-échelle de la paille de blé	10
a.	La composition chimique en macromolécules	10
b.	L'échelle des tissus.....	14
c.	Echelle cellulaire et ultrastructure cellulaire	16
d.	Conclusion sur la structure des biomasses lignocellulosiques.....	20
e.	Digestibilité spécifique des hétérogénéités	20
3.	L'hydrolyse enzymatique.....	23
a.	Cocktail industriel d'enzymes produites par <i>Trichoderma reesei</i>	23
b.	Les trois classes d'enzymes cellulolytiques	23
c.	Cas des LPMO et cellulosomes.....	25
d.	Paramètres clefs de l'hydrolyse enzymatique	26
4.	Les prétraitements de cuisson acide et d'explosion vapeur.....	26
a.	Cuisson à l'acide dilué.....	27
b.	Explosion vapeur.....	32
c.	Conclusion sur les prétraitements.....	35
5.	Paramètres physico-chimiques des biomasses prétraitées : caractérisation et lien avec la digestibilité enzymatique.....	36
a.	Taille et morphologie des particules	36
b.	Porosité et surface	37
c.	Cristallinité de la cellulose	42
d.	Composition, structure et propriétés chimiques	44
e.	Gouttes de lignine et pseudo-lignine/humines solides	49
f.	Caractérisation morphologique et chimique combinée.....	51
g.	Conclusion sur les paramètres physico-chimiques et leur caractérisation.....	56
6.	Conclusion générale.....	60
III.	Objectifs et stratégie de la thèse	63
1.	Objectifs de la thèse.....	63
2.	Choix de la paille de blé et constitution d'un lot d'échantillons cohérents.....	64
3.	Stratégie de la thèse.....	64
IV.	Matériels et méthodes.....	65
1.	Les techniques expérimentales.....	65
a.	L'hydrolyse enzymatique	66
b.	Caractérisations morphologiques.....	67
c.	Caractérisation de la porosité : analyse par physisorption d'azote.....	70

d.	Caractérisations chimiques.....	71
e.	Imagerie dynamique de dégradation enzymatique par microscopie à fluorescence dans l'UV profond.....	79
2.	Les échantillons de l'étude.....	91
f.	La production des échantillons : les prétraitements.....	91
g.	Echantillons étudiés.....	96
V.	Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique.....	101
1.	Effets du traitement à l'acide dilué.....	101
a.	Rappel de la composition des substrats et du rendement en glucose dépendamment de la sévérité de prétraitement.....	101
b.	Propriétés physiques et morphologiques.....	102
c.	L'état de porosité.....	108
d.	Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique.....	111
e.	Les modifications des propriétés chimiques.....	113
f.	Conclusion sur l'impact du prétraitement à l'acide dilué sur les substrats.....	125
2.	Effets de la détente explosive.....	126
a.	Rappel de la composition des substrats et du rendement en glucose dépendamment de la sévérité de prétraitement.....	126
b.	Evolution de la granulométrie.....	128
c.	Evolutions morphologiques.....	129
d.	Etat de porosité.....	130
e.	Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique.....	131
f.	Cristallinité de la cellulose.....	132
g.	Conclusion sur l'effet de la détente explosive.....	133
3.	Conclusion.....	133
VI.	Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose	135
1.	Evolution de la conversion en cellulose au cours du temps : modèle cinétique empirique.....	135
2.	Effets du prétraitement sur la conversion de la cellulose.....	136
a.	Le traitement à l'acide dilué.....	136
b.	L'effet de la détente explosive.....	138
3.	La recherche de descripteurs.....	140
a.	Propriétés chimiques.....	140
b.	La taille des particules.....	147
c.	L'état de porosité et état de surface.....	148
d.	Synthèse : proposition de descripteurs.....	154
4.	Mise en équation.....	154
a.	La méthodologie.....	154
b.	La détermination de l'expression du R_m	155
c.	La détermination de l'expression de la constante de vitesse k	158
d.	Le rendement en glucose exprimé au cours du temps à partir des descripteurs.....	159

e.	Mise à l'épreuve du modèle de prédiction du Rm.....	162
f.	Discussions sur le modèle.....	162
g.	Synthèse.....	164
VII.	Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique.....	167
1.	Les prélèvements au cours de l'hydrolyse.....	167
a.	Les échantillons de l'étude.....	167
b.	Les paramètres suivis.....	168
c.	La cinétique de dégradation.....	168
d.	Le suivi de la taille des particules.....	169
e.	La morphologie à différentes échelle par MEB.....	171
f.	Le suivi de la composition chimique.....	175
g.	Le suivi de l'état de porosité par physisorption d'azote.....	176
h.	Discussions sur le suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique.....	178
i.	Conclusion sur le suivi <i>ex situ</i> de la matrice lignocellulosique.....	181
2.	Les analyses <i>in situ</i> en fluorescence dans l'UV profond au synchrotron SOLEIL.....	185
a.	Les matériaux de l'étude.....	185
b.	Les études préliminaires.....	186
c.	Rappel du protocole d'expérimentation.....	186
d.	Observations en début d'hydrolyse.....	187
e.	Les tissus et particules observés.....	188
f.	Exemple d'un suivi de dégradation enzymatique.....	194
g.	La méthodologie d'analyse des échantillons.....	196
h.	Exploitation des résultats.....	199
i.	L'analyse du substrat peu prétraité.....	206
j.	L'analyse des substrats prétraités à plus forte sévérité.....	214
k.	Discussion : digestibilité des tissus, dépendamment des conditions de prétraitement.....	219
l.	Mode d'adsorption des enzymes sur les particules digestes.....	225
m.	Conclusions et perspectives sur les expérimentations DISCO.....	228
3.	Conclusion.....	231
a.	Scénario d'hydrolyse enzymatique d'une biomasse prétraitée à l'acide dilué.....	231
b.	Lien avec les descripteurs définis au chapitre précédent.....	232
c.	Synthèse des descripteurs et enjeux pour le procédé de conversion.....	232
VIII.	Conclusions et perspectives.....	235
1.	Conclusions.....	235
2.	Perspectives.....	237
IX.	Références.....	239
X.	Glossaire.....	257
XI.	Annexes.....	259
1.	Equivalence entre surface BET et le volume poreux.....	259
2.	Intensité d'autofluorescence à l'échelle des parois.....	259

3. Observations en MEB d'échantillons hydrolysés, en zones repérées.....	260
4. Stabilité des substrats lignocellulosiques immergés sans enzymes.....	261
5. L'autofluorescence UV-VIS des stomates	263
6. La contribution des tissus non lignifiés dans le rendement en glucose.....	264
7. Expérimentations synchrotrons : analyse des tissus minoritaires des échantillons C020C et D020C	265

Liste des abréviations et acronymes

% ms : pourcentage de masse sèche

% pds : pourcentage en poids (massique)

% vol : pourcentage volumique

5-HMF : 5-(hydroxyméthyl)furfural

ACP : analyse en composantes principales

AFM : *atomic force microscope*

AHC : acides hydroxycinnamiques

ATR : *attenuated total reflectance*

BJH : Barret, Joyner, Halenda, nom de la méthode utilisée pour déterminer notamment la distribution en taille de pores en physisorption d'azote, soit par l'isotherme d'adsorption, soit par l'isotherme de desorption.

BET : Brunauer, Emmett, Teller, nom de la méthode d'estimation de la surface poreuse par physisorption d'azote

BtL : *biomass to liquids*

CAPEX : *capital expenditure*, dépenses d'investissement, ou immobilisations (dépenses) qui ont une valeur positive sur le long terme

CBH : cellobiohydrolases

CP : composante principale

CPMAS : *cross polarisation magic angle spinning*

CCD: *charge-coupled device*

DRX : diffraction des rayons X

EDS : *energy dispersive spectroscopy*

EG : endoglucanases

ETD : *Edward-Thorney detector*

EUA : Etats-Unis d'Amérique

FTIR : *Fourier transform infra-red*

HPLC : *high-performance liquid chromatography*

LPMO : *lytic polysaccharide mono-oxygenases*

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscope électronique en transmission

NREL : *national renewable energies laboratory*

P_0 : pression normale de référence ($P_0=1013,25$ Pa)

PLS : *partial least square*

R&D : recherche et développement

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMSEC : *root-mean square error of calibration*

RMSECV : *root-mean square error of cross validation*

ROI : *region of interest*

SNV : *standard normal variate*

UAIE : unité arbitraire d'intensité de fluorescence des enzymes

UAIP : unité arbitraire d'intensité de fluorescence des parois

UAIT : unité arbitraire d'intensité lumineuse en transmission

UV-VIS : domaine de l'ultraviolet au visible

WRV : water retention volume

XPS : *X-ray photoelectron spectroscopy*, aussi appelée ESCA (*extreme surface chemical analysis*)

I. Introduction

La situation énergétique actuelle pose de nombreux défis à relever en termes de pollution, de gestion des ressources renouvelables et non renouvelables ainsi que d'économie d'énergie, en prenant aussi en compte des critères socio-environnementaux ou géopolitiques souvent critiques. Pour franchir le gouffre qui nous sépare d'une situation viable, vivable et équitable, plusieurs stratégies fortes doivent être mises en place, d'ordre politique, technologique, et bien sûr, concernant les modes de consommation.

Différents domaines de l'énergie sont concernés par ces programmes, avec parmi eux, la thématique des carburants qui doivent par définition contenir une densité énergétique conséquente, être transportables, stables et immédiatement disponibles. La loi sur la transition énergétique pour la croissance verte du 17 août 2015 fixe des objectifs en termes de consommation d'énergies renouvelables, notamment de biocarburants, pour limiter nos consommations d'énergie fossile et contribuer au respect de l'Accord de Paris (objectif de maintien du réchauffement climatique en dessous de 2 °C). A partir des années 70 et suite au premier choc pétrolier, l'intérêt naissant pour les biocarburants dits de première génération, ou agrocarburants, constituait une première démarche pour s'émanciper de la dépendance au pétrole, par l'utilisation de ces carburants un peu plus responsables. Ceux-ci peuvent être issus des plantes sucrières (betterave, canne à sucre), amylacées (maïs, blé), ou bien oléagineuses (colza, palmier à huile). Cependant, par leur concurrence d'un point de vue alimentaire, mais aussi par leur implication dans la dégradation des sols et dans la déforestation (canne à sucre au Brésil, maïs aux Etats-Unis d'Amérique, palmier à huile en Indonésie, colza et betterave sucrière en Europe), leur utilisation ne peut satisfaire les bénéfices écologiques et climatiques attendus face au désastre à venir. Au cours des années 2000, le présage d'une deuxième génération de biocarburants (appelés aussi biocarburants avancés), suscita beaucoup d'attentes. En effet, ils consistent en l'utilisation de substrats dits lignocellulosiques pour créer, *via* des procédés spécifiques, les carburants souhaités. Ces matières premières peuvent être selon le cas, des résidus de l'industrie agricole et forestière ou encore produites à partir de cultures dédiées. Les trois fractions majoritaires de ces substrats sont la cellulose, les hémicelluloses, et la lignine. L'utilisation de substrats avec une moindre empreinte carbone, et sans usage alimentaire, ni implication directe dans la déforestation, représentaient une alternative crédible aux carburants réguliers (d'origine fossile) et agrocarburants (première génération). Cependant, et pour des raisons de coût de production, la première génération de carburants bio-sourcés constitue toujours la principale source renouvelable des carburants utilisés pour les transports à l'heure actuelle. En 2015, une directive (2015/1513) confirmait l'objectif d'incorporation de 10 % d'énergies renouvelables dans les transports en 2020 avec un plafond de 7 % pour les biocarburants en concurrence alimentaire et un objectif indicatif de 0,5 % en 2020 pour les biocarburants avancés. De ce fait, l'optimisation des procédés de production des biocarburants de seconde génération est primordiale pour espérer un déploiement significatif et supérieur à l'objectif déjà peu ambitieux de la directive.

Parmi les différentes technologies proposées dans le domaine des biocarburants de 2^{ème} génération, la conversion biochimique de substrats lignocellulosiques constitue l'une des plus matures. Dans cette voie, la méthanisation de même que la production d'éthanol cellulosique constituent les approches les plus crédibles. Si la méthanisation est rustique à la production, l'usage de biogaz reste peu commode, ce qui explique son déploiement limité malgré son attractivité économique potentielle. A l'inverse, la production d'éthanol cellulosique par conversion biochimique peine à rencontrer la viabilité économique, mais son utilisation directe dans le parc automobile à essence par exemple, en fait un combustible de choix. Par ailleurs sa faible empreinte carbone participe à son attractivité d'un point de vue environnemental : il est estimé que pour produire 1 Btu (*British Thermal Unit*) d'éthanol cellulosique, 0,1 Btu d'origine fossile est nécessaire, alors qu'il en faut 0,75 Btu dans le cas d'éthanol conventionnel [1]. Malgré cela, l'éthanol cellulosique peine à se développer sur la scène internationale : la capacité cumulée mondiale et annuelle des différentes unités de production d'éthanol cellulosique était seulement de 358 kt d'éthanol cellulosique sur l'année 2016 [2] alors que la production annuelle mondiale d'éthanol de première génération s'élevait à 94 Mt sur la même année 2016 [3]. L'amélioration des performances de production de l'éthanol cellulosique fait donc l'objet d'efforts importants.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du procédé de production d'éthanol cellulosique. Ce procédé comprend plusieurs étapes : dans un premier temps, la biomasse récoltée est soumise à des traitements pouvant être thermiques, chimiques, mécaniques ou encore un couplage de plusieurs modes d'action, afin de rendre la cellulose plus accessible et plus digeste à l'étape qui suit. Cette étape est appelée l'hydrolyse enzymatique (ou encore, étape de saccharification) car, durant cette phase réalisée en milieux aqueux, des enzymes cellulolytiques clivent les chaînes de cellulose en unités de glucose monomérique. L'hydrolyse enzymatique ne peut pas être réalisée sur des substrats non traités car la cellulose présente n'est que très peu accessible, ce qui mène à des taux de conversion particulièrement faibles (environ 20 %). Après cette hydrolyse enzymatique, le glucose obtenu est finalement fermenté en éthanol qui, une fois distillé et purifié, peut être utilisé dans les moteurs de type essence (en tant que mélange comme en France, ou pur comme au Brésil). Ce procédé possède un certain nombre d'atouts qui expliquent l'attrait qu'il a suscité en termes de R&D durant les deux dernières décades. Tout d'abord, il s'agit d'un des rares procédés qui permette l'obtention d'une coupe de carburant compatible avec les essences. Ensuite, le rendement énergétique de ce procédé est potentiellement élevé : par l'approche enzymatique plutôt que thermochimique, la sélectivité de la réaction d'hydrolyse est très grande, et en évitant l'approche bactérienne à l'étape d'hydrolyse des macromolécules (cas de la méthanisation), les pertes énergétiques occasionnées par le métabolisme des bactéries sont épargnées, qu'il soit hétérotrophe ou autotrophe. De plus, les conditions opératoires utilisées sont relativement douces, y compris pour l'étape de prétraitement, comparativement à la plupart des autres procédés de conversion de ces substrats. Pour 1 t de biomasse sèche (rafles de maïs), 2,8 quintaux d'éthanol sont obtenus, ainsi qu'une fraction de lignine valorisable en cogénération (chaleur-électricité) par exemple [4]. Cependant, ce procédé présente aussi un certain nombre de désavantages. D'abord l'éthanol produit par ce procédé ne peut qu'être plus dispendieux que l'éthanol de première génération, car il s'agit grossièrement du même schéma de production mais pour lequel une à deux étapes critiques sont rajoutées, en raison des substrats plus difficiles à convertir. Dans le même ordre d'idée, on peut faire remarquer que le prix de la pulpe de cellulose est présentement plus élevé que le prix de l'éthanol, or suivant le type de prétraitement qui est choisi (alcalin en l'occurrence), le produit intermédiaire avant l'hydrolyse enzymatique est justement une pâte de cellulose. De ce fait, il reste plus rentable de vendre la cellulose plutôt que de la convertir en éthanol qui a un prix de vente inférieur.

En tout état de cause, les étapes de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique sont particulièrement importantes à optimiser car le prétraitement détermine l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique qui est l'étape limitante en termes de rendement de conversion de la cellulose présente. Ce prétraitement possède un coût énergétique et chimique qui doit être limité au maximum tout en garantissant une digestibilité maximale des substrats prétraités.

Plusieurs technologies de prétraitement sont envisageables : le traitement à l'acide dilué et le prétraitement d'explosion à la vapeur figurent parmi les candidats crédibles dans l'optique d'un développement à plus grande échelle. Le traitement à l'acide dilué consiste à chauffer (120-200 °C le plus souvent) sous pression la biomasse humidifiée avec une faible concentration d'acide. Quant à l'explosion à la vapeur, elle repose sur le même principe que celui du traitement à l'acide dilué (la biomasse humide est chauffée sous pression, en présence d'acide ou non), mais est complétée par une étape de détente explosive en fin de prétraitement. La pression est brutalement relâchée afin que la biomasse s'extrait rapidement du réacteur tout en induisant un effet mécanique d'explosion sur la matrice. Par ailleurs, lorsque l'explosion à la vapeur est réalisée sans acide, la gamme de températures est légèrement plus élevée (170 à 240 °C généralement). Dans les deux cas, le prétraitement a notamment pour effet d'hydrolyser les hémicelluloses, ce qui contribue grandement à augmenter l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes cellulolytiques. Les monomères des différents sucres provenant de ces hémicelluloses seront fermentés de la même manière que le glucose issu de la cellulose après hydrolyse enzymatique, ce qui participe à améliorer le rendement global du procédé et limite la production de fractions non utilisées. Les prétraitements d'explosion à la vapeur et à l'acide dilué seront les prétraitements étudiés au cours de la thèse.

Dans le but d'améliorer les performances de la succession des étapes prétraitement-hydrolyse enzymatique, de nombreuses études s'intéressent depuis une vingtaine d'années à établir les liens entre le prétraitement et l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique notamment par l'étude des paramètres physicochimiques critiques qui sont susceptibles d'améliorer ou limiter la conversion de la cellulose lors de la saccharification. Malgré un certain nombre d'avancées dans ce domaine, il demeure des lacunes sur le

sujet. Cela s'explique par la structure des biomasses lignocellulosiques, complexe en termes d'agencement et d'hétérogénéités à différentes échelles (tissus, cellules, parois cellulaires, et même à une échelle inférieure). Il s'agit donc d'identifier l'implication relative dans la digestibilité du substrat prétraité de paramètres nombreux, de différentes natures et souvent interdépendants les uns des autres. Pour étudier les liens entre les conditions opératoires de prétraitement, les modifications physicochimiques apportées, et leurs effets sur la digestibilité des substrats, il paraît donc nécessaire de se munir d'une palette d'échantillons variés et choisis de manière cohérente, afin de générer une variabilité forte des paramètres physicochimiques qui seront étudiés. Du point de vue de l'étude des substrats, il sera essentiel d'adopter une démarche analytique multi-échelle de caractérisation, et par là-même, multi-technique.

Le but de cette thèse est donc de déterminer les caractéristiques physicochimiques qui dirigent l'efficacité de la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique, par l'intermédiaire d'une caractérisation pertinente au niveau des échelles d'organisation de la matière. **Le substrat considéré tout au long de l'étude est une paille de blé, pour laquelle les prétraitements subis seront le traitement à l'acide dilué et l'explosion à la vapeur.** La variabilité des échantillons analysés sera fournie par l'utilisation d'une gamme de conditions opératoires très large.

Ce manuscrit débute par une première partie qui dresse un bilan actuel de l'état de l'art concernant la description de la biomasse lignocellulosique (et plus particulièrement la paille de blé), le principe de la conversion biochimique de la biomasse en éthanol cellulosique, et finalement des paramètres susceptibles d'impacter la digestibilité des substrats durant l'étape de saccharification. La méthodologie et la stratégie de la thèse y sont ensuite développées dans le chapitre III. Les protocoles, préparations d'échantillons, traitements de données et conditions opératoires de production des différents échantillons que nous avons mis en œuvre sont présentés dans le chapitre IV. Le chapitre V est ensuite dédié à la description des effets induits par les prétraitements (à l'acide dilué dans un premier temps, puis d'explosion à la vapeur) sur les propriétés physicochimiques de la paille de blé étudiée. Basée sur ces résultats, le chapitre VI porte sur la recherche des descripteurs de l'hydrolyse enzymatique. Afin de comprendre certains mécanismes impliqués lors de la dégradation enzymatique des substrats, le chapitre VII est ensuite consacré à l'analyse des substrats par différentes approches. La première approche abordée traite de la caractérisation de substrats partiellement hydrolysés en réalisant des prélèvements au cours du temps (approche *ex situ*), alors que la seconde approche consiste à suivre en temps réel la dégradation enzymatique par une technique particulière de microscopie (approche *in situ*). Finalement, le chapitre VIII clôture ces travaux de recherche en rappelant les principales conclusions obtenues tout au long de cette thèse. Dans cette même partie, les perspectives souhaitées pour ce projet sont également proposées.

II. Etat de l'art

1. Introduction

a. Contexte

L'évolution du contexte énergétique est marquée par un besoin mondial croissant en énergies alors que ces dernières sont issues principalement de ressources limitées (pétrole, charbon, gaz, etc...), et par une pollution anthropique critique, si bien qu'il est de plus en plus nécessaire de relever un certain nombre de défis environnementaux. Face à de telles problématiques, une des solutions possibles consistent en un mix énergétique renouvelable, en combinaison avec une sobriété énergétique et une recherche intense dans le domaine des technologies de stockage de l'énergie. Dans ce cadre particulier, les carburants biosourcés s'inscrivent comme une des composantes du mix énergétique dans le domaine du transport.

Si l'utilisation de carburants biosourcés est relativement ancienne (tout début du XX^{ème} siècle, puis première et deuxième guerres mondiales), la recherche et le développement significatif dans le domaine des agrocarburants débutèrent dans les années 70 à la suite du premier pic pétrolier, avec des périodes de désintérêt ou au contraire d'efforts réitérés suivant le cours du pétrole et les engagements écologiques des pays. Ces agrocarburants sont dits de première génération et sont issus des réserves énergétiques des végétaux, sucrées ou amylacées dans le cas d'une fermentation en éthanol pour une incorporation dans les essences, ou oléagineuses dans le cas d'une estérification des huiles pour une incorporation dans le diesel. Cependant les substrats utilisés sont par essence les mêmes que ceux utilisés pour l'alimentation humaine ou animale (maïs, colza, tournesol, palme, arachide, betterave...), ce qui entraîne une compétition avec la filière alimentaire pour l'exploitation des sols. Les conséquences sont multiples : concurrence alimentaire, tension sur les prix (aux EUA, et Brésil par exemple, [5]), déforestation, et également appauvrissement, pollution et minéralisation des sols. Le bilan global de cette première génération d'agrocarburants est mitigé et leur existence est sujette à de nombreuses polémiques. Ainsi, de nombreuses recherches sont maintenant dédiées à d'autres générations de carburants biosourcés dits de deuxième, troisième voire quatrième génération suivant le degré de maturité technologique et la nature du substrat utilisé.

La deuxième génération de carburants biosourcés (dits 2G) utilise comme substrat la partie lignocellulosique des plantes, c'est-à-dire les parties fibreuses (pailles et tiges, bois, feuilles, écorces), constituées principalement de cellulose, d'hémicelluloses, et de lignine. Cette ressource présente plusieurs avantages : pas de concurrence directe avec le secteur alimentaire, ressource rustique et abondante pouvant être prélevée dans différents secteurs. Elle correspond à des résidus de sylviculture, d'agriculture, ou encore à des cultures énergétiques dédiées, moins demandeuses en eau et en intrants que les plantes à usage alimentaire (et pouvant donc pousser sur des terres non dédiées aux plantes alimentaires, ou en jachère). Ces cultures dédiées peuvent même être utilisées pour rétablir la qualité de certains sols, en termes nutritifs (cas des légumineuses de manière générale, comme la luzerne, [6]), d'érosion et de structure du sol (panic érigé par exemple, [7]), de dépollution des sols par phytoremédiation (peuplier, saule, miscanthus... [8,9]). A ce tableau positif il faut cependant anticiper un certain nombre de problèmes, comme la déforestation, la désertification, la perte de biodiversité, ou encore l'appauvrissement et l'érosion des sols. Le déploiement de ces agrocarburants de 2^{ème} génération est donc prévu à moyen voire long terme suivant les progrès de la recherche et le type de gestion des ressources qui sera envisagé. Par ailleurs il faut aussi garder en tête qu'une partie de ces substrats est actuellement utilisée dans de nombreux secteurs (industries du bois ou du papier, fabrication de bioproduits, etc...), et donc pourront être potentiellement en concurrence en termes de disponibilité. A plus long terme les biocarburants de troisième génération devraient compléter le mix énergétique. Durant la dernière décennie débuta l'étude d'autres substrats, en l'occurrence les algues et cyanobactéries comme source de biocarburants 3G. Le premier avantage de cette troisième génération est le fait que ces substrats (lipidiques ou cellulosiques principalement) minimisent l'occupation de surfaces terrestres pour leur production. De plus, le

rendement photosynthétique global par m² est potentiellement bien plus important que celui des plantes terrestres (d'un facteur 30 à 100 fois d'un point de vue théorique). Cependant d'un point de vue technique, le coût de revient des carburants produits est habituellement trop cher, principalement à cause du volant important en eau du procédé et des coûts de séparation associée (10€/kg, [10]). Des optimisations biologiques passent par un milieu de culture enrichi en CO₂ (issu d'une cimenterie, d'une centrale thermique ou d'une unité de fermentation par exemple) et à flux constant de nutriments. D'un côté, le déploiement des procédés de 3^{ème} génération pourrait ainsi réduire le bilan carbone des industries à fortes émissions en CO₂, mais, d'un autre côté, cela pourrait favoriser et non pénaliser ces industries fortement émettrices de CO₂. Dans un tel cas, les biocarburants de 3^{ème} génération ne constitueraient qu'une valorisation du carbone fossile, sauf si la source de CO₂ est elle-même biosourcée (unité de méthanisation ou de fermentation éthanolique par exemple).

Dès lors, on comprend le rôle charnière que représentent les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique, entre la première génération de biocarburants dont les problèmes associés sont connus mais rentables, et la troisième génération plus vertueuse mais pas assez mature.

Différentes voies de conversion de la biomasse lignocellulosique sont développées à IFP Energies nouvelles (Figure 1) et font appel à des conditions opératoires très différentes pour transformer les trois familles majoritaires de biopolymères qui composent la biomasse : la cellulose, les hémicelluloses, et la lignine.

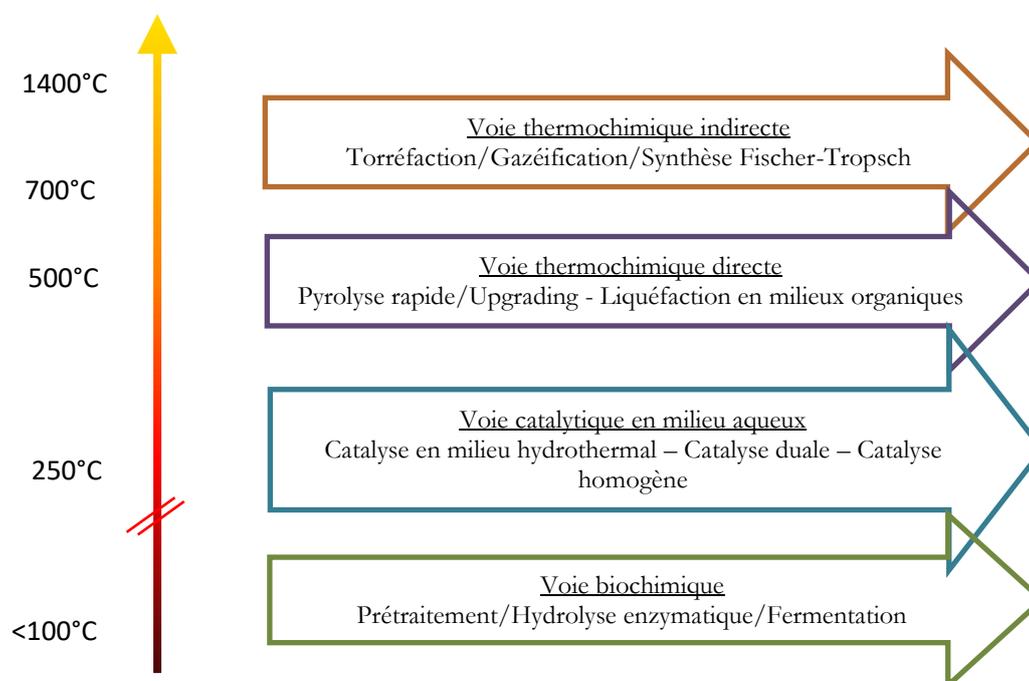


Figure 1 : Schéma représentant différentes voies de conversion de la biomasse lignocellulosique pour la production de biocarburants 2G, classées par ordre décroissant de température du procédé

La filière de la conversion biochimique est plutôt mature comparativement aux autres voies de conversion de la biomasse en carburants liquides. Un certain nombre d'unités pilotes existent, de même que de démonstrateurs (notamment Futurol et Iogen), et mêmes d'unités industrielles (sociétés Enerkem, et Borregaard). De nouvelles unités sont également prévues dans les prochaines années, notamment aux EUA et Canada. Cependant, leur CAPEX par baril par jour étant plus élevé que les unités de bioéthanol de première génération (d'un facteur 1,5 pour deux unités ayant une production journalière d'environ 1000 barils par jour [11]), leur déploiement est lent et anecdotique, freiné par les coûts d'investissements et de maintenance. Les politiques volontaristes *via* des quotas obligatoires d'incorporation ou *via* des systèmes de taxation/crédits de chaque pays sont alors décisives.

b. Les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en biocarburant

i Les substrats

Les substrats de biomasse lignocellulosique peuvent provenir globalement de trois sources, à savoir les résidus agricoles ou forestiers, les cultures dédiées et les déchets verts. Dans le cas des cultures dédiées, une étape supplémentaire (la culture, et donc avec un coût potentiel additionnel) est présente. Des voies de recherche existent d'ores et déjà, afin d'optimiser le coût de la ressource. Par exemple, compte tenu du caractère réfractaire connu de la biomasse envers la digestibilité enzymatique, des équipes travaillent sur l'optimisation des cultivars en termes, par exemple, de croissance, de résistance au stress hydrique, de taux et type de lignine, ou encore de rusticité. L'optimisation globale des facteurs qui concernent la matière première est particulièrement importante de par le coût important de la biomasse, qui peut représenter jusqu'à 25 % du coût du procédé [12].

Les cultures énergétiques dédiées (herbacées, plantes fourragères annuelles ou vivaces)

De nombreux candidats pour la conversion de biomasse lignocellulosique en bioéthanol sont souvent cités, dont le panic érigé (*Panicum virgatum*), le miscanthus (*Miscanthus x giganteus*), l'alpiste des Canaries, (*Phalaris canariensis*), la canne de Provence (*Arundo donax*), la canne à sucre sauvage (*Saccharum spontaneum*), l'herbe à éléphant (*Pennisetum purpureum*), et la quenouille (*Typha Latifolia*), essentiellement pour leur grande efficacité photosynthétique ou leur grande abondance et leur caractère invasif. Ainsi, dans des conditions pédoclimatiques favorables, certaines de ces plantes sont dotées d'un mécanisme photosynthétique spécifique (dit en C4) qui permet une même concentration en CO₂, de synthétiser une plus grande quantité de matière organique carbonée, comparativement aux plantes utilisant le mécanisme photosynthétique "classique", dit en C3 [13], pour lequel la concentration en CO₂ est souvent le facteur limitant de leur croissance (la présence de dioxygène diminue l'efficacité de l'enzyme RuBisCo qui catalyse la réduction du CO₂).

Les sources forestières

Le bois, mais également les copeaux et autres résidus d'exploitations forestières (écorce par exemple), sont également des sources cellulosiques potentielles pour une conversion biochimique en éthanol. Ces sources peuvent provenir de forêts mais également de zones de plantations spécifiques d'arbres. Dans ce dernier cas, les stratégies proposées évoquent souvent des cultures d'essences à forte croissance et récoltées par courtes rotations (peuplier et saule figurent parmi les essences les plus populaires), ce qui les rapproche plutôt des cultures énergétiques de la partie précédente. Il s'agit alors de choisir les espèces les moins demandeuses en eau et en intrants, les plus résistantes aux agents pathogènes, présentant un bon compromis entre densité structurale et récalcitrance en hydrolyse enzymatique, avec une croissance économiquement viable. Parmi les deux grandes typologies d'arbres qui peuvent être récoltés, plusieurs essences pertinentes se dégagent : pin, cèdre, épicéa, cyprès, sapin, et pruche de l'Ouest pour ce qui est des conifères, et peupliers, saule, certains chênes, et bouleau pour ce qui est des feuillus, en notant que les peupliers et plus encore les saules ont des besoins en eau conséquents. Enfin, les essences sont à adapter dépendamment du climat et du biotope local.

Les résidus agricoles

Les cultures agricoles génèrent, en plus de la ressource alimentaire, une grande quantité de composés lignocellulosiques sous forme de résidus agricoles, qui peuvent provenir du maïs (rafles, feuilles et tiges), du blé, du riz, et de manière générale des cultures céréalières (paille), ou encore de la canne à sucre (bagasse). Ces produits étaient jusqu'à présent mis à terre, brûlés (par exemple la culture de canne à sucre sur brûlis), récupérés pour le paillage, la construction, le compostage, la méthanisation ou encore pour la fabrication de fibres textiles. L'utilisation pour une production de biocarburants est particulièrement pertinente dans les zones où cette matière n'était jusqu'à présent pas valorisée. Cependant, il convient de faire remarquer que pour maintenir la productivité et la santé des sols, il est conseillé de ne pas trop

prélever, pour rapporter à la terre suffisamment de matière carbonée stable, ceci contribuant au maintien et renouvellement de l'humus, à la rétention d'eau, à la vie du sol et à sa productivité.

ii Les technologies de conversion

Comme on l'a vu en Figure 1, plusieurs types de procédés de conversion existent, et peuvent être classés suivant la température utilisée. On décrit brièvement ci-dessous ces procédés.

Les voies thermochimiques indirectes

Ce premier mode de conversion désigné sous l'acronyme BtL (*Biomass to Liquids*) consiste à créer un biocarburant par conversion thermochimique. Plusieurs variantes sont possibles. L'une d'elles, basée sur une approche indirecte (déconstruction de la matière puis reconstruction) comprend trois étapes principales :

- La torréfaction, qui a lieu entre 200 °C et 300 °C en milieu anaérobie, a pour but de densifier le contenu énergétique de la biomasse en vue de sa conversion. La matière est partiellement désoxygénée. Elle est plus friable et demande moins d'énergie pour être broyée sous forme de poudre, facilitant ainsi l'étape suivante.
- La gazéification s'opère à des températures comprises entre 700 et 1400 °C, en présence d'oxygène. Elle casse les molécules et macromolécules de la biomasse torréfiée en une fraction gazeuse constituée majoritairement de dihydrogène et de monoxyde de carbone (plus des impuretés telles que CO₂, H₂S, COS, HCN, etc...).
- La synthèse Fischer-Tropsch permet, une fois les gaz nettoyés et rectifiés, de recombinaison le mélange CO + H₂ sous la forme de paraffines linéaires utilisables par la technologie Diesel.

Les voies thermochimiques directes

Les voies thermochimiques directes consistent simplement à liquéfier la biomasse lignocellulosique solide pour la rendre plus exploitable (facilité de transport et de stockage, densification énergétique, etc...) en la chauffant à des températures intermédiaires (400 et 600 °C) et sous forte pression, afin d'obtenir une fraction gazeuse (composée majoritairement de CO₂, CH₄, CO, H₂, C₂H₄, C₂H₆, C₃H₆ et C₃H₈), mais également une bio-huile de pyrolyse rapide, et un solide "char", semblable à un charbon [14]. La bio-huile, fortement oxygénée, n'a pas les qualités requises pour être utilisée directement comme carburant et nécessite une mise à niveau catalytique (*upgrading*) pour la rendre utilisable dans le domaine des transports (essences, kérosènes, gazoles).

Les voies hydrothermales

Une des voies de conversion catalytique de la biomasse lignocellulosique propose de se placer en milieu aqueux, dans un domaine proche du point critique de l'eau (374,1 °C à 22,1 MPa), eau qui présente alors un comportement singulier (on parle de milieu hydrothermal) qui peut être exploité afin de modifier la structure et la composition chimique de la biomasse. Plus précisément, ce milieu peut être considéré comme un milieu catalytique acide et basique par la très forte autoprotolyse de l'eau et est propice à la solubilisation des composés organiques, et. Suivant les conditions opératoires, la biomasse traitée et partiellement solubilisée pourra être hydrolysée par voie enzymatique, hydro-liquéfiée, ou encore gazéifiée.

Les voies biochimiques enzymatiques

Parmi les différentes possibilités de conversion de la biomasse lignocellulosique en carburants liquides, la bioconversion par hydrolyse enzymatique et fermentation de la lignocellulose en éthanol est un procédé particulièrement attractif. Au contraire des procédés thermochimiques, les principales étapes de ce procédé, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation, se réalisent toutes les deux à pression atmosphérique et à une température proche de l'ambiante. Par ailleurs, il est l'un des rares procédés permettant d'obtenir un carburant de substitution à l'essence. **C'est ce procédé de conversion qui est étudié au travers de cette thèse.**

Le procédé de production d'éthanol 2G se décompose en 4 étapes principales : le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique, la fermentation alcoolique et la distillation (voir en Figure 2, un des schémas possibles de procédé de conversion). L'étape principale et limitante est l'hydrolyse enzymatique qui consiste à transformer la cellulose de la biomasse lignocellulosique en glucose grâce à l'utilisation d'un cocktail enzymatique qui clive les chaînes celluloses en glucose. La fraction de lignine en fin de procédés peut l'objet de valorisation, notamment pour subvenir aux besoins énergétiques du procédé.

Cependant, la structure complexe de la biomasse lignocellulosique (liaisons chimiques présentes entre les différents composés, grande stabilité mécanique, chimique et thermique de la lignine) rend difficile l'exploitation de cette ressource à l'état natif. Il est donc nécessaire de réaliser un prétraitement, qui rend plus accessible la fraction cellulosique aux enzymes. Suivant la technologie utilisée, le prétraitement permettra une déstructuration de la matrice, augmentera la surface accessible, éliminera la lignine ou encore les hémicelluloses (qui sont alors hydrolysées en sucres fermentescibles), comme c'est le cas de la cuisson à l'acide dilué et de l'explosion à la vapeur, qui seront les deux prétraitements considérés tout au long de cette thèse.

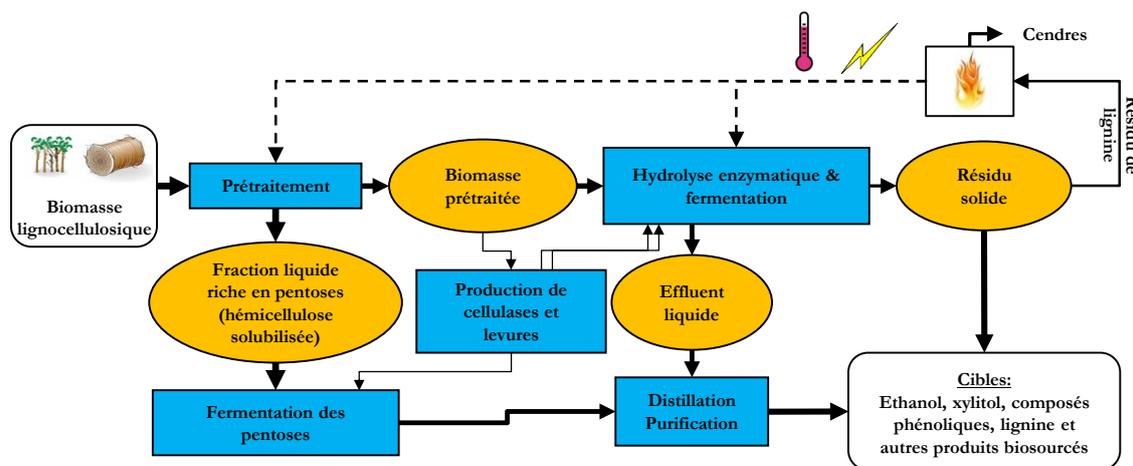


Figure 2 : Un schéma général possible pour la production d'éthanol de 2ème génération à partir de la biomasse lignocellulosique

Le prétraitement, étape nécessaire afin de faciliter la conversion de la biomasse, a un coût conséquent lié à la consommation de produits chimiques et d'énergie. Il y a donc un véritable enjeu dans la recherche pour lever les verrous à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. En effet, le procédé est très prometteur mais fait face à différents obstacles qui méritent d'être étudiés. Une bonne connaissance de la structure des végétaux de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique, de même qu'une observation et une compréhension fines des phénomènes mis en jeu pendant le prétraitement et pendant l'hydrolyse enzymatique, sont indispensables afin de comprendre les liens entre prétraitement et hydrolyse enzymatique. Ces connaissances permettront alors de déterminer les paramètres critiques amenant à une réactivité optimale en hydrolyse enzymatique, tout en minimisant le coût du prétraitement.

2. Description multi-échelle de la paille de blé

a. La composition chimique en macromolécules

La paille de blé, comme les autres substrats lignocellulosiques, est majoritairement composée des trois grandes familles de macromolécules que sont : la cellulose, les hémicelluloses, et les lignines. La cellulose est le biopolymère le plus abondamment présent sur Terre grâce à la photosynthèse chez les organismes eucaryotes autotrophes mais elle peut également être synthétisée par des organismes procaryotes, ou encore des eucaryotes hétérotrophes. Les hémicelluloses constituent les deuxièmes biopolymères les plus abondants sur Terre, et les lignines les troisièmes. Les trois macromolécules sont brièvement décrites ci-dessous, et leurs structures sont décrites de manière plus exhaustive au paragraphe II.2.c.

La matrice végétale présente une organisation à différentes échelles d'observation (Figure 3). On distingue :

- A l'échelle macroscopique, les organes : feuilles, tige, racines, fleurs et fruits, etc. (quelques 100 μm – quelques m)
- Les tissus (20 μm -5 mm)
- Les cellules des différents tissus (5 μm - 100 μm),
- L'organisation fibrillaire des parois cellulaires à l'échelle nanométrique (quelques nm - \sim 100 nm), et qui consiste en un agencement de lignine, de cellulose et d'hémicelluloses
- Les macromolécules de cellulose, de lignine et d'hémicelluloses

Les différentes structures de cette matrice sont présentées dans ce chapitre. On détaillera tout particulièrement la structure de la paille de blé qui est le substrat étudié durant cette thèse. Le blé est une plante angiosperme (plante à fleur) et est défini comme étant une plante **monocotylédone**. Il fait partie de la famille des graminées (ou poacées, plus connues sous l'appellation vernaculaire des herbacées).

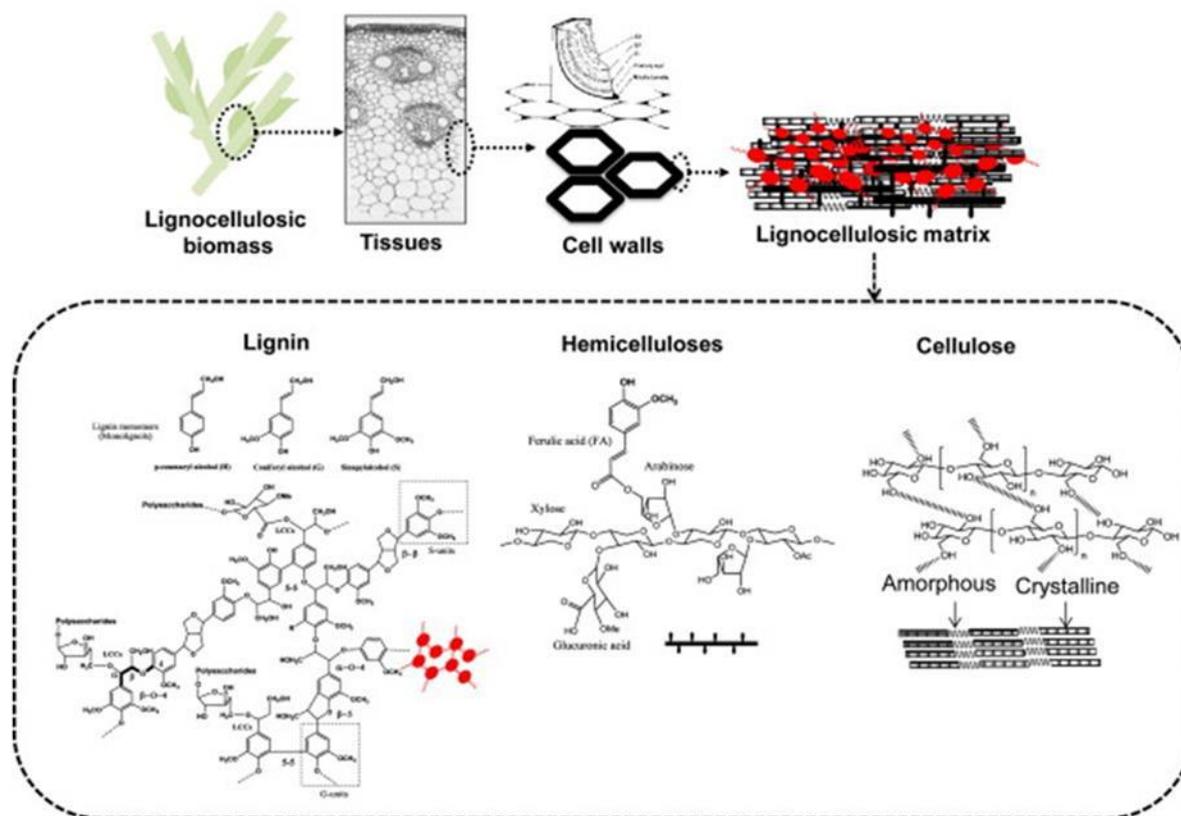


Figure 3 : Structure multi-échelle de la biomasse lignocellulosique. De l'échelle la plus macroscopique à l'échelle moléculaire : biomasse, coupe histologique transversale d'une tige, coupe transversale de cellules, structure lignocellulosique fibrillaire, et enfin la description des trois macromolécules de la lignocellulose. De gauche à droite, la lignine, les hémicelluloses, et la cellulose [15]

i Les propriétés générales de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est essentiellement composée de carbone, d'hydrogène et d'oxygène ainsi que de plus faibles teneurs en azote et éléments inorganiques. La composition de la biomasse lignocellulosique dépend fortement de la nature du substrat. De manière générale, la majorité est composée de 35 à 55 % (en poids) de cellulose, 20 à 40 % d'hémicelluloses, et 10 à 35 % de lignine.

Outre ces trois familles de macromolécules, la biomasse est aussi constituée de cendres et d'extractibles, en proportions souvent minoritaires. Les analyses globales de la paille de blé estiment un taux d'humidité aux alentours de 6 % [16], un taux de cendre compris entre 0,8 et 2 % sur substrat sec, et un taux d'extractibles aux environs de 4 % [17]. Il est à noter que le taux d'humidité dépend de la température et de l'humidité relative de l'air.

ii Structure chimique de la cellulose

La cellulose est le biopolymère principal des plantes terrestres qui permet d'assurer une partie de leur rigidité et de se dresser (avec la lignine), par la structure en fibrillaire multi-échelle. Comme illustré par la Figure 4, la cellulose possède pour motif de répétition le dimère cellobiose (ou β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose), qui est constitué de deux molécules de glucose (formule brute $C_6H_{12}O_6$) liées par une liaison glycosidique β -(1 \rightarrow 4). La description de sa structure est détaillée au paragraphe II.2.c. La cellulose représente 29 à 40 % du poids de la paille de blé [16,18].

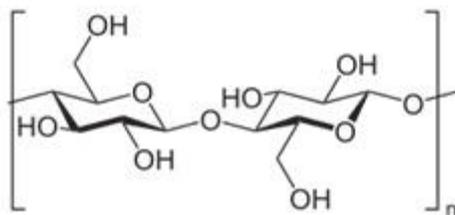


Figure 4 : Unité de cellobiose

iii Composition des hémicelluloses

Le terme d'hémicelluloses désigne de manière générale les hétéropolymères polysaccharidiques branchés présents dans la matrice lignocellulosique. Elles entourent les fibrilles de cellulose, la protégeant ainsi physiquement et mécaniquement. Les hémicelluloses sont constituées pour une grande part d'oses ne possédant que des fonctions –OH (outre la fonction aldéhydique ou cétonique) :

- Pentoses : xylose et arabinose
- Hexoses : glucose (sous forme de D-glucopyranose), galactose (et sa forme désoxy-hexose, le fucose) et le mannose (et sa forme désoxy-hexose, le rhamnose).

La description des hémicelluloses, notamment celles de paille de blé, est indiquée au paragraphe II.2.c. Les hémicelluloses représentent 22 % à 32 % du poids de la paille de blé [16,18].

iv Composition des lignines

La lignine désigne un type de biomolécules complexes carbonées, qui sert à solidifier la structure de la plante comme ciment s'intercalant entre les microfibrilles de cellulose entourées par les hémicelluloses. La lignine est hydrophobe, et donc moins en contact avec la cellulose qu'avec les hémicelluloses. Cette famille de macromolécules est constituée d'un assemblage de trois unités monomériques phénylpropanes distinctes (Figure 5) que sont :

- L'unité hydroxyphényle (H), issue de l'alcool *p*-coumarylique (ou paracoumarylique), ne possède aucun groupe méthoxyl.
- L'unité guaïacyle (G), issue de l'alcool coniférylique, possède un groupe méthoxyl.
- L'unité syringyle (S) issue de l'alcool sinapylique possède deux groupes méthoxyl.

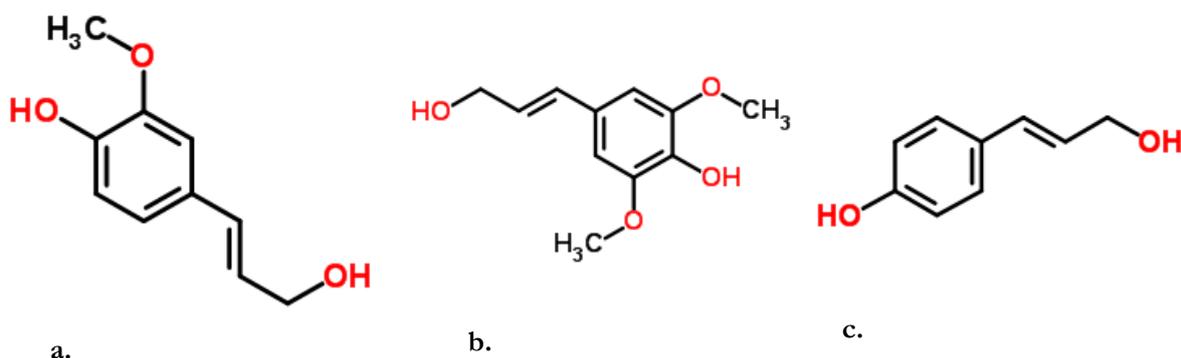


Figure 5 : Unités principales composant les lignines ; a : alcool coniférylique (unité G); b : alcool sinapylique (unité S); c : alcool paracoumarylique (unité H)

La description de la lignine, et notamment celle rencontrée dans les graminées comme le blé, est faite au paragraphe II.2.c. La lignine représente 10 à 20 % du poids de la paille de blé [16,18].

Dans le contexte de la conversion de la paille de blé en bioéthanol, les parties récoltées sont les organes aériens, à savoir les tiges et les feuilles. C'est donc la structure de ces deux organes qui est décrite ici. A

titre d'exemple, la paille de blé peut donner, sur un total de 21 cultivars de blé différents, une variation du ratio massique feuille/tige de 0,42/1 à 1/1, pour une moyenne de 0,65/1 [19].

v Tige

Prolongement de la racine primaire, la tige supporte les fleurs et les feuilles et est composée de nœuds riches en lignine (26 % ms) et d'entre-nœuds davantage cellulodiques (22 %ms de lignine, [17]). La tige possède de nombreux rôles : soutenir la structure, permettre l'élévation, réaliser un moyen de transport de la sève brute et de la sève élaborée entre racines et feuilles, stocker les nutriments et produire de nouvelles cellules vivantes. Chez les poacées (famille incluse dans l'ordre des poales, clade des monocotylédones), on peut distinguer deux structures de tiges : la structure tubulaire (creuse) comme pour le blé (Figure 6), ou diffuse (disperse), rencontrée chez d'autres poacées, comme les panicoidées. Les principaux constituants sont un ensemble de faisceaux vasculaires entourés principalement de parenchyme (description des tissus ci-dessous, paragraphe II.2.b). Les nœuds représentent environ 4 % de la masse de la paille, les entrenœuds 50 %, et les feuilles 30 % [20].

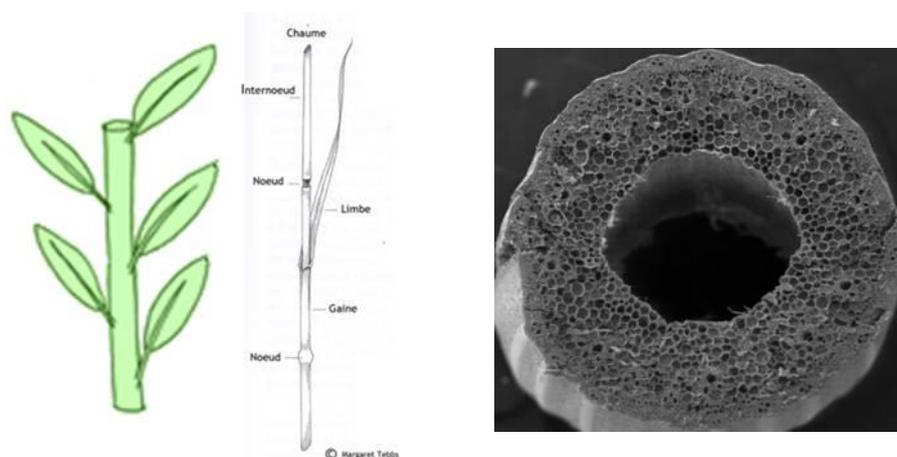


Figure 6 : A gauche, dessins représentant une tige de blé, et la disposition alterne distique des feuilles [21,22]; à droite, coupe transversale d'une paille de riz au microscope électronique à balayage [23]

vi Feuilles

Le blé présente des feuilles spécifiques à la famille des graminées. La feuille est constituée d'un limbe (Figure 7) et d'une gaine foliaire. Concernant l'anatomie de la feuille en elle-même (Figure 7), en tant que monocotylédone, elle présente les tissus suivant [24] :

- Deux épidermes (les deux surfaces externes, couvertes par la cuticule) sur lesquels on observe la présence de stomates. Ces derniers représentent des ouvertures au niveau de l'épiderme par deux cellules qui permettent et régulent l'évaporation de l'eau, de même que les échanges gazeux (CO₂ et O₂)
- Une nervure (faisceau vasculaire de la plante) principale et des nervures secondaires, parallèles (spécifiques aux plantes monocotylédones)
- Un parenchyme assimilateur où la photosynthèse a lieu (mésophylle), et qui constitue le corps de la feuille

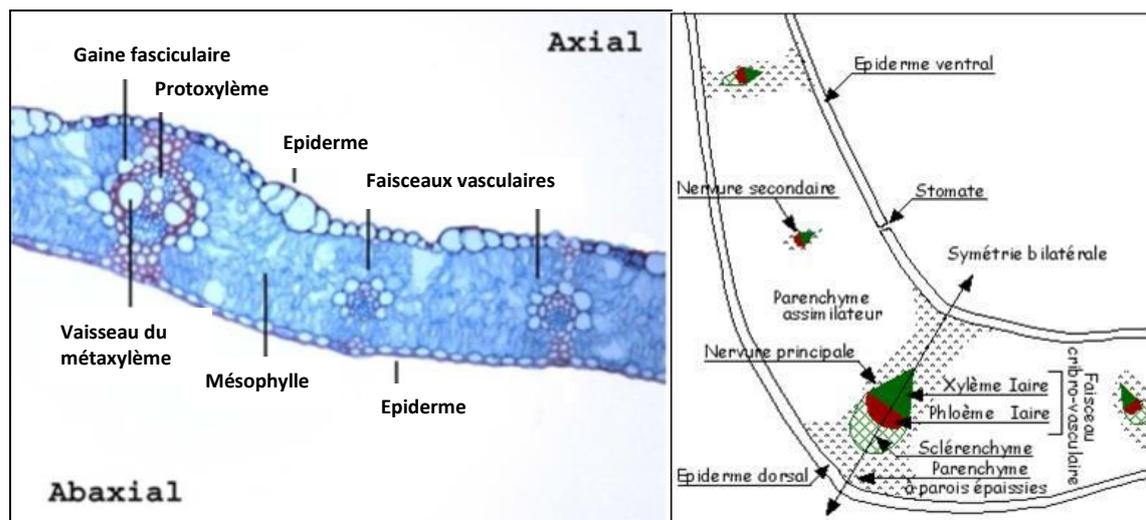


Figure 7 : Coupe transversale d'une feuille de blé à gauche (adapté de [24]), et représentation schématique d'une coupe transversale de feuille de muguet [25]

vii Composition des organes

Comparativement à la tige, la feuille contient généralement une plus grande proportion de cellulose et d'hémicelluloses, mais est également composée d'extractibles, de protéines (avant la sénescence notamment) et de minéraux. Par exemple, sur le cultivar *Robigus* de blé, les compositions en ses différents sucres (sous forme polymérique), lignine et cendres sont reportées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Composition (% matière sèche) des feuilles et des tiges non traitée de blé, d'après [19] :

	Arabinane	Galactane	Glucane	Xylane	Lignine	Cendres	Bilan massique
Feuille	3	1	35	21	19	9	88
Tige	2	1	41	21	22	5	92

b. L'échelle des tissus

Un tissu est constitué d'un ensemble de cellules jointives remplissant la même fonction au sein de la plante : soutien, circulation de la sève brute ou élaborée, division cellulaire, protection, photosynthèse, stockage d'énergie, etc. Dans le cas de la paille de blé, plusieurs tissus caractéristiques sont présents.

i La genèse méristématique

Tous les tissus proviennent initialement d'un même tissu, nommé le méristème, qui est un tissu de cellules peu différenciées, et qui réalisent la division cellulaire nécessaire à la formation progressive des tissus de la plante. Ainsi, tous les tissus d'une plante proviennent initialement d'un méristème. Dans le cas du blé, un méristème est présent à l'extrémité de chaque racine et de la tige (méristèmes apicaux), mais également au niveau des futures fleurs (et futurs fruits donc).

ii Les tissus fondamentaux

Certains tissus participent à la tenue mécanique du plant, et sont appelés les tissus de soutien.

Le premier de ces tissus est le **sclérenchyme** (voir en Figure 8 sa localisation). Il s'agit d'un tissu de soutien qui présente de longues cellules de faible diamètre, et dont les parois sont épaisses, lignifiées, et mortes à maturité. On peut distinguer deux sous-types de cellules : les sclérides et les fibres.

Le **collenchyme** est un autre type de tissu de soutien, moins abondant, et non ligneux, contrairement aux autres tissus de soutien (Figure 8). Il est constitué de petites cellules à parois épaisses et cellulósiques.

Les autres tissus fondamentaux sont les **parenchymes**. Un grand nombre de parenchymes existent, et remplissent différentes fonctions. Comme illustré par la Figure 7, dans le cas du blé, on rencontre :

- le **parenchyme lignifié**, qui est aussi un tissu de soutien, est constitué de cellules généralement de plus grand diamètre, et des parois lignifiées, plus ou moins épaisses (Figure 8). Sans coloration spécifique, il est morphologiquement très proche du parenchyme non lignifié;
- le **parenchyme chlorophyllien** (ou chlorenchyme), aussi appelé parenchyme assimilateur, qui est le siège de la photosynthèse au niveau des feuilles sous la forme d'un mésophylle homogène ;
- et le **parenchyme non lignifié**, qui est formé de grandes cellules non lignifiées, plutôt présent à l'état immature sous la forme de moelle, au centre de la plante. A l'état mature, le parenchyme non lignifié résiduel entoure le lumen (vestige de la moelle). La moelle subsiste sur le haut de la tige, c'est-à-dire dans la partie proche des grains.

iii Les tissus vasculaires

La plante nécessite de transporter un certain nombre de composés entre ses différents organes ou tissus. Plus précisément, l'eau et les minéraux prélevés au sol par les racines sont acheminés dans l'intégralité de la plante *via* le **xylème**, sous la forme de sève brute. L'autre sève, la sève élaborée, est chargée des sucres tout juste formés par la photosynthèse au niveau des feuilles, en acides aminés, phytohormones (et minéraux), etc., est véhiculée par le **phloème** depuis les feuilles vers la tige et racines pour constituer des réserves énergétiques. Entre les cellules, la circulation se fait par voie apoplastique ou symplastique. Dans le premier cas, la circulation est extracellulaire, entre les cellules. Dans le deuxième cas, la circulation est intracellulaire et sélective des solutés transmis par la présence de pores de taille nanométrique (les plasmodesmes) et à ouverture ajustable. Le phloème est un tissu non lignifié plutôt cellulósique, et le xylème est plus hétérogène selon qu'il s'agisse de protoxylème ou de métaxylème par exemple.

Le **faisceau vasculaire** est la structure qui conduit les différentes sèves de la plantes. Il associe les tissus conducteurs que sont le xylème et le phloème, et est entouré d'une gaine de parenchyme lignifié ou de sclérenchyme en tant qu'assise de renforcement.

iv Tissu dermique

La paille de blé est constituée d'un **épiderme** composé d'une monocouche de cellules épithéliales présentant des composés cireux appelés les cutines et jouant un rôle de protection. La feuille est constituée de deux épidermes, l'un ventral, l'autre dorsal. La tige est constituée d'un épiderme pour lequel la partie extérieure comporte une quantité significative de silice (en plus des cutines), qui participe à la rigidité de la tige.

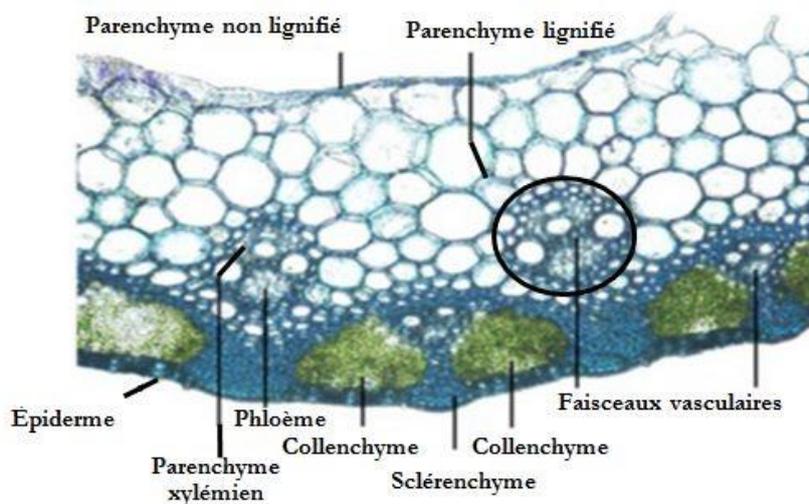


Figure 8 : Observation en microscopie optique d'une paille de blé vue en coupe transversale, adapté de [24]

v Abondance des tissus dans le blé

Les observations microscopiques permettent de préciser que les tissus présents dans la tige de blé sont, par ordre décroissant d'abondance : le sclérenchyme, le parenchyme lignifié, le parenchyme non lignifié, et le xylème. Le phloème, le collenchyme, et l'épiderme sont présents de manière plus minoritaire. Dans la feuille de blé, c'est le chlorenchyme (un parenchyme non lignifié) qui est largement majoritaire. Le sclérenchyme représente 55 % de la masse de la paille (tige et feuille), les parenchymes, 30 %, et l'épiderme, 15 %.

c. Echelle cellulaire et ultrastructure cellulaire

Dans les tissus lignocellulosiques, les polymères pariétaux (cellulose et hémicelluloses) constituent la majeure fraction de la biomasse lignocellulosique (50 à 90 % en poids) ; les organites, constituants élémentaires des cellules ayant une/des fonction(s) spécifique(s) et situé(s) dans le protoplasme (intérieur de la cellule), sont plutôt constitués de protéines. Ainsi les parois cellulaires constituent la zone d'intérêt à cette échelle pour la bioconversion en éthanol.

i Les parois cellulaires

La paroi cellulaire est constituée de différentes couches, nommées depuis l'extérieur vers l'intérieur: lamelle mitoyenne (ou lamelle moyenne, LM), paroi primaire, parois secondaires S1, S2, et S3 (Figure 9). Au centre de la cellule, la vacuité présente est appelée lumen, ou lumière. Si l'on s'intéresse à une tige par exemple, toutes les cellules ne comportent pas systématiquement ces différentes parois. En effet, hormis les cellules du collenchyme qui présentent une paroi secondaire développée mais majoritairement cellulosique et cristalline, seules les cellules lignifiées présentent une paroi secondaire développée, et leur rôle n'est alors que de l'ordre du soutien ou de conduction passive de sève (cellules mortes). Chaque paroi possède des épaisseurs spécifiques, de même que des compositions (proportion en cellulose, lignine, et hémicelluloses) et des orientations des microfibrilles de cellulose distinctes [26]. La Figure 9 illustre leurs spécificités dans le cas de bois d'angiospermes, mais reste globalement transposable pour les angiospermes poacées comme l'est le blé. Dans le cas de la paille de blé, la lamelle moyenne et la paroi primaire, appelées aussi lamelle mitoyenne composée, représentent une épaisseur de 0,12 μm au plus, et la paroi secondaire S1 une épaisseur entre 0,1 et 0,3 μm . La paroi secondaire S2, est bien plus épaisse (jusqu'à plusieurs microns), et constitue la plus importante réserve énergétique sous la forme de polysaccharides (hémicelluloses et cellulose). Elle est constituée majoritairement de cellulose, d'hémicelluloses, et de lignine. La paroi secondaire S3 a une épaisseur comprise entre 0,15 et 0,3 μm [27].

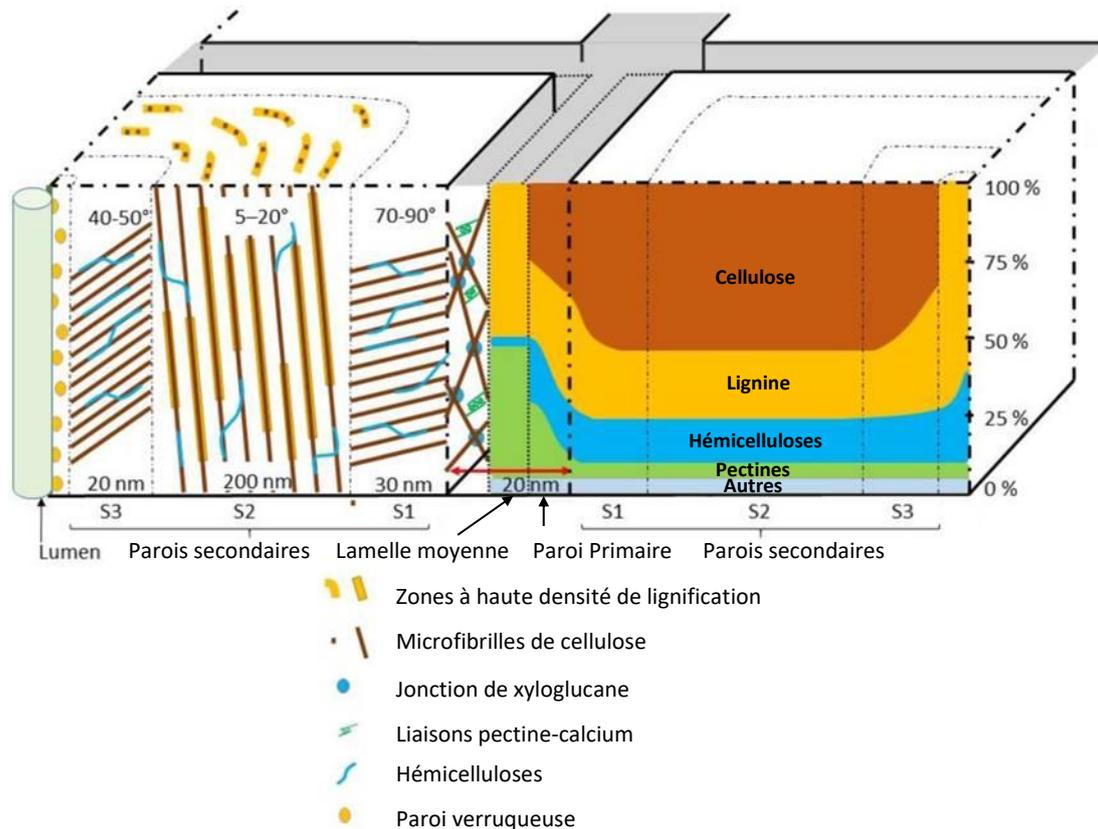


Figure 9 : Représentation schématique des différentes parois cellulaires adapté de [28]

ii Structure des macromolécules de la paille de blé

Cellulose

La cellulose peut être présente sous forme cristalline ou amorphe. A l'état naturel (biologique), on ne rencontre qu'une phase cristalline de cellulose, la cellulose I, qui présente deux sous-groupes I_α et I_β , ce dernier étant majoritaire chez les plantes terrestres vasculaires. D'autres structures peuvent être obtenues par des traitements particuliers, mais sortent du contexte de la thèse. La cellulose amorphe est thermodynamiquement moins stable que n'importe quelle forme cristalline de la cellulose [29]. Les chaînes de celluloses sont le plus souvent regroupées sous la forme de fibrilles élémentaires (ou micelles) et résultent de leur synthèse au niveau de rosettes (pour ce qui est de la paroi secondaire), qui génèrent 3x6 chaînes de cellulose [30]. Les chaînes d'une même rosette se regroupent pour minimiser leur énergie de surface, sous la forme cristalline ou paracristalline, *via* des liaisons hydrogènes. La proximité spatiale des rosettes a pour conséquence de réaliser des regroupements à une échelle plus grande, ce qui constitue des microfibrilles, dont les dimensions dépendent de la biomasse considérée [30]. L'ordre de grandeur des diamètres de microfibrilles est de 3 à 7 nm. Les cellulose-synthases qui synthétisent les chaînes de cellulose dans la paroi primaire diffèrent de celles impliquées dans la synthèse de la cellulose dans les parois secondaires. Les diamètres des microfibrilles sont estimés à 1,5-3 nm. La cellulose d'une biomasse est également caractérisée par le ratio entre la quantité de cellulose cristalline et la cellulose paracristalline. Ce ratio est appelé indice de cristallinité de la cellulose. Dans le cas de la paille de blé, l'indice de cristallinité varie de 35 à 45 % par estimation en Diffraction des Rayons X (DRX, méthode de Segal, [31,32]). La longueur des chaînes de cellulose est une autre caractéristique de la structure de la cellulose. Elle peut s'exprimer sous la forme d'une longueur de chaîne (0,2 μm dans la paroi secondaire du coton et ramie, et supérieure à 10 μm dans la paroi primaire [30]), d'une masse moléculaire, ou encore d'un degré de polymérisation qui définit le nombre de répétitions des unités du polymère ; pour la paille de blé, il est estimé à 1045 [33].

Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont constituées d'un enchaînement linéaire ou ramifié de pentoses (xylose et arabinose), d'hexoses (glucose, galactose, fucose, mannose, rhamnose) et d'acides uroniques. La chaîne principale comprend généralement un ou deux types de monosaccharides, et selon la nature de cette chaîne principale on distingue différents types d'hémicellulose ; mannanes, xylanes, xyloglucanes. Dans le cas de la paille de blé, on rencontre principalement des xylanes. Les hémicelluloses présentes dans la paille de blé sont décrites ci-dessous et schématisées en Figure 10 :

- **Les xylanes** sont des polymères dont le squelette est fait d'unités xylopyranose liées en β -(1,4) mais qui présentent différentes chaînes latérales. On distingue suivant le cas les glucuronoxylanes (GX), les arabinoxylanes (AX), les glucuronoarabinoxylanes (GAX), et les hétéroxylanes. Les AX comportent des unités xylose substituées sur leur O3 et/ou O2 par une unité arabinofuranose. L'acide D-glucuronique est le principal substituant osidique des unités de xylose chez les GX. Les GAX contiennent des unités de xylose qui peuvent être substituées sur leur O3 et/ou O2 par des unités arabinofuranose, et en O2 par de l'acide D-glucuronique. Les HX présentent en plus des différentes structures possibles décrites, de courtes chaînes de deux à trois oses comprenant du galactose, de l'arabinose, et du xylose. Les xylanes ont le plus souvent des groupements acétyles qui sont branchés au squelette de xylane. Les xylanes sont présents dans presque toutes les plantes [34]. C'est le principal composant des hémicelluloses d'angiospermes. Chez les graminées, le xylane possède un degré de polymérisation plutôt faible (inférieur à 100), et le squelette de xylane peut présenter des branchements d'arabinofuranose, sur le troisième carbone du xylose [34].
- Les arabinoxylanes sont la forme la plus répandue des xylanes chez les plantes monocotylédones poacées (blé, riz, maïs, bambou, miscanthus, panic érigé...).
- **Les arabinogalactanes** sont des polymères de galactose dont les unités sont liées par des liaisons β -(1,4). Les unités présentes sur les chaînes de côté sont liées en position O-6. Deux arabinogalactanes se distinguent suivant les unités branchées (galactose, arabinofuranose) et les fonctions chimiques les reliant. Les arabinogalactanes peuvent être des molécules indépendantes, mais également constituer des branchements sur des chaînes de pectine [34]. Ces polymères constituent ainsi plus les pectines, que les hémicelluloses.

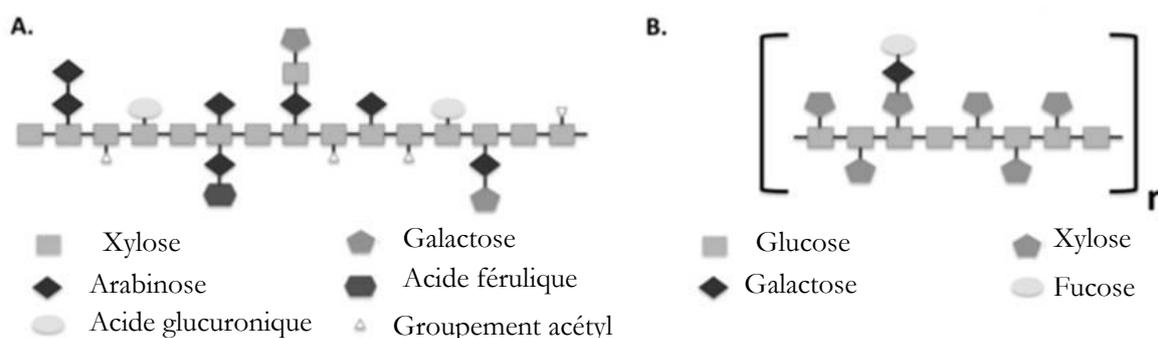


Figure 10 : Exemples de structures d'hémicelluloses : A. Xylane. B. Xyloglucane, adapté de [35]

Les extrémités des hémicelluloses sont souvent substituées par des groupements acétyles et par des acides aliphatiques tels que l'acide α -D-glucuronique, l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, l'acide α -D-galacturonique ou par des acides phénoliques comme l'acide férulique. Sun *et al.* et Abot *et al.* [36,37] montrèrent que l'ensemble des substitutions qui lient les hémicelluloses d'un côté et la lignine de l'autre côté représente environ 5 % du poids des hémicelluloses. Les molécules les plus impliquées sont : le syringaldéhyde, la vanilline, et l'acide syringique.

Lignine

La lignine de paille de blé est principalement constituée des trois unités phénylpropanes que sont l'unité hydroxyphényle (H), l'unité guaiacyle (G), et l'unité syringyle (S), dans des proportions respectives de 5 %, 49 %, et 46 % [38]. Ces monolignols sont oxydés en radicaux phénoliques, grâce à des oxydases (peroxydases et laccases) et les radicaux obtenus se couplent ensuite spontanément.

D'autres composés peuvent également se lier de manière covalente à ces unités. Dans le cas de la lignine de paille de blé, les plus présents sont : les acides *p*-coumarique (5,5 % du poids de la lignine), férulique (3,22 %) syringique (2,72 %), la vanilline (2,19 %) et le syringaldéhyde (1,78 %) [39]. En rajoutant les autres composés minoritaires détectés et dosés de cette étude, ces composés représentent ainsi 17,6 % de la lignine totale.

Au-delà de l'abondance des différentes unités et substituants présents dans la lignine de paille de blé, la lignine peut être caractérisée par les liaisons impliquées entre les différents composés et unités. Les unités de la lignine sont assemblées majoritairement par des liaisons éther β -aryl éther ou liaisons β -O-4, liaisons labiles et cibles des procédés de dépolymérisation et des liaisons résistantes ou liaisons condensées: les liaisons carbone-carbone ou biphenyl éther, ont responsables de la résistance des lignines vis à vis des dégradations physicochimiques. Les composés phénoliques et la lignine sont liés principalement au niveau des chaînes aliphatiques de la lignine. L'acide *p*-coumarique est estérifié principalement en position γ (ou éthérifié), principalement sur les unités S. L'acide férulique présente des liaisons éther en position β sur les unités guaiacyle [40]. Cette liaison ester avec la lignine peut également être présente en position en α et γ sur la lignine au niveau de sa chaîne latérale [40,41].

Par ailleurs, la lignine est intimement liée aux hémicelluloses par des liaisons éther stables, et possiblement à la cellulose par l'intermédiaire de ponts covalents [41,42]. Concernant les liens hémicelluloses-lignine par exemple, ces ponts impliquent notamment l'acide férulique et acides glucuroniques. Ces associations pourraient se révéler critiques quant à l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes cellulo- et hémicellulolytiques.

D'autres études complètent ces observations, notamment en montrant la présence d'unités et sous-unités variées, comme par exemple la présence de cycles oxygénés à 5 ou 8 éléments (carbone et oxygène) [43].

Protéines

Une faible fraction de la paille de blé est constituée de protéines (2,4 à 5,2 %, dépendamment des cultivars et du sol [18,43]). Ces protéines sont des enzymes pour une part, et des protéines de structure, d'autre part, et leur teneur dépend grandement de l'état de sénescence lors de la récolte.

Pectines

La fraction lignocellulosique des plantes vasculaires contient également une faible proportion de pectines, comme les arabinanes. Dans la paille de blé, elles représentent 1 à 2 % du poids de la paille. Elles sont principalement présentes dans la lamelle moyenne en présence de lignine, et dans la paroi primaire. Sous le vocable "pectines" sont désignées différentes classes de polysaccharides à base d'acide α -D-galacturonique majoritairement (squelette). Les pectines sont présentes principalement dans la lamelle mitoyenne, en tant que ciment ductile. Des groupements méthyles et acétyles peuvent se substituer sur les chaînes de ces polysaccharides, de même que divers monomères de sucres (rhamnose principalement, mais également arabinose et galactose). Cette fraction est donc valorisable en oses puis en alcool, de la même manière que la cellulose ou les hémicelluloses, en présence des enzymes appropriées [44]. Différentes pectines sont décrites dans la littérature [45]. Les homogalacturonanes constituent la fraction majoritaire des pectines et sont des polymères exclusifs d'acides D-galacturoniques, reliés par des liaisons α -(1,4), et dont les fonctions hydroxyles peuvent être estérifiées par du méthanol en C6 et par l'acide acétique en position C2 ou C3. Les rhamnogalacturonanes de type I sont constitués d'une alternance d'unités rhamnosiques et galacturoniques. De même que pour l'homogalacturonane, des substitutions acétyles sont souvent branchées sur des résidus d'acide galacturonique. Plusieurs oses neutres peuvent se greffer au niveau du L-rhamnose, comme l'arabinose, le galactose des arabinanes, galactanes et

arabinogalactanes. Les rhamnogalacturonanes de type II ont une structure plus complexe et un degré de polymérisation plus faible (d'environ 60). La description fine des pectines est complexe, et est décrite plus exhaustivement par Mohnen [46].

iii Autres composés de la paille de blé

Dans la biomasse lignocellulosique, et en particulier dans la paille de blé, est présent un certain nombre d'autres composés. Ils représentent quelques pourcents du poids total de la biomasse [17]. Une solubilisation par un solvant (eau, éthanol, acétone) permet d'en récupérer une fraction, appelée extractibles. Le terme "d'extractibles" est vague par essence, et dépend des propriétés du solvant et des conditions d'extraction (température, pression, et temps de séjour). Dans les faits, il s'agit de composés carbonés non structuraux, possédant de faibles masses moléculaires comparativement aux trois macromolécules lignocellulosiques, hydrophiles ou lipophiles. Parmi les composés lipophiles identifiés de la paille de blé, on compte des acides gras, des acides résiniques et autres acides, des stérols, des cires (dont les cutines épidermiques), des esters de stérols (stérides), des acides phénoliques, des composés aldéhydes, des lignanes, et d'autres composés polyfonctionnels non identifiés [47]. La cutine est constituée d'un polyester constitué d'hydroxy-acides à longues chaînes (C18 à C30), d'hydrocarbures à longues chaînes (C21 à C37), d'alcools, d'aldéhydes, d'acides gras à longue chaîne, et de cérides qui sont des esters (d'alcools ou d'acides gras) à longue chaîne [48], analyses de cutines d'épicéa, chêne, et de hêtre).

Une fraction non extractible est également présente, constituée de minéraux. Dans la paille, on retrouve une quantité significative de silicium sous forme de silice. Cette silice est principalement présente au niveau de la surface externe de la couche cellulaire épidermique. D'autres éléments minéraux et métalliques sont présents dans la paille de blé, et sont récupérables dans les cendres de combustion de la biomasse : calcium, phosphore, magnésium, potassium, sodium, chlore et soufre [18]. Les cendres représentent 0,5 à 6 % du poids de la paille de blé [17,18]. Le calcium et le magnésium sont des cations qui se retrouvent souvent intercalés à la jonction de chaînes de pectine [49].

d. Conclusion sur la structure des biomasses lignocellulosiques

L'étude bibliographique réalisée sur la structure des biomasses lignocellulosiques a permis de souligner la complexité de ces matériaux, en termes d'organisation structurale et de composition chimique. En effet, la structure est organisée de manière multiéchelle avec des compositions chimiques locales variables. Tous ces paramètres sont sources d'hétérogénéités qu'il conviendra de prendre en compte lors de l'analyse des échantillons. Malgré tout, les substrats lignocellulosiques sont généralement broyés avant d'être potentiellement prétraités et hydrolysés. La réactivité en hydrolyse enzymatique est alors une réactivité moyenne mesurée sur l'ensemble de la biomasse. Toutefois, de par les fortes hétérogénéités structurales et chimiques au sein du substrat, il est probable que la récalcitrance du substrat en hydrolyse enzymatique puisse être liée à un certain type d'hétérogénéité (certains tissus par exemple). Il en est de même pour le prétraitement : son effet sera probablement différent sur les différents tissus de structure et de composition chimique différente. Il faudra donc veiller à étudier les matériaux aux différentes échelles afin d'en avoir une description exhaustive et de pouvoir relier les différents paramètres physico-chimiques à la réactivité en hydrolyse enzymatique.

e. Digestibilité spécifique des hétérogénéités

Comme l'ont laissé suggérer les paragraphes précédents, la réactivité en hydrolyse enzymatique des entités (organes, fractions granulométrique des particules, tissus, et parois cellulaires) diffère, par leurs hétérogénéités compositionnelles et physiques. Cette réactivité enzymatique, ou digestibilité, peut se mesurer par l'intermédiaire du rendement en glucose de conversion de la cellulose, pour des conditions expérimentales donnée (temps d'hydrolyse, charge enzymatique, nature du cocktail enzymatique, température, concentration en celluloses, etc) qui sont souvent standardisées [50]. Le taux instantané de conversion peut aussi être considéré pour des aspects plus cinétiques.

i Digestibilité des organes

Sur le cultivar *Robigus* (blé), la digestibilité des feuilles et tiges de blés fut testée avec prétraitement hydrothermal, et sans prétraitement [19]. Les tests furent effectués avec cocktail de cellulases et cocktail de cellulases + xylanases. Les rendements de conversion de cellulose en glucose à 24h d'hydrolyse enzymatique des tiges et feuilles non traitées, présentés ci-dessous (Tableau 2), permettent de conclure d'une part que les feuilles ont une meilleure digestibilité que les tiges (par leurs différences compositionnelles principalement), et d'autre part que l'effet de synergie existant entre les cellulases et les xylanases s'exprime légèrement plus lorsque le substrat est peu digeste (l'augmentation relative de digestibilité du glucose est meilleure dans le cas de la tige).

Tableau 2 : Rendement de conversion de glucose et xylose par rapport à la teneur initiale en glucose et xylose polymérique, pour les feuilles et tiges natives de blé, en présence de cellulases (et xylanases lorsque indiqué) [19]

	Rendement glucose à 24h d'hydrolyse enzymatique	Rendement xylose à 24h d'hydrolyse enzymatique
Feuille (avec cellulases)	33 %	9 %
Feuille (avec cellulase + xylanases)	38 %	30 %
Tige (avec cellulases)	19 %	12 %
Tige (avec cellulases + xylanases)	24 %	20 %

ii Digestibilité des tissus des végétaux

Une étude de Zeng *et al.* [51,52] s'intéressa à l'effet du prétraitement sur la digestibilité enzymatique de fractions spécifiques de tiges de maïs, en l'occurrence les feuilles (riches en un certain type de parenchyme), la périphérie de la tige (le cortex, comprenant principalement l'épiderme et les fibres libériennes ou sclérenchyme) et le centre de la tige (qui contient la moelle, un parenchyme lacunaire, et des faisceaux vasculaires en abondance variable). L'analyse compositionnelle, et le test d'hydrolyse enzymatique furent réalisés sur ces trois fractions avec ou sans prétraitement préalable. En termes de composition :

- La couronne et la moelle ont une teneur en cellulose élevée (41,6 % et 42,9 %, respectivement), plus importante que pour les feuilles (34,3 %)
- La teneur en hémicelluloses est équivalente pour les trois tissus (entre 24 et 29 %)
- La teneur en lignine est équivalente pour les feuilles et la moelle (19 et 18,7 %, respectivement), et plus importante pour la couronne (30,5 %)

En ce qui concerne la réactivité en hydrolyse enzymatique, elle est significativement améliorée après un prétraitement (en eau hydrothermale dans l'exemple cité ici), mais le classement en termes de réactivité des trois tissus reste identique avant et après prétraitement (Figure 11) :

- La moelle est le tissu le plus réactif
- La couronne est le tissu le moins réactif
- Les feuilles se situent entre les deux.

Il apparaît dès lors que la proportion respective de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine dans les différents tissus peut influencer leur digestibilité lors de l'hydrolyse enzymatique.

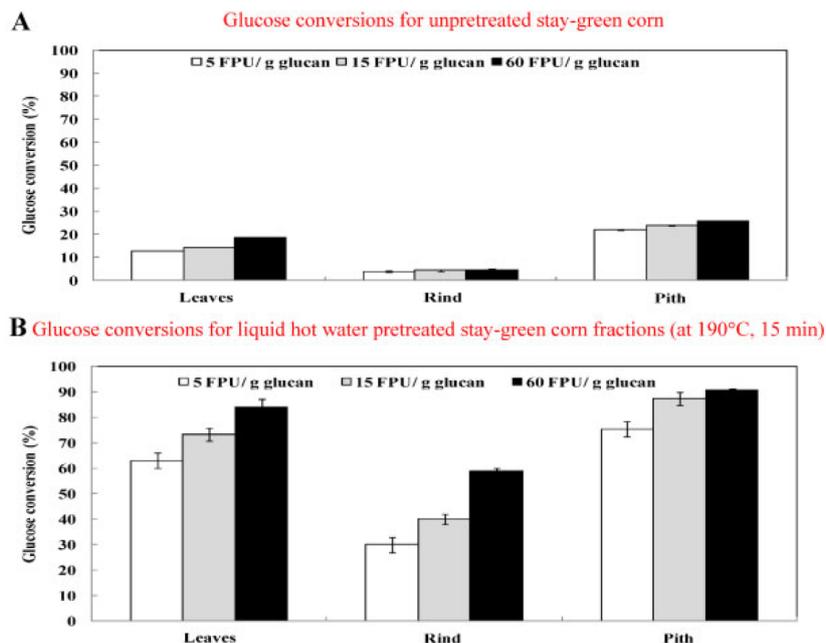


Figure 11 : Conversion du glucose de la feuille, de la couronne de tige et de la moelle, avec (B) et sans (A) prétraitement à l'eau hydrothermale, et à différentes charges enzymatiques [51]

De manière générale, il est possible de classer les principaux tissus des végétaux par digestibilité enzymatique, de manière assez indépendante des substrats. Le Tableau 3 indique qualitativement les tendances compositionnelles et de digestibilité pour les différents tissus rencontrés dans les plantes, et notamment les poacées. Différentes informations sur la digestibilité et/ou la composition des tissus sont déduites d'observations par microscopie avec coloration sélective, spectroscopie [53], microspectroscopie de coupes [54], mesure d'affinité avec les enzymes en microscopie confocale [24,55], ces observations ayant lieu éventuellement pendant la dégradation enzymatique [56]. Ainsi, l'aspect quantitatif (digestibilité, taux de lignification, etc.) ne peut être développé via ces analyses qualitatives. Il serait nécessaire de tester un volume représentatif de tissu (et non pas une coupe) en conditions standards d'hydrolyse enzymatique, mais les faibles dimensions des tissus (centaines de microns au mieux) en rendent impossible la réalisation.

Tableau 3 : Evaluation qualitative de la teneur en lignine et cellulose des principaux tissus rencontrés, ainsi que leur classement en terme de digestibilité

Tissu	Teneur en cellulose	Teneur en lignine	Réactivité en hydrolyse enzymatique
Epiderme	+	+	Ø
Phloème	+++		+++
Xylème	++	++	+
Sclérenchyme	+	+++	Ø
Collenchyme	+++		++
Parenchymes non lignifiés	+++	+	+++
Parenchyme lignifié	+	++	+

Les + permettent d'apprécier qualitativement la concentration/réactivité du tissu

Ø : concentration/réactivité quasi nulle

+ : concentration/réactivité limitée

++ : concentration/réactivité modérée

+++ : concentration/réactivité élevée

iii Hétérogénéité à l'échelle de la cellule et des parois

A partir des tendances compositionnelle des différences parois des cellules, et notamment du degré de lignification de chacune d'elle, on peut s'attendre à des différences notable de digestibilité des différentes parois (les plus lignifiées étant les moins digestes, et réciproquement). Cependant, à notre connaissance, peu d'études semblent avoir été réalisées sur ce sujet en mesurant expérimentalement la digestibilité spécifique des parois. On peut citer une étude de Gierlinger *et al.* [56], dont le travail portait sur l'observation en microscopie IR de la dégradation enzymatique de xylème du bois (peuplier) normal et du bois de tension (zone du bois sollicitée mécaniquement en tension, par exemple lorsque un arbre pousse en pente), non traités. Le bois de tension présente des cellules avec une paroi intérieure spécifique additionnelle appelée couche G, dont la composition est singulière : peu ou pas de lignine, présence d'hémicelluloses et de pectines spécifiques à cette couche qui se substitue partiellement aux parois cellulaires internes comme les parois secondaires S2 et S3 [57–59]. Les travaux de Gierlinger *et al.* montrèrent la digestibilité importante de la couche G, comparativement aux autres parois, qui n'étaient pas digérées [56].

iv Conclusion sur l'hétérogénéité physico-chimique et de digestibilité des substrats

Les plantes vasculaires présentent des hétérogénéités physiques morphologiques tant à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle tissulaire et cellulaire, avec des spécificités chimiques locales. Cela pourrait être exploité pour essayer de réaliser un fractionnement à taille industrielle (par ultrason pour libérer la couche G du bois de tension dans un solvant, par tri granulométrique, ou par différence de densité) avant prétraitement, et optimiser celui-ci suivant la fraction à prétraiter.

3.L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est l'étape pendant laquelle la cellulose et les hémicelluloses sont clivées en monomères de sucres fermentescibles, à l'aide de cellulases pour la cellulose, et d'hémicellulases pour les hémicelluloses. L'opération est réalisée en milieu aqueux, par contact du cocktail avec le substrat à hydrolyser, sous agitation et avec une température et un temps de séjour adaptés. Dans le cas de cette étude, seule la conversion de la cellulose en glucose est considérée. Plusieurs types d'enzymes sont impliqués et sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

a. Cocktail industriel d'enzymes produites par *Trichoderma reesei*

Pour réaliser l'hydrolyse enzymatique, l'utilisation d'un cocktail et non d'une enzyme qui serait optimale réside dans le fait que la dégradation enzymatique se fait par plusieurs mécanismes très sélectifs, pour lesquels des enzymes spécifiques sont nécessaires. Cela permet ainsi une complémentarité d'actions, menant à une hydrolyse plus rapide et plus efficace et un produit final quasi unique, le glucose. Industriellement la souche fongique *Trichoderma reesei*, est très utilisée, mais d'autres souches champignonneuses peuvent être utilisées (comme d'*Aspergillus niger* notamment), de même que des souches bactériennes. Il existe par ailleurs d'autres enzymes cellulolytiques d'origine végétale et même animale. Les enzymes des différents règnes possèdent leurs spécificités ; pour les enzymes des levures, l'avantage est leur forte activité cellulolytique, et leur relativement faible teneur en azote. Ces enzymes peuvent donc être produites dans des milieux de cultures plus pauvres en acides aminés ou en composés azotés susceptibles d'être métabolisés en acides aminés, comme l'ammoniac, l'urée, les nitrates et les nitrites.

b. Les trois classes d'enzymes cellulolytiques

La dégradation de la cellulose implique trois types d'enzymes, auxquels peuvent s'ajouter des structures auxiliaires (II.3.c). Les premières enzymes impliquées sont les cellobiohydrolases (CBH, ou

exoglucanases), qui permettent de cliver les chaînes de cellulose en cellobiose, à partir de l'extrémité d'une chaîne de cellulose. Selon si l'adsorption se réalise sur l'extrémité réductrice ou non réductrice, on distingue les cellobiohydrolases de type I et de type II. De plus, leur action est processive [60], l'activité hydrolytique ne s'arrêtant qu'au bout de la chaîne ciblée. Les CBH I ont une taille d'environ 18 nm [61] et représentent environ 60 % du cocktail enzymatique produit par *Trichoderma reesei*. Sur Avicel leur activité est moindre d'un facteur 2 [62] comparativement aux CBH II qui représentent au moins 20 % du cocktail. Les CBH I présentent un domaine catalytique de 5 nm (contre 2 nm pour les CBH II) et un site d'adsorption relié au site catalytique par une liaison peptidique comme illustré par la Figure 12.

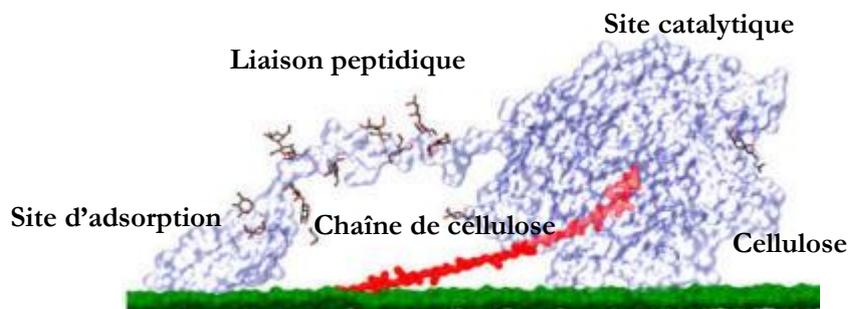


Figure 12 : Structure générale des CBH, adapté de [63]

Le déplacement des CBH se réalise seulement de manière processive depuis une extrémité de chaîne de cellulose. Agissant sur un seul polymère, ces enzymes ne produisent pas de nouveaux sites d'adsorption pour elles-mêmes. Pour que l'activité hydrolytique soit optimale, la présence d'enzymes qui sont capables de réaliser des clivages des chaînes polymériques de cellulose en milieu de chaîne est donc souhaitable. Ces enzymes sont les endoglucanases (EG).

Les EGs ont la faculté de cliver la liaison $\beta(1,4)$ -glycosidique des chaînes de cellulose, comme le font les CBH. Mais leur spécificité réside dans le clivage qui peut se réaliser indifféremment au milieu ou à l'extrémité d'une chaîne. Elles participent donc au raccourcissement des chaînes de cellulose, et à la multiplication du nombre d'extrémités, sur lesquelles peuvent s'adsorber les cellobiohydrolases. Les endoglucanases n'ont cependant pas d'action processive. Elles représentent moins de 20 % de la masse [64] du cocktail enzymatique produit par les meilleurs cocktails de *Trichoderma reesei*. Leur activité enzymatique équivalente est estimée 5 fois supérieure à celle des CBH I sur Avicel [62]. Il est important de noter que le produit majoritaire de l'action de ces deux premières classes d'enzymes est le cellobiose. C'est le principal inhibiteur de ces enzymes et, pour l'éliminer, une dernière classe d'enzymes est importante afin de cliver la molécule de cellobiose dans le milieu. Ces enzymes sont appelées les β -glucosidases.

Les β -glucosidases se positionnent sur les extrémités non réductrices des résidus solubles (β -D-glucosides et les cello-oligosaccharides) pour lever l'inhibition par le cellobiose des endo- et exoglucanases. Cependant le produit (glucose) est un frein à sa propre activité. Naturellement, *T. reesei* ne produit que 1 % en poids de ce type d'enzymes et, dans le cadre d'un procédé industriel, de nouvelles souches durent être construites pour y remédier. On peut également compléter le cocktail naturel par des préparations de β -glucosidases produites par la souche *Aspergillus niger*. Une fois optimisé, le mélange permet de diminuer l'inhibition des CBHs et EGs par le cellobiose et de produire du glucose, molécule finale recherchée. La Figure 13 résume l'action et la diversité de ces trois classes d'enzymes cellulolytiques. Il est intéressant de noter que souvent, les enzymes cellulolytiques sont réputées avoir une activité hémicellulolytique, et donc une spécificité non totale [65].

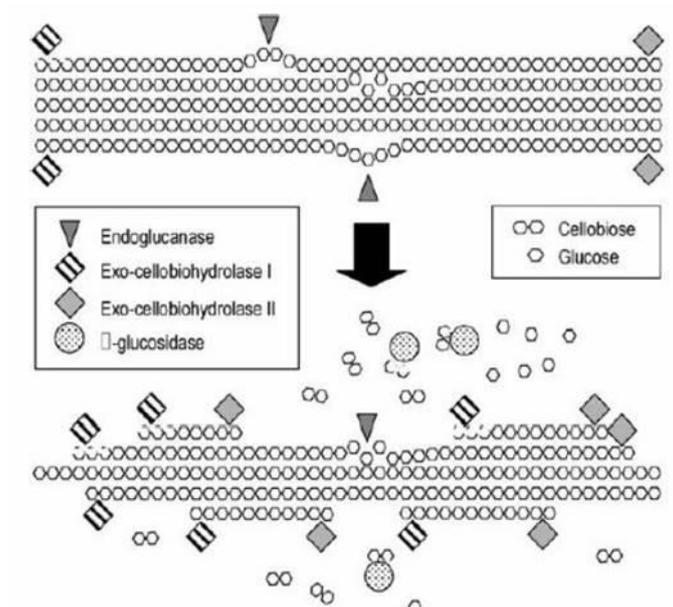


Figure 13 : Représentation schématique des types de clivage suivant les enzymes employées (adapté de [66])

c. Cas des LPMO et cellulosomes

En 2010 est découverte une nouvelle sorte d'enzyme impliquée dans la déconstruction des polysaccharides et notamment de la cellulose [67]. Elles sont appelées les LPMOs (pour Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases), et sont sécrétées par différents champignons filamenteux et bactéries. Contrairement aux enzymes classiques, il s'agit d'enzymes qui présentent un site actif avec un atome de cuivre, d'où l'appellation de métallo-enzymes, et catalysent le clivage oxydatif des liaisons β -glycosidiques. Ces enzymes sont plus efficaces sur les polysaccharides cristallins (cellulose ici), mais présentent également une activité sur des polysaccharides non cristallins comme les hémicelluloses. Leur activité est donc à plus large spectre que celui des enzymes cellulolytiques décrites ci-dessus, et dépend d'un apport en électrons (énergivore, d'un point de vue procédé). Cet apport peut provenir du milieu (ajout d'acide ascorbique ou gallique par exemple), d'origine exogène (photolyse par exemple), ou et possiblement de la matrice (*via* la lignine et les produits de dégradation). Par leur grand intérêt potentiel, les LPMO font l'objet de nombreuses recherches [67–71] et devraient être utilisées dans la formulation des nouveaux cocktails enzymatiques.

Les enzymes cellulolytiques présentées précédemment et les LPMO sont des enzymes simples et libres. Cependant, il existe des structures d'enzymes liées, qui forment alors un complexe enzymatique, nommé cellulosome. Ces complexes enzymatiques sont d'origine bactérienne, et leurs modes d'action sont notablement différents [72,73]. Dans ce dernier cas, les complexes enzymatiques (appelés cellulosomes) peuvent dégrader la cellulose à une échelle plus grande, en séparant notamment les microfibrilles de cellulose les unes des autres (effilochage). L'étude qui s'intéressa à la comparaison d'activité cellulolytique des enzymes et des cellulosomes [72] a montré que ces derniers s'avèrent plus efficaces pour dégrader des substrats purement cellulosiques (et cristallins), quel que soit le degré de polymérisation. A l'inverse, dans le cas de substrats de biomasse lignocellulosique prétraitée (panic érigé), le cocktail enzymatique présente la meilleure activité. Enfin, une fois couplés ensemble, le mélange (cocktails enzymatique ; cellulosomes) présente une synergie menant à une conversion totale de la cellulose Avicel après seulement 20h de réaction.

d. Paramètres clés de l'hydrolyse enzymatique

Dans le milieu réactionnel, un certain nombre de paramètres sont susceptibles d'impacter la conversion de la cellulose par les enzymes, outre les propriétés du substrat à hydrolyser. La diversité d'un cocktail enzymatique et les proportions relatives de ses enzymes caractérisent le degré de synergie qui sera présent.

i Exploitation des synergies enzymatiques

Comme on l'a vu, la synergie observée entre les différents types d'enzymes cellulolytiques est due en premier lieu à leur complémentarité : en coupant les chaînes cellulosiques en diverses localisations, les endoglucanases créent un grand nombre de sites potentiels de fixation pour les cellobiohydrolases (deux sites à chaque nouvelle adsorption). La synergie s'exprime également par l'élimination des produits intermédiaires inhibiteurs : le cellobiose et les oligosaccharides hydrosolubles produits par les cellobiohydrolases et les endoglucanases inhibent l'activité enzymatique de ces mêmes enzymes. La disparition de ces composés par l'action des β -glucosidases favorisent donc l'hydrolyse enzymatique globale. Une hypothèse avance que les EGs permettent aussi d'éviter que les CBHs soient bloquées, au cours de leur progression, par de la lignine en contact avec la chaîne de cellulose ciblée. Enfin, les EG pourraient permettre de libérer les CBH qui se sont adsorbées trop loin d'une extrémité de chaînes les rendant inactives. En plus de la proportion relative des différentes enzymes du cocktail, le degré de synergie est dépendant de la nature du substrat [74,75], la synergie étant d'autant plus forte que le substrat est réfractaire à l'hydrolyse enzymatique.

La prise en compte des coûts de synthèse de chacune des préparations enzymatiques (cellulases classiques, hémicellulases, pectinases, LPMO, et cellulosomes) pourrait aider à retenir la meilleure option industrielle entre les deux situations extrêmes que sont une forte synergie sur des substrats récalcitrants (peu de coût sur les prétraitements mais plus important sur les enzymes) ou une faible synergie pour des substrats très réactifs (forts coûts de prétraitement, moindres coûts des solutions enzymatiques).

ii Autres paramètres impactant la réactivité enzymatique

Un certain nombre d'autres paramètres influencent la cinétique de la dégradation enzymatique, notamment la dose d'enzyme [76], leur structure, sélectivité, activité concentration, sensibilité à certaines inhibitions d'ordre chimique, et température optimale de fonctionnement, sont autant de paramètres critiques. De cette manière, la température d'hydrolyse, le pH et la présence de certains composés chimiques (glucose, composés phénoliques, furfural, 5-HMF), sont autant de paramètres pouvant avoir un impact direct sur la cinétique de conversion enzymatique de la cellulose en glucose, et donc à maîtriser.

4. Les prétraitements de cuisson acide et d'explosion vapeur

Dans la voie de bioconversion de la biomasse lignocellulosique, seules la cellulose et les hémicelluloses sont valorisables chimiquement pour la production d'éthanol ou éventuellement en d'autres alcools. Cette transformation est réalisée en milieu aqueux, grâce à un cocktail d'enzymes cellulolytiques pour la conversion de la cellulose et d'enzymes hémicellulolytiques pour les hémicelluloses. Le caractère réfractaire de la biomasse lignocellulosique native (c'est-à-dire sans traitement préalable) en hydrolyse enzymatique rend nécessaire l'application d'un prétraitement sur ces substrats, afin de rendre accessible la partie cellulosique aux enzymes cellulolytiques. Sans prétraitement, les substrats non traités donnent lieu à des rendements de conversion de la cellulose en glucose de l'ordre de 5 à 30 %, dépendamment de la charge enzymatique introduite [77–80]. C'est pourquoi il est important de considérer un prétraitement adapté. Parmi les très nombreuses technologies de prétraitement de la biomasse lignocellulosique envisagées depuis l'échelle du laboratoire jusqu'à l'échelle industrielle [81,82], je m'intéresserai dans cette étude au prétraitement par cuisson acide et à celui par explosion vapeur.

a. Cuisson à l'acide dilué

i Principe et domaine des conditions opératoires

Le prétraitement de traitement à l'acide dilué consiste à traiter le substrat lignocellulosique dans un milieu aqueux à température comprise typiquement entre 130 et 220 °C, pendant un temps de séjour de quelques secondes à quelques heures et en présence d'acide (généralement de 0,2 à 3 % en poids, dans le cas de l'acide sulfurique). La température étant supérieure à 100 °C, la cuisson se fait donc à une pression supérieure à la pression atmosphérique. Ce prétraitement a pour objectif de rendre la fraction cellulosique plus accessible en retirant une fraction majoritaire d'hémicelluloses, voire en altérant la lignine (répartition spatiale et structure chimique, inter-liaisons). La cuisson acide permet de récupérer généralement 40 à 90 % du xylose sous forme monomérique, et entre 25 et 65 % du glucose après hydrolyse enzymatique de la fraction solide. Fortement dépendant du substrat introduit, le choix des conditions opératoires de prétraitement est un compromis entre d'une part, un prétraitement doux qui ne permet pas une augmentation optimale de l'accessibilité de la cellulose, et d'autre part un prétraitement trop sévère et énergivore qui produit de plus des composés potentiellement inhibiteurs des étapes d'hydrolyse enzymatique et/ou de fermentation. Il est important de comprendre que les conditions optimales de prétraitement diffèrent si l'on raisonne sur la valorisation totale des sucres (récupérés par la solubilisation des sucres polymériques et notamment ceux des hémicelluloses, moins stables), sur le rendement de conversion de la cellulose en monomères de glucose par l'hydrolyse enzymatique ou sur le bilan après fermentation. Le raisonnement de cette étude porte uniquement sur l'optimisation du rendement de conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique.

La température de cuisson, la concentration en acide, la nature de l'acide, la teneur en matière sèche, et la granulométrie du substrat de base influencent la transformation de la biomasse lignocellulosique pendant le prétraitement, pouvant résulter en une modification de la digestibilité enzymatique du substrat obtenu. Une variante consiste à ne pas introduire d'acide, dans ce cas la température est globalement plus élevée (>190 °C) et le prétraitement est nommé hydrothermal. Dans un tel cas, un comportement acide est observé, par la forte autoprotolyse de l'eau dans ces conditions, et par la libération progressive des acides organiques libérés au cours du prétraitement, d'où le qualificatif "auto-hydrolyse" utilisé.

La sévérité du prétraitement est fonction de la température et du temps de séjour. Le facteur de sévérité combinée est une fonction de la température et du temps de séjour, qui tente de quantifier la dégradation subie par le substrat, pour un acide choisi. Ce paramètre est proposé par Overend et Chornet [83] et repris notamment par Jacquet *et al.* [84], pour essayer de rendre comparables les effets des paramètres opératoires sur la modification chimique induite au substrat. Elle s'exprime comme suit :

$$\text{Soit : } F_0 = \text{Log}_{10} \left(\sum \Delta t \times e^{\frac{(T-100)}{14.75}} \right)$$

avec t le temps de séjour et T la température du prétraitement.

Cela permet par exemple de déterminer comment modifier les paramètres pour obtenir une même sévérité en diminuant la température mais en compensant par une augmentation du temps de séjour. Cependant, il n'y a pas toujours équivalence entre les paramètres, notamment lorsqu'on se place dans des plages de conditions opératoires pour lesquelles il existe des phénomènes transitoires importants : phénomène de diffusion lorsque le temps de séjour est très réduit, ou hydrolyse des polysaccharides à très haute température. Ainsi il peut être intéressant d'étudier l'effet des différents paramètres, indépendamment les uns des autres. Par ailleurs, il faut savoir qu'il existe des variantes de cette équation pour calculer la sévérité du prétraitement, et certaines prennent en compte l'acide ajouté, *via* le pH.

La température est un paramètre crucial dans l'efficacité du prétraitement vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique. L'obtention d'un compromis entre réactivité du substrat à l'hydrolyse enzymatique par élimination des hémicelluloses et altération de la lignine et la dégradation des sucres en inhibiteurs est fortement liée à la température de cuisson acide. Les études se sont attachées à étudier l'influence de la température pour un temps de séjour défini [85]. Elles montrent que la digestibilité enzymatique passe par

un maximum qui dépend du temps de séjour et de la concentration en acide [86]. L'évolution de la surface accessible des substrats suit une évolution similaire.

De la même manière, pour une température fixée et dans la gamme classique d'utilisation, l'augmentation du temps de séjour augmente la digestibilité du substrat, jusqu'à obtenir un maximum, puis toute augmentation du temps de séjour s'avère délétère pour la réactivité enzymatique du substrat [85]. Egalement, l'augmentation de la concentration en acide augmente la sévérité du prétraitement, et donc permet dans un premier temps l'augmentation de la digestibilité du substrat, puis une diminution de la quantité des différents sucres solubilisés ainsi que de la quantité de fraction solide.

D'autres paramètres peuvent avoir une influence sur l'efficacité du prétraitement vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique, comme le taux de matière sèche ou la granulométrie initiale de la biomasse. Pour l'essence *Brassica carinata* L. (moutarde d'Ethiopie) par exemple, il fut montré que les meilleures performances en hydrolyse enzymatique sont obtenues pour une granulométrie initiale comprise entre 8 et 12 mm [87]. Pour d'autres, une diminution de granulométrie peut même s'accompagner d'une baisse de réactivité sur la plage 5-25 mm (cannes de maïs, [88]). Inversement, il semble que pour une granulométrie bien plus fine (<0,1mm), le broyage post-traitement permet encore d'augmenter la digestibilité de la paille de blé [42,89]. Et de même, pour des broyages très fin de substrats non traités (1-7 µm), l'augmentation de la digestibilité est bien observée [89]. En conclusion, il semble que sur la plage de granulométrie utilisée à l'échelle industrielle (de l'ordre de quelques millimètres), la taille de particule ait peu d'impact sur le rendement en glucose. Si le broyage peut constituer un prétraitement à part entière [81], il est dans les faits trop énergivore (notamment pour le bois) pour pouvoir être considéré à une échelle industrielle [90,91].

ii Effets de la cuisson acide sur les propriétés d'une biomasse

Les conditions de température et de concentration en acide permettent de réaliser une hydrolyse des hémicelluloses sous la forme de monomères et oligomères de pentoses et d'hexoses. Le retrait de cette fraction a pour conséquence de laisser des vides, ce qui se traduit par une augmentation de la porosité caractérisée par une surface développée plus importante et une cellulose directement accessible aux enzymes cellulolytiques.

Modifications chimiques

Les effets chimiques du prétraitement de cuisson acide sont résumés dans la Figure 14 dépendamment de la sévérité qui est fonction de la température et du temps de séjour :

- Le premier effet de la cuisson acide, à faible sévérité, est l'élimination de la fraction la moins stable des hémicelluloses (arabinoxylanes notamment), ainsi que des acides hydroxycinnamiques naturellement fixés sur les hémicelluloses et la lignine. Les groupements acétyles des hémicelluloses sont en partie libérés sous forme d'acide acétique. Les sucres hydrolysés se retrouvent alors sous forme solubilisée en monomères et oligomères dans le milieu liquide, prêts à être fermentés.
- A plus haute sévérité, la plus grande partie des hémicelluloses est hydrolysée, ce qui augmente le taux de cristallinité de la biomasse (la cellulose est en proportion plus présente). La fraction la moins stable de la cellulose (zones amorphes) commence à être légèrement hydrolysée en glucose. Cela se traduit par une augmentation du taux de cristallinité de la biomasse, une augmentation légère de la taille moyenne de cristallites (les plus petits cristaux sont hydrolysés plus rapidement) ainsi que par une diminution du degré de polymérisation [86,92–94]. Dhabhai *et al.* [95] observent une augmentation de l'indice de cristallinité pour de la paille de blé de 60,1 à 66,7 %. Par contre, lorsque la sévérité devient très élevée, la cristallinité se dégrade jusqu'à 51,3 %.
- Ensuite, la fraction résiduelle des hémicelluloses est éliminée, la cellulose (amorphe principalement, puis cristalline également) s'hydrolyse peu à peu, et une dégradation des oses est observée, sous forme notamment de furfural pour les pentoses, et sous forme de 5-hydroxyfurfural (5-HMF) pour les hexoses. La lignine n'est pas éliminée mais sa structure est altérée, des fonctions cétones sont créées.

- A sévérité extrême, les premiers produits de dégradation des sucres (furfural et 5-HMF) sont à leur tour dégradés en acides aliphatiques (les principaux étant l'acide formique et l'acide lévulinique). Des composés à plus fort poids moléculaire peuvent également être formés, sous l'appellation d'humines ou de pseudo-lignine, par réactions de déshydratations et condensations de produits de dégradation des polysaccharides [96–99]. Une description plus détaillée de ces macromolécules étant indiquée par la suite dans ce chapitre [100,101].

Ainsi, en conditions sévères, la dégradation de la lignine produit des composés phénoliques, celle des sucres produit des furanes (furfural pour les pentoses, 5-HMF pour les hexoses, tous deux formant aussi des composés furaniques), et des acides aliphatiques (à savoir les acides formique, acétique, et lévulinique) pour ne citer que quelques exemples. Ces composés peuvent s'avérer inhibiteurs de la fermentation (5-HMF et furfural principalement), et potentiellement aussi de l'hydrolyse enzymatique.

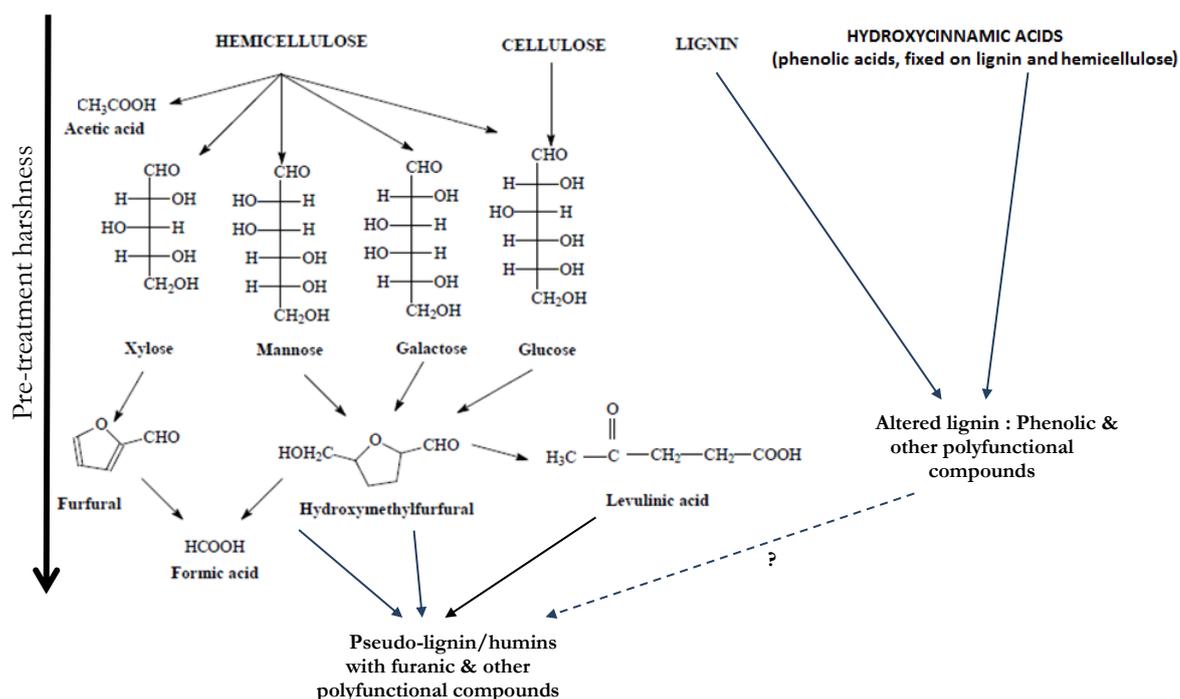


Figure 14 : Mécanismes chimiques de dégradation des trois principales macromolécules de la biomasse lignocellulosique. Adapté de [102]

Coalescence de la lignine

A partir d'une certaine température (130 °C, [103]), une partie de la lignine se retrouve fondue et s'extrait de la matrice, par sa nature hydrophobe et sous l'effet de forces capillaires. Pendant la phase de refroidissement (fin du prétraitement), la lignine se solidifie en surface ou entre deux parois, sous la forme de gouttes (forme qui minimise l'énergie de surface) de taille microscopique entre 100 nm et quelques microns [101,103–108].

Plusieurs études suggèrent l'existence de deux lignines distinctes pour une même biomasse, et qui peuvent se retrouver sous forme de gouttes aux structures chimiques également distinctes. Selon Zeng *et al.* [108], il existe deux types de lignines coalescées en gouttes, visualisées par microscopie à imagerie de temps de fluorescence, pour du peuplier traité par cuisson acide (acide maléique de 0,025 à 0,25M, température de 160 °C, et temps de résidence de 60s, et pression de 5,31 bar). Les deux types de lignines furent différenciés par une différence de temps de vie de fluorescence. La première possède une structure dense, et est initialement présente dans la lamelle moyenne. L'autre lignine possède une structure plus lâche, et est présente dans la paroi secondaire. Cette lignine peu dense est associée aux hémicelluloses. Ces observations vont dans le même sens qu'une autre étude qui, par microscopie infrarouge, différencia les

gouttes de lignine concentrées, de zones riches en lignine et polysaccharides [109]. Ainsi, l'extraction aisée de la lignine peu dense avec les hémicelluloses lors d'une cuisson acide permet d'obtenir une bonne digestibilité du substrat en dépit d'une forte teneur en lignine résiduelle dans la matrice dans la lamelle moyenne, alors que l'extraction de la lignine dense serait néfaste soit par sa structure ou sa répartition spatiale, soit par le fait qu'une sévérité de prétraitement trop élevée ait été employée. Le NREL (*national renewable energies laboratory*) montra en 2007 par des clichés de microscopie électronique à balayage (MEB), l'existence de deux morphologies de lignines extraites, comme l'illustre la Figure 15 [103]. Une autre étude [105] confirma par observation microscopique électronique à transmission (MET), la présence de sphères redéposées, et du regroupement de la lignine dans la structure cellulaire sous forme concentrée. Pour résumer, par le prétraitement à l'acide dilué, la lignine peut être délocalisée sous forme de gouttes situées en surface ou à l'intérieur de la matrice, ou bien de manière concentrée localement dans la paroi Figure 16

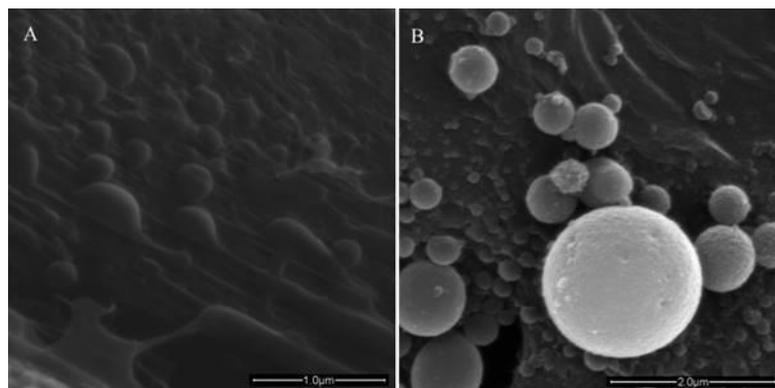


Figure 15 : Observations MEB de gouttelettes de lignine condensée ; a : structures émergent depuis la surface ; b : gouttes sphériques redéposées [103]

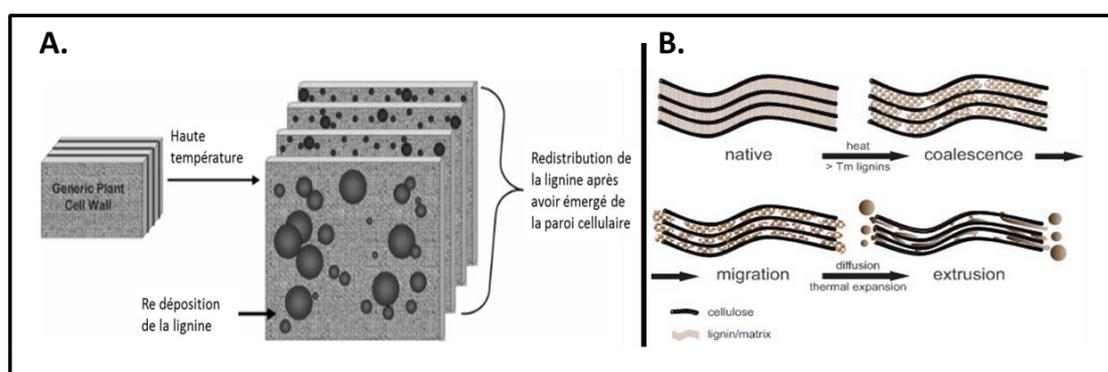


Figure 16 : Modèle simplifié de Selig *et al.* [103] (A) et de Donohoe *et al.*, [105] (B) pour la migration de la lignine durant un prétraitement à l'acide dilué

Dans le cas d'un matériau composé uniquement de cellulose et d'hémicelluloses, des gouttelettes de pseudo-lignine (ou humines) cette fois-ci, peuvent aussi être observées comme nous le discuterons par la suite. Ces composés seraient principalement, formés à partir des hémicelluloses, car moins stables que la cellulose [101], et secondairement de cellulose. Leur présence semble alors préjudiciable à l'hydrolyse enzymatique, la pseudo-lignine brune formée masquant tout ou une partie de la cellulose. Des observations similaires furent faites sur des échantillons synthétiques préparés par mélange de cellulose et d'hémicelluloses pures [100]. A haute sévérité et pour un échantillon réel, la coalescence de lignine est donc couplée avec la formation d'humines.

Effet de la cuisson acide sur la taille des particules

Chen *et al.* [110] suivirent la taille moyenne des particules de bagasse de canne à sucre par granulométrie laser après différents prétraitements par cuisson acide (130, 160 et 190 °C). Ils purent ainsi montrer que plus la température du prétraitement était élevée, plus les fibres se fragmentaient, faisant ainsi apparaître

des particules plus petites. Une autre étude au contraire, semble indiquer qu'à partir d'une certaine sévérité de prétraitement, la taille des particules ne diminuait plus significativement, pour de la paille de blé notamment [111].

Effet de la cuisson acide sur la cristallinité

La phase amorphe étant la moins stable thermodynamiquement de la cellulose (zones amorphes) commence à être légèrement hydrolysée en glucose. Ce phénomène est amplifié à plus forte sévérité. Cela se traduit par une augmentation légère de la taille moyenne de cristallites (les plus petits cristaux sont convertis en premier) ainsi que par une diminution du degré de polymérisation et par une augmentation de l'indice de cristallinité de la cellulose [86,92,93,112].

Il est possible de citer par exemple l'étude de Dhabhai *et al.* [95] qui observèrent une augmentation de l'indice de cristallinité pour de la paille de blé de 60,1 à 66,7 %, avec un traitement à l'acide dilué (120 °C pendant 120 min à 2 % pds d'acide sulfurique). Par contre, lorsque la sévérité devient très élevée, la cristallinité se dégrade jusqu'à 51,3 %.

Effet de la cuisson acide sur la surface accessible

Les prétraitements de cuisson acide et d'explosion vapeur ont pour effet d'augmenter la surface de la matrice lignocellulosique, comparativement à la même biomasse non traitée [113], ce qui provoque par là même, l'augmentation du rendement en glucose de l'étape de l'hydrolyse enzymatique. La principale raison invoquée est le retrait des hémicelluloses, qui, une fois hydrolysées, laissent des vides dans la matrice.

Différents auteurs [114], Meng *et al.* [113,115], Dhabhai *et al.* [95,116]) analysèrent la surface spécifique de biomasse lignocellulosique, avant et après prétraitement, par physisorption d'azote (méthode BET). La surface spécifique peut aisément être doublée sur miscanthus, passant de 1,5 m²/g à 3 m²/g pour une sévérité de prétraitement modérée [114]. Meng *et al.*, [115] montrèrent sur du peuplier prétraité que la surface spécifique augmentait en fonction de la sévérité du prétraitement : en présence d'acide à 120 °C/10 min, 160 °C/10 min et 160 °C/60 min, respectivement de 1,99, 2,34 et 5,85 m²/g. A l'inverse en absence d'acide, les valeurs de surface spécifique ne sont pas significativement différentes. Par ailleurs, les mêmes auteurs montrèrent aussi que la cuisson acide (acide sulfurique à 150 °C) avait pour effet d'augmenter la taille des pores, mais aussi de créer une nouvelle porosité centrée sur 2,2 nm. Il semble que l'expansion de la porosité et l'augmentation de la surface spécifique soient majoritairement induites lors des dix premières minutes de cuisson. Enfin Dhabhai *et al.* montrèrent aussi pour de la paille de blé, qu'une augmentation de la sévérité du prétraitement conduisait à une augmentation de la surface spécifique, par exemple de 4 m²/g (état natif) à 7,1 m²/g pour un prétraitement à 180 °C pendant 7 min et 0,5 % pds d'H₂SO₄ [95]. Cependant, à partir d'une certaine sévérité (3,58), lorsque les hémicelluloses ne sont plus présentes ou présentes de manière très résiduelle, la surface accessible et le volume poreux peuvent légèrement diminuer avec l'augmentation de la sévérité des conditions opératoires [117]. Il semble que cette surface diminue légèrement à une sévérité plus haute que celle permettant le rendement maximal en hydrolyse enzymatique, du fait d'une déformation structurelle et d'une compression des pores.

iii Conclusion sur la cuisson acide

Les modifications physicochimiques apportées par le prétraitement et ses conditions opératoires se traduisent directement en termes de réactivité des substrats vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique. Badal, Saha *et al.* [85] montrèrent par exemple que pour du panic érigé, la digestibilité du substrat pouvait être améliorée de plus d'un facteur 2 (comparativement au substrat natif) par la réalisation d'une cuisson acide (0,07 g/g glucose pour le substrat natif, à 0,17 g/g pour un prétraitement à 0,5 % d'acide sulfurique à 120 °C pendant une heure [118]). Tant qu'il reste une fraction non négligeable d'hémicelluloses, l'augmentation de la sévérité provoque une amélioration de la réactivité des substrats en hydrolyse enzymatique. Ensuite, une sévérité trop forte aboutit à des produits de dégradation non désirés : certains solubles, d'autres solides (humines). L'évolution du rendement en glucose par hydrolyse enzymatique en fonction du facteur de sévérité décrit donc une parabole qui passe par un maximum pour une sévérité intermédiaire et chute ensuite à plus forte sévérité [119].

b. Explosion vapeur

i Principe et domaine des conditions opératoires

L'explosion vapeur est un prétraitement qui consiste à réaliser une montée en température et en pression en milieu aqueux avec ou sans acide, suivie d'une détente explosive du substrat. Ce prétraitement est donc très proche du traitement à l'acide dilué, la principale différence provenant de la détente explosive. Les gammes classiques des conditions opératoires testées sont les suivantes :

- Une température de 120 à 260 °C [102,120]
- Une pression de 4 à 30 bars
- Un temps de séjour de 1 min à 30 min [102]
- Une concentration en acide (sulfurique le plus souvent) de 0 à 2 %, proche de celles utilisées chez les traitements à l'acide dilué

Ce prétraitement fait l'objet d'intenses recherches du fait de son potentiel à améliorer la réactivité des substrats tout en produisant une faible quantité de produits toxiques (acides minéraux le plus souvent, comme l'acide chlorhydrique, sulfurique, ou phosphorique). Il permet notamment d'obtenir de très bons rendements de conversion des hémicelluloses avec souvent à un taux de conversion supérieur à 70 % pour la cellulose comme pour le xylane [121].

Il fut montré que le couple température-pression en explosion à la vapeur permet une déchirure de la matrice, une dépolymérisation de la lignine, une défibrillation de la cellulose, et une solubilisation des hémicelluloses [122]. En effet, le vapocraquage (cuisson en milieu acide) permet de faire pénétrer la vapeur par diffusion à l'intérieur de la structure cellulaire du substrat ce qui va l'humidifier. L'action combinée de l'eau et de l'élévation de température va induire des réactions d'auto-hydrolyse des hémicelluloses en présence ou non d'acide. L'eau se comporte alors comme un acide faible (autoprotolyse de l'eau), et l'hydrolyse des hémicelluloses acétylées libère de l'acide acétique, rendant le procédé auto-entretenu. Par ailleurs, certaines liaisons sont clivées, comme les liaisons β -O-4 aryl-éther de la lignine, qui subissent une rupture homolytique, suivie par une recondensation en liaisons β - β et β -5 [123]. Ensuite la décompression explosive va entraîner des forces de cisaillement et donc l'éclatement mécanique du substrat.

Ce prétraitement permet à la fois une modification chimique de la biomasse mais également une modification morphologique des parois cellulaires : cisaillement, fibrillation, expansion, déchirement, etc.

ii Paramètres affectant l'efficacité du prétraitement par explosion vapeur

Les différents paramètres affectant l'efficacité du prétraitement d'explosion vapeur sont la température, le temps de séjour, le taux d'humidité (ou plus généralement comme pour les prétraitements avec solvant, le taux de matière sèche), la qualité de la détente, la taille des particules avant prétraitement et l'adjonction de produits optionnels.

L'influence de la température et du temps de séjour est la même qu'en cuisson acide car à ce stade du prétraitement, la détente explosive n'a pas encore eu lieu. Egalement, l'augmentation de la teneur en masse sèche dans le milieu réactionnel se traduit par une diminution de la conversion de la cellulose en glucose lors de l'étape de l'hydrolyse enzymatique [121,124], comme l'illustre la Figure 17. Les raisons peuvent être diverses : brassage moins homogène, diffusion ralentie de l'eau et du cocktail enzymatique, augmentation de la concentration en sucres, ...).

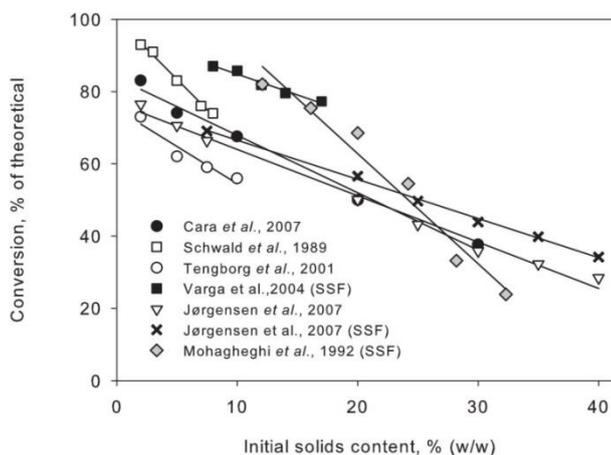


Figure 17 : Taux de conversion de la cellulose suivant de différents substrats lignocellulosiques [124]

En présence d'un fort taux de masse sèche, les produits de dégradations se retrouvent plus concentrés dans le milieu, ce qui peut également gêner la réaction d'hydrolyse enzymatique du substrat solide non lave. L'augmentation du taux de masse sèche semble problématique pour la libération du xylose notamment, pendant la cuisson acide, et donc pour la digestibilité de la fraction solide, à partir d'un ratio liquide/solide de 7 :1 pour de la bagasse de canne à sucre [125,126]. Par ailleurs, en présence d'un fort taux de masse sèche, les produits de dégradations se retrouvent plus concentrés dans le milieu, ce qui peut également gêner la réaction d'hydrolyse enzymatique du substrat solide non lavé.

Concernant l'influence de la taille des particules avant prétraitement, il semble qu'elle soit non négligeable. Deux études [87,88] concluent qu'une trop petite taille de particule limite l'efficacité du prétraitement, ce qui est essentiellement dû à des considérations liées au procédé : l'espacement entre les grandes particules est plus important, ce qui conduirait à une meilleure diffusion de la vapeur au sein de la biomasse. Il n'est à ce titre pas nécessaire de broyer finement la biomasse lignocellulosique, ce qui contribue à rendre ce procédé plus sobre en énergie [127].

iii Effets de l'explosion-vapeur

L'effet du prétraitement par explosion-vapeur sur les propriétés chimiques sont globalement les mêmes que ceux obtenus par cuisson acide et traitement hydrothermal : hydrolyse et solubilisation des hémicelluloses, hydrolyse partielle de la cellulose amorphe, et une altération structurale de la lignine.

Influence de l'explosion vapeur sur la morphologie des particules

La détente explosive a pour effet immédiat de fragmenter les tissus en une texture fibreuse. A température élevée (par exemple supérieure à 180 °C), la structure est déjà bien détériorée avant la détente, rendant les tissus et structures cellulaires quasi non reconnaissables [93]. Les contraintes de cisaillement sont visibles à l'échelle des parois cellulaires [128].

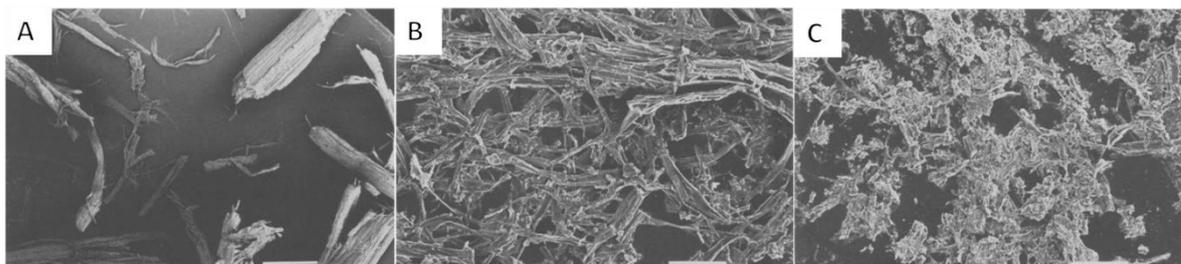


Figure 18 : Microscopie électronique à balayage de paille de chanvre prétraitée à l'explosion vapeur durant 180 seconde (A. 210 °C / B. 220 °C / C. 240 °C) Barre d'échelle 1mm (A), et 100 μ m (B & C) [93]

Influence de l'explosion vapeur sur les tissus

Michalowicz *et al.* [128] observèrent par microscopie des effets du prétraitement par explosion à la vapeur sur des copeaux de peuplier à l'échelle des tissus. Là encore, l'effet dépend de la température du prétraitement. Les parois sont altérées physiquement par l'explosion, que ce soit chez la lamelle moyenne qui semble se détacher de la paroi primaire, ou au niveau de la couche S2 de la paroi secondaire qui est largement déformée. Les stratifications de la paroi secondaire sont possiblement dues aux forces de cisaillement induites par la décompression brutale (Figure 19. B).

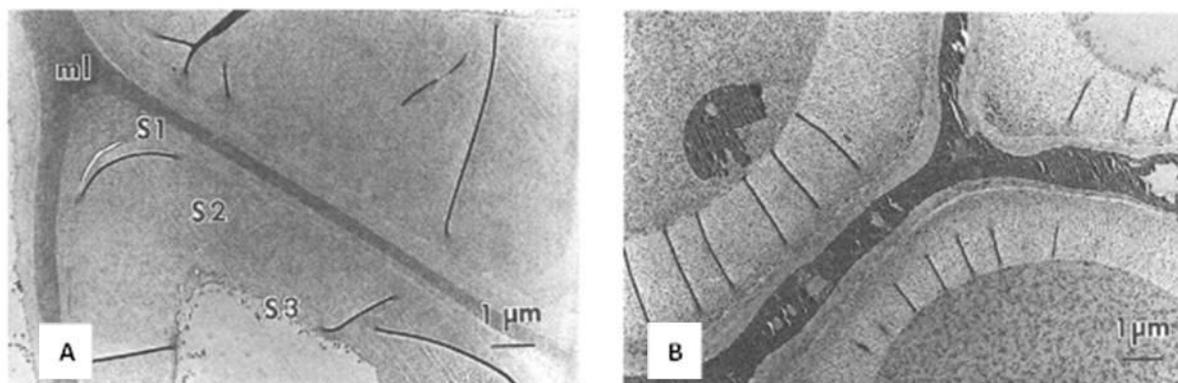


Figure 19 : Coupe transversale de cellules de copeaux de peuplier (A. Non prétraité / B. Prétraité à 227 °C durant 3 min) [128]

Influence de l'explosion vapeur sur la surface accessible

L'explosion à la vapeur a un effet similaire sur les propriétés texturales de la biomasse lignocellulosique (surface, porosité) à la cuisson acide. Cela provient essentiellement du fait que, d'après Michalowicz *et al.*, l'augmentation de la surface accessible ainsi que celle du volume poreux sont essentiellement liées à l'hydrolyse des hémicelluloses [128]. Pour des conditions plus sévères, la porosité augmenterait de par l'apparition de pores centrés autour de 8 Å (par exclusion stérique) possiblement due à l'hydrolyse partielle de la cellulose et à une réorganisation de la matrice lignocellulosique. Plus précisément, Michalowicz *et al.* étudièrent l'impact du prétraitement par explosion vapeur en absence d'acide sur la surface spécifique et le volume des pores accessibles après prétraitement. La taille théorique d'une cellulase étant de 51 Å pour les plus petites, les auteurs calculent le volume poreux accessible par ces enzymes pour un substrat non traité, puis traité à différentes températures (217 °C et 248 °C). Le volume de pores accessibles est alors respectivement de 30 %, 50 % et 70 %. Enfin, Zoulikha *et al* [116] observèrent une augmentation de la surface BET sur de la paille de blé de 0,77 à 1,68 m²/g respectivement pour de la paille native et de la paille prétraitée à 165 °C, 40 min et 2,2 % pds d'H₂SO₄.

Une revue s'intéressa aussi aux modifications de la porosité apportées par les prétraitements d'explosion vapeur et de cuisson acide sur du peuplier [113], par plusieurs méthodes RMN. Cette étude permit de montrer que le prétraitement provoque non seulement une augmentation de la surface accessible, mais également une modification des pores dont l'abondance et la taille augmente avec la sévérité du prétraitement pour la cuisson acide, comme l'atteste la Figure 20. De plus, pour ce substrat (peuplier) et les conditions opératoires testées, on s'aperçoit que l'explosion vapeur est responsable d'une contribution spécifique dans la porosité du matériau, dont la taille des pores est de 3 nm, *a priori* peu propices à la progression des enzymes cellulolytiques dont les tailles avoisinent les 5 nm.

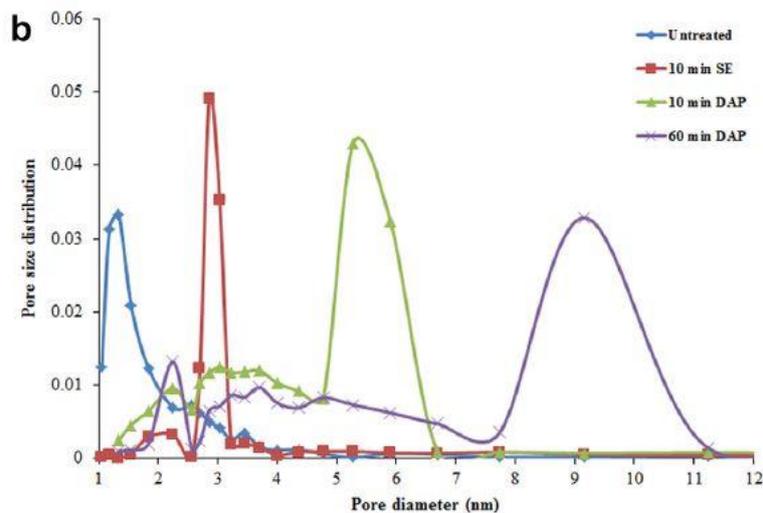


Figure 20 : Distribution en taille de pore déterminée par cryoporométrie RMN sur échantillon non traité (courbe bleue), traitée par explosion vapeur (rouge), cuisson acide pendant 10 min (vert), et cuisson acide pendant 60 min (violet) [113]

iv Conclusion sur l'explosion vapeur

La pertinence de l'explosion vapeur proviendrait donc d'un effet complémentaire d'une détente explosive déstructurant à plusieurs niveaux d'échelle une matrice lignocellulosique déjà fragilisée thermo-chimiquement [104]. Le problème de la dégradation des sucres en inhibiteurs de la fermentation (furfural, 5-HMF, catéchol, 4-hydroxybenzaldehyde, vanilline) est toujours présent [129]. Les recherches actuelles s'emploient d'une part à optimiser au mieux les conditions de température et de temps de séjour pour pouvoir traiter diverses matières premières et minimiser le coût du procédé (par un faible temps de séjour, une forte température, et peu d'acide), et d'autre part à rendre le procédé fiable sur le long terme et à l'échelle industrielle qui rencontre souvent des problèmes de maintenance.

c. Conclusion sur les prétraitements

Le rendement en hydrolyse enzymatique de la cellulose en glucose monomérique est largement dépendant de l'hétérogénéité considérée (organes, types de tissus, parois cellulaires). La digestibilité globale du substrat peut être grandement améliorée par l'application d'un prétraitement, afin de rendre plus accessible la fraction cellulosique aux enzymes cellulolytiques. Nous avons vu que le prétraitement de cuisson acide avait différents effets, comme par exemple la solubilisation des hémicelluloses (par leur hydrolyse), ou l'augmentation de la surface accessible (causée principalement par le retrait des hémicelluloses). Ces effets dépendent alors des conditions opératoires du prétraitement. Il est à ce jour difficile de conclure quant à l'importance respective des nombreux paramètres sur la réactivité, par la complexité du substrat d'étude et des phénomènes impliqués lors du prétraitement et lors de l'hydrolyse enzymatique. Pour répondre à ces verrous scientifiques et optimiser potentiellement l'étape de prétraitement, il convient d'avoir une bonne description des substrats prétraités, ce qui souligne l'importance de les caractériser finement. Notre étude sera focalisée sur les paramètres intrinsèques à la matrice solide lignocellulosique, sans considérer les potentiels inhibiteurs chimiques solubles qui pourraient être produits lors du prétraitement, ceci dans le but de faciliter la compréhension des descripteurs spécifiques aux substrats solides.

5. Paramètres physico-chimiques des biomasses prétraitées : caractérisation et lien avec la digestibilité enzymatique

Les substrats lignocellulosiques peuvent être caractérisés à différentes échelles d'observation, depuis les organes très macroscopiques jusqu'à un niveau moléculaire. Ces analyses permettent de mettre en lien les effets du prétraitement sur la biomasse considérée. *In fine*, l'objectif de cette démarche est de déterminer les paramètres impliqués dans la réactivité des substrats à hydrolyser, et plus précisément leur importance relative. L'accessibilité de la cellulose aux enzymes est un paramètre clef de l'efficacité de l'étape d'hydrolyse enzymatique. Or cette accessibilité est fonction de l'environnement physique et chimique dans lequel se situe la cellulose : une caractérisation pertinente de cet environnement doit donc permettre de mieux comprendre comment un prétraitement peut améliorer la digestibilité enzymatique d'un substrat. Cette caractérisation devra être établie pour les principaux types de tissus présents dans un végétal, les travaux de la littérature mettant en évidence des différences significatives en termes de digestibilité enzymatique selon les tissus observés. La Figure 32 illustre les paramètres qui peuvent être suivis, dépendamment de l'échelle considérée.

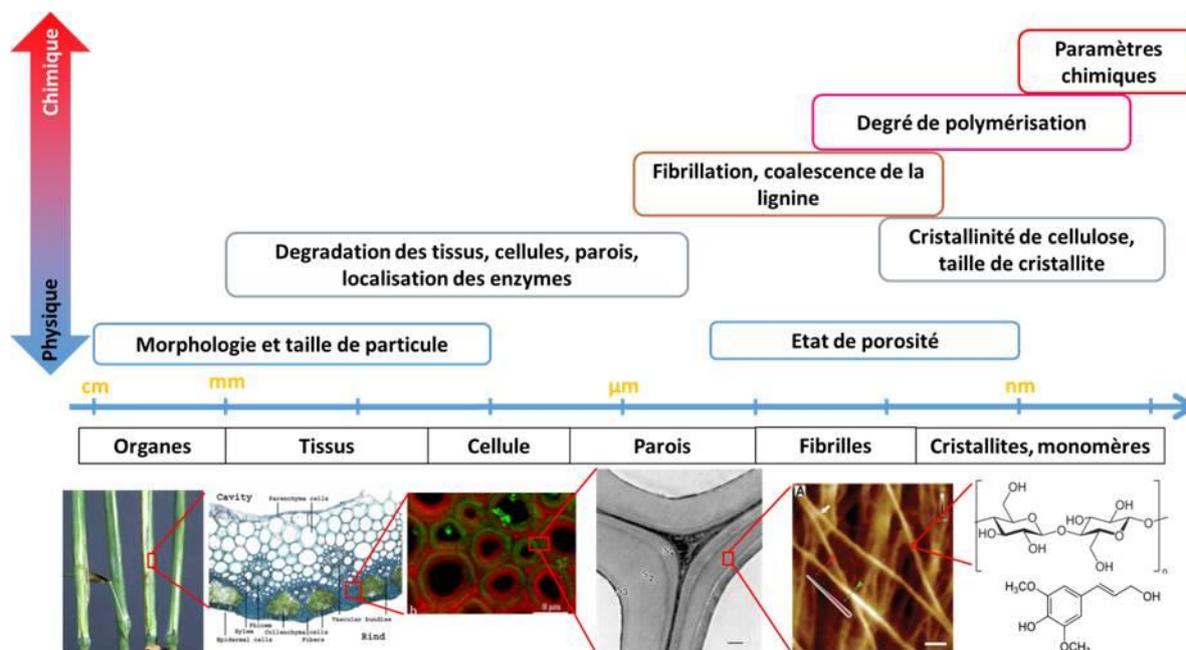


Figure 21 : Classement des paramètres principaux pouvant être utilisés pour la caractérisation de la biomasse lignocellulosique solide. Adapté de [24,58,130,131]

a. Taille et morphologie des particules

Les propriétés macroscopiques des substrats au niveau des particules, font partie des propriétés étudiées. Plus précisément, diverses études se sont intéressées à l'effet du prétraitement sur la distribution en tailles de particules [110], l'impact de la taille des particules sur la digestibilité du substrat [87,88,110]), ou encore l'évolution de celle-ci en fonction du temps d'hydrolyse [132](sur différents allomorphes de cellulose).

La revue de Taherzadeh [133] (université de Borås) indique que la réduction de la taille de particule engendre une amélioration de la digestibilité du substrat. Cependant, il est difficile d'être certain que l'origine de l'augmentation de la digestibilité provient de la taille de particule, plutôt que de la réduction de

crystallinité engendrée, ou même des modifications chimiques induites par échauffement local lors du broyage.

En outre, la réduction de la taille des particules par un broyage post-prétraitement peut augmenter significativement la digestibilité des substrats [79].

i Evolution de la granulométrie au cours de l'hydrolyse enzymatique

D'après une étude de Kinnarinen *et al.*, l'hydrolyse enzymatique a pour effet de fragmenter la matrice de manière légère, et principalement en début d'hydrolyse, peu de temps après l'adjonction du cocktail enzymatique (étude faite sur du carton) [134].

Une autre étude montra que la digestion de la cellulose microcristalline est caractérisée par une diminution de la taille des particules, principalement durant la première phase de l'hydrolyse (les 20 premières heures [132], quel que soit l'allomorphe de cellulose considéré ou le type de cocktail enzymatique (*Trichoderma reesei*, ou *Aspergillus niger*)).

A l'échelle nanométrique, le suivi des microfibrilles de cellulose par AFM (en *in situ*, pendant la dégradation enzymatique) d'une part et par MET (en *ex situ*) d'autre part, indique que durant l'hydrolyse enzymatique, les fibrilles subissent une réduction de leur diamètre, par attaque des cellulases depuis la surface. Par ailleurs, la structure fibrillaire de la matrice à l'échelle nanométrique est dégradée différemment suivant le type d'enzyme utilisée : dans le cas d'enzymes complexées (cellulosomes) par exemple, la déconstruction des assemblages de fibrilles est facilitée sous la forme d'un effilochage, alors que la libération de glucose est à l'inverse plutôt limitée, comparativement aux enzymes libres [72,130].

ii Moyens de caractérisation

La granulométrie par diffraction laser est classiquement utilisée pour caractériser la distribution en taille de particules d'un échantillon pulvérulent de biomasse lignocellulosique. L'inconvénient limitant son utilisation à la biomasse lignocellulosique est la mauvaise représentativité de l'analyse, dont la théorie s'appuie sur l'hypothèse de particules sphériques, ce qui n'est absolument pas le cas pour ces types de poudres. D'autres méthodes sont utilisables, comme l'analyse des particules sur la base d'observations macro/microscopiques. Certaines méthodes utilisent des prototypes [135,136] tandis que d'autres méthodes sont normalisées comme l'analyse de taille de fibre par *Fibre Quality Analysis* FQA [120,137]. Différents traitements d'images permettent de déterminer une distribution en taille de particule, à partir des images acquises. Ces techniques peuvent être utilisées de manière complémentaire et comparative avec la granulométrie par diffraction laser.

La morphologie peut être observée qualitativement par microscopies électroniques à balayage (MEB) ou à transmission (MET). La MEB et la MET permettent de visualiser la fragmentation et le cisaillement des substrats, à l'échelle des particules, tissus, et des parois.

b. Porosité et surface

L'état de porosité et en particulier la surface développée et accessible de l'échantillon est un paramètre très important pour décrire correctement un système lignocellulosique, notamment pour ce qui est de la digestibilité de la fraction cellulosique en hydrolyse enzymatique.

i Liens entre état de porosité et digestibilité

L'augmentation de surface accessible se traduit par une plus grande réactivité enzymatique [117,138]. Cette relation est vérifiée quelle que soit la source de la modification de cette surface (broyage très fin, élimination des hémicelluloses ou de la lignine). Par contre sa détermination fait débat avec des questionnements sur le choix des méthodes: analyse à sec ou sous forme hydratée, sur la pertinence des mesures vis-à-vis de l'accessibilité des enzymes [125].

Des études portant sur la relation entre la taille des pores et l'hydrolyse enzymatique suggèrent que les petits pores (diamètre inférieur à la taille des cellulases) empêchent l'hydrolyse et que les pores dont le diamètre excède la taille des cellulases améliorent la réactivité du substrat [139]. Seules les petites protéines pourraient pénétrer dans les petits pores mais leur activité serait réduite du fait de leur confinement à l'intérieur des pores [140]. De plus, plus on comprend bien que plus les pores sont petits et/ou tortueux, plus ils vont pouvoir être comblés et causer des blocages des enzymes. Cette hypothèse est en accord avec le fait qu'il y a une corrélation affine entre la réactivité en hydrolyse enzymatique mesurée sur un mélange de biomasse (peuplier et pins) prétraités et le volume poreux calculé (ou surface accessible) pour des tailles de pores supérieures à 5,1 nm représentatives de la taille moyenne des cellulases obtenues avec *Trichoderma reesei* [116,138,141]. Plus précisément, les cellulases sont grossièrement sphériques, avec une taille comprise entre 2,4 et 7,7 nm, et une taille moyenne de 5,9 nm [139].

ii Evolution de la surface au cours de l'hydrolyse

L'évolution de la porosité au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose n'a pas été étudiée à ma connaissance dans la littérature. Une étude montre cependant que pour de l'épicéa prétraité par explosion vapeur, la surface accessible passe de 12 m²/g avant hydrolyse, à 2,5 m²/g après hydrolyse [142]. Cela suggère un lissage des de la surface des particules par l'hydrolyse de la fraction cellulosique. La température choisie de 250 °C pour désorption du substrat rend cependant ce résultat discutable quant à la préparation d'échantillon (l'échantillon a pu être dégradé, tant chimiquement que physiquement).

iii Moyens de caractérisation

L'état de porosité peut être estimé par de nombreuses manières, toutes les méthodes ayant leurs spécificités, avantages et inconvénients [113,125]. Le Tableau 4 synthétise les différentes caractéristiques des différents outils analytiques qui peuvent être utilisés. Au-delà de la simple porosité, il est intéressant de remarquer que, pour certaines techniques, il est possible de sonder spécifiquement l'accessibilité de la cellulose, au sein de la matrice lignocellulosique.

Tableau 4 : Synthèse des techniques analytiques permettant d'estimer la porosité et l'accessibilité de la cellulose dans une matrice lignocellulosique. Traduit et complété de [113].

Technique analytique	Accessibilité de la cellulose	Avantages/inconvénients
Coloration de Simon	Ratio des concentrations en colorants adsorbés (par analyse du surnageant) : [orange]/[bleu]	Avantages : <ul style="list-style-type: none"> • Mesures sur substrats humides • Plutôt rapide, simple, et précis • Possibilité de mesurer les surfaces intérieure et extérieure Inconvénients : <ul style="list-style-type: none"> • La mesure dépend de la forme et de la tortuosité des pores • Pas complètement quantitatif
Exclusion de soluté	Surface spécifique disponible à un diamètre de 5,1 nm	Avantages : <ul style="list-style-type: none"> • Mesures quantitatives, en milieu humide Inconvénients : <ul style="list-style-type: none"> • Fastidieux, non spécifique envers la cellulose, ne prend pas en compte la surface externe • Précision affectée par certaines formes de pores irrégulières
Physisorption d'azote	Surface de Brunauer-Emmett-Teller (BET)	Avantages : <ul style="list-style-type: none"> • Méthode précise, robuste, rapide, simple • Non destructif Inconvénients : <ul style="list-style-type: none"> • Nécessite des échantillons secs, donc engendre des questionnements sur la représentativité de la matrice analysée • Accessibilité surestimée de la cellulose aux enzymes, par la petite taille de la molécule N₂
Cryoporométrie par RMN	Volume poreux cumulé (2-10 nm)	Avantages : <ul style="list-style-type: none"> • Mesure non affectée par la forme et la taille de l'entrée du pore • Non destructif • Réalisé en milieu humide Inconvénients : <ul style="list-style-type: none"> • Coûteux, nécessite un paramétrage complexe et un long temps d'acquisition
Relaxométrie par RMN	Temps moyen de relaxation T1 de l'eau lourde D ₂ O dans la biomasse	

Ce tableau ne prétend pas être exhaustif ; en effet, d'autres techniques d'analyse de la porosité ou de l'accessibilité de la cellulose existent : la coloration DR28, l'adsorption à froid de protéines, la thermoporométrie (par analyses thermogravimétriques), la porosimétrie au mercure, la diffusion de lumière SAXS (*Small Angle X-rays Scattering*), la FRAP (*Fluorescence Recovery After Photo-Bleaching*), ou encore la mesure de valeur de rétention d'eau et la mesure du point de saturation. Ci-dessous sont décrites quelques-unes de ces techniques.

Physisorption de gaz

La caractérisation par la physisorption de gaz comme l'azote ou le krypton est également utilisée [94,95,125,143] pour obtenir des informations concernant la microporosité (diamètre inférieur à 2 nm) et la mésoporosité (diamètre compris entre 2 et 50 nm) principalement. Plus précisément, ces techniques permettent de calculer plusieurs grandeurs texturales que sont :

- la surface spécifique qui correspond à l'étendue des surfaces interne et externe du solide accessible aux réactifs (atomes ou molécules). Elle est exprimée en $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ et est déterminée via la méthode B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller, [144]) dans le domaine P/P_0 compris entre 0,05 et 0,35 [145],
- le volume poreux total représente le volume des micropores et des mésopores accessibles à un adsorbable. Il est exprimé en $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ et est déterminé à la fin de l'adsorption ($P/P_0 \sim 1$),
- la distribution mésoporeuse qui est la répartition du volume poreux en fonction de la taille des pores (1,5 nm à 30 nm). Elle est déterminée via le modèle Barret, Joyner, Halenda, B.J.H [146].

La technique de physisorption d'azote est controversée pour l'analyse de la biomasse, par le fait qu'elle nécessite un séchage de l'échantillon avant l'adsorption du gaz. Ce séchage peut provoquer un effondrement des parois cellulaires, mais également un changement structural des microfibrilles de cellulose.

Piccolo *et al.* (2010) ont étudié l'impact des conditions de séchage sur la porosité mesurée par physisorption d'azote (surface B.E.T et répartition poreuse) de diverses biomasses brutes ou prétraitées sous explosion vapeur en présence d'acide (SO_2) : sapin, cellulose Avicel et paille de blé [147]. Les résultats obtenus montrent une variation de la surface avec les conditions de séchage. Globalement, celle-ci augmente avec la sévérité du séchage (105 °C, 2 jours vs 20 °C, 5 jours). La comparaison des distributions poreuses après les deux types de séchage a permis de montrer que les profils pouvaient être différents selon les conditions de séchage des ressources lignocellulosiques notamment sur les échantillons de pailles de blé. Cette étude illustre le fait que l'étape de séchage est susceptible de modifier les caractéristiques texturales de la biomasse et, potentiellement, conduire à des erreurs d'interprétation.

Exclusion de soluté

Cette technique sonde la matière en milieu aqueux grâce à l'utilisation de plusieurs molécules sondes (souvent des polyéthylènes glycol, dextrans) de taille connue [148]. En analysant la concentration de cette molécule dans le solvant après un certain temps, la quantité de molécule adsorbée sur le substrat est déduite. Cette méthode permet de mesurer l'accessibilité du matériau à l'état hydraté. Par cette méthode, Grethlein (1985) montra une corrélation entre digestibilité et volume poreux accessible à une molécule d'une taille de 51 Å. En utilisant successivement plusieurs tailles de molécules, il est ainsi théoriquement possible de caractériser la mésoporosité du matériau. Cependant, le temps nécessaire à la caractérisation d'une distribution de pores est conséquent [141]. Une amélioration de la méthode pourrait porter sur l'utilisation simultanée de molécules sondes de tailles différentes, et non par une multitude d'étapes d'imprégnation suivie de l'analyse de la concentration, et de lavage [149]. Cependant tout comme la physisorption d'azote, la méthode n'évalue pas spécifiquement la surface accessible de la cellulose mais l'accessibilité générale.

Cryoporométrie RMN bas champ

La cryoporométrie exploite le fait que la variation de point de congélation de l'eau dépend du diamètre de pore dans laquelle elle est contenue. Ainsi, en mesurant le signal de l'eau libre dans l'échantillon, il est possible d'obtenir une distribution en taille de pores. Concernant la biomasse lignocellulosique, il existe quelques études portant sur cette technique [113,150,151], qui montrent la pertinence de cette méthode pour caractériser de tels substrats.

Coloration de Simon et coloration DR28

La coloration de Simon consiste à imprégner le substrat avec de deux molécules colorantes (bleu direct 1 et orange direct 15), à des concentrations croissantes, pour réaliser des adsorptions de type Langmuir

[138]. Les deux colorants possèdent une de taille molécule et une affinité différente envers la cellulose, et absorbent la lumière à des longueurs d'onde différentes : 624 et 455 nm. L'absorbance du surnageant est ensuite mesurée, à 624 et 455 nm, afin de calculer leurs concentrations dans le surnageant, et ainsi la quantité de colorant adsorbé sur la cellulose.

Chandra *et al.* [120] utilisèrent cette méthodologie pour la caractérisation de la biomasse lignocellulosique prétraitée, avant hydrolyse enzymatique (Figure 22, sur différents substrats et conditions opératoires de prétraitement). Dans cette étude, Chandra *et al.* montrèrent que la digestibilité enzymatique de la cellulose était plus fortement corrélée à l'adsorption du colorant orange, qui est connu pour avoir une plus forte affinité avec la cellulose. Le calcul du ratio entre les deux colorants est pertinent car il rend compte de l'accessibilité de la cellulose aux enzymes, pour une porosité donnée.

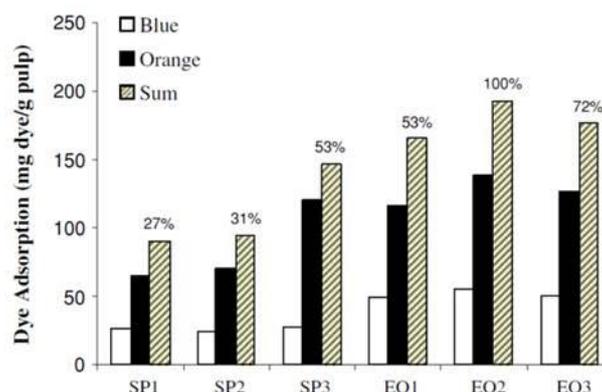


Figure 22. Adsorption de colorant sur le pin tordu ou pin de Murray, suivant les différents prétraitements réalisés : explosion vapeur (SP), ou traitement organosolv avec éthanol (EO). Les pourcentages indiquent les rendements de conversion de la cellulose en glucose des différents substrats à 72h d'hydrolyse enzymatique

La coloration DR28 se base sur le même principe, mais utilise un colorant différent (rouge Congo, ou colorant DR28, d'une taille de $7,4 \times 4,3 \times 26,2 \text{ \AA}^3$, légèrement plus petite que celle des cellulases, afin de réaliser des adsorptions de type Langmuir. La mesure de l'absorbance à 480 nm [138] du surnageant après imprégnation du substrat à différentes concentrations en colorant permet de déterminer la quantité de colorant adsorbée sur le substrat pour chaque concentration initiale. Le calcul de la capacité maximale d'adsorption de Langmuir par régression permet d'estimer la surface cellulosique et donc son accessibilité. Wiman *et al.* purent d'ailleurs conclure que pour de l'épicéa, le traitement par explosion vapeur provoque une augmentation de la surface accessible cellulosique, ce qui tend à expliquer l'augmentation de la réactivité des substrats après cuisson acide (ou explosion vapeur) en dépit d'une augmentation de la proportion de lignine dans le substrat [138].

Adsorption de protéines

Cette méthode consiste à suivre l'adsorption sur la cellulose d'une ou plusieurs molécules de tailles connues et proches de celles des enzymes utilisées. Afin d'être représentatif des enzymes adsorbées lors de l'hydrolyse enzymatique, les protéines utilisées en tant que molécules sondes sont souvent des enzymes cellulolytiques ou de l'albumine de sérum de bovin. Le dosage des protéines non adsorbées (analyse du surnageant après centrifugation) permet d'estimer indirectement la quantité de protéines adsorbées supposément sur la cellulose. L'usage de cellulases qui s'adsorbent spécifiquement sur la cellulose par rapport à d'autres molécules devrait permettre d'obtenir en théorie une mesure plus juste de l'accessibilité de la cellulose. Toutefois, compte tenu de la durée de l'expérimentation (10 à 960 min dans l'étude) l'enzyme active peut hydrolyser le substrat. Aussi, cette expérimentation est réalisée à froid ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), afin de limiter l'activité de l'enzyme [138].

Par cette méthode, Wiman *et al.* [138] établirent un lien entre la réactivité du substrat et l'accessibilité de la cellulose. Ils démontrèrent que la mesure d'accessibilité de la cellulose par cette méthode comparativement aux autres méthodes coloration DR28, coloration de Simon, et adsorption d'azote, était légèrement plus représentative de la réactivité des substrats.

Cette technique, quoiqu'assez plutôt délicate à mettre en application, peut s'avérer très intéressante pour estimer l'affinité des enzymes sur le substrat. En l'absence d'inhibition chimique provoquée par exemple par une adsorption non spécifique sur la lignine ou produits de dégradation ou une altération des enzymes, le taux de conversion de la cellulose devrait être corrélé avec cette affinité enzymatique du substrat. Inversement, dans le cas d'une forte adsorption sur des zones non cellulosiques, l'affinité des enzymes sur le substrat ne serait plus corrélée avec la digestibilité des substrats.

Volume de rétention d'eau (WRV)

Il est aussi possible de mesurer la simple capacité d'un matériau à absorber l'eau. La capacité de rétention d'eau est fonction de plusieurs paramètres. Parmi eux, la composition chimique intervient, car les hémicelluloses ont une affinité pour l'eau légèrement supérieure à la lignine, lui-même plus grand que celui de la cellulose [152–154]. L'état de porosité à diverses échelles a cependant un rôle prépondérant. Il dépend de l'essence de la biomasse, mais également de son état de dessiccation, et bien sûr du prétraitement appliqué.

Le volume de rétention d'eau semble refléter correctement le gonflement de la matrice et l'accessibilité physique de la cellulose aux enzymes. Il fut utilisé dans plusieurs études de la littérature [150,155,156].

Cette mesure reste intéressante car étant une propriété caractéristique de l'absorption d'eau, elle peut être corrélée avec la digestibilité enzymatique qui a lieu en milieu aqueux, notamment pour des échantillons de structures différentes, mais de composition chimique similaire. Une étude montra l'équivalence entre le WRV et le volume poreux déterminé par RMN (classement d'un échantillon de pâte de résineux, à composition chimique identique mais structure poreuse différente par le conditionnement réalisé (séchage à l'air, au four, ou aucun séchage, [156]).

c. Cristallinité de la cellulose

i Effets de la cristallinité sur la digestibilité

La littérature avance régulièrement le fait que la cristallinité de la cellulose joue en la défaveur de sa digestibilité [76,157,158]. Pour autant, la tendance n'est pas toujours évidente. En effet, d'autres études prouvent qu'il n'y a pas de lien évident, comme cela est résumé dans la revue de Mansfield [159], ceci pour plusieurs raisons possibles. D'abord le plus souvent la tendance n'est pas claire. Si l'hypothèse selon laquelle la cellulose amorphe est prioritairement dégradée, on devrait obtenir une augmentation de fraction cristalline au cours de l'hydrolyse. Or les études indiquent une augmentation de la cristallinité de seulement 2 % après 6 jours d'hydrolyse enzymatique [160]. D'autres encore ne mesurent pas de différence du tout [158]. Ensuite, cette tendance est le plus souvent observée pour des substrats cellulosiques, sans autres paramètres pouvant être plus limitants, et empêchant cette limitation de s'exprimer. Une étude de Li *et al.* [161] montre par ailleurs que le taux de cristallinité s'avère être un descripteur clé seulement pour un substrat cellulosique en présence d'une forte dose d'enzymes. Ainsi, s'il existe une tendance, elle semble suffisamment faible pour ne pas être visible pour un substrat lignocellulosique prétraité [162], et avec des charges d'enzymes envisagées à l'échelle industrielle. Ensuite, il est difficile lors de prétraitements de n'impacter que la cristallinité seule, et l'évaluation de ce paramètre sur la digestibilité est bien souvent délicate [163]. En effet, la dé cristallisation par broyage mécanique peut s'accompagner entre autres d'une forte réduction de la granulométrie, d'une légère oxydation de la lignine, d'une dégradation des hémicelluloses par l'augmentation de température, d'une augmentation de la surface accessible, et d'une diminution du degré de polymérisation. D'autre part, l'effet de la cristallinité semble dépendre de la biomasse initiale (conifère, feuillu, ou monocotylédones par exemple).

En considérant des celluloses pures, on retiendra donc que la cellulose peut être moins digeste dans certaines conditions de dégradation. Une illustration de cela est la forte corrélation entre le taux de cristallinité et le taux de conversion initial, ou encore l'existence d'un taux de cristallinité seuil (seuil dépendant de la dose d'enzyme), au-delà duquel l'adsorption des cellulases est réduite (relation affine entre le taux de cristallinité de la cellulose et la quantité d'enzymes adsorbés [158]), en conséquence de quoi le taux de conversion initial de la cellulose est également impacté par le taux de cristallinité, par une relation

affine. Cependant, ce paramètre ne semble limitant que lorsque l'accessibilité de la matrice est déjà optimisée (absence d'hémicelluloses, pas d'inhibition chimique, lignine peu présente ou délocalisée de façon favorable), rendant alors ce paramètre limitant de la cinétique de conversion, et mesurable. Dans le cas de la cuisson acide ou de l'explosion vapeur sur des substrats lignocellulosiques, la présence de lignine ou d'hémicelluloses résiduelles empêche ce facteur limitant de pouvoir s'exprimer.

ii Evolution de la cristallinité au cours de l'hydrolyse enzymatique

Au cours de l'hydrolyse enzymatique, la cristallinité de la cellulose est susceptible d'évoluer, par le fait que la conversion de la cellulose va dépendre de ses allomorphes présents (amorphe, cristalline I_α et I_β dans le cas de la paille native) et des activités spécifiques des enzymes du cocktail relativement à chaque allomorphe. Par exemple, il semble que les cellulases d'*Aspergillus niger* hydrolysent indifféremment la cellulose cristalline ou amorphe, alors que les cellulases de *Trichoderma reesei* hydrolysent préférentiellement la cellulose amorphe [132]. Au cours de l'hydrolyse enzymatique de cellulose cristalline, la même équipe montra que la cristallinité de la cellulose diminue, de même que la taille moyenne des cristallites [132]. Cependant, d'autres études montrent que le taux de cristallinité reste sensiblement le même qu'en début d'hydrolyse [158] ou très légèrement supérieur (6 %, [160]) après une dizaine de jours d'hydrolyse, ce qui laisse penser que l'hydrolyse de la cellulose est réalisée avec la même efficacité sur les zones amorphes que sur les micelles cristallines, suggérant par conséquent que les deux phases ont une digestibilité similaire [158,160]. Pour autant, pour l'équipe de Hall *et al.*, ce n'est pas ce qui est conclu : en effet, ils montrèrent également que le taux initial de conversion diminue linéairement avec l'augmentation de la cristallinité de la cellulose. Ainsi, un changement de taux de cristallinité causerait un changement des équilibres cinétiques entre les ratios d'enzymes libres versus adsorbées et donc sur le taux instantané de conversion de la cellulose, mais sans conséquence sur une possible digestion préférentielle des allomorphes présents.

iii Moyens de caractérisation

La détermination des propriétés de cristallinité des substrats lignocellulosiques est classiquement réalisée par DRX ou par RMN [164]. Cependant il existe d'autres outils et méthodes permettant d'accéder notamment à l'indice de cristallinité de la cellulose [165] : par spectroscopie Raman, infrarouge, ou encore par *vibrational Sum Frequency Generation* (SFG).

Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique universellement utilisée pour identifier la nature et la structure des matériaux cristallins. Cependant, les différents niveaux de désordre au sein des chaînes de cellulose sont responsables du faible nombre de réflexions obtenues sur des diagrammes de diffraction.

A titre d'exemples, les travaux de Sathitsuksanoh *et al.* [164] soulignent une grande variabilité des indices de cristallinité d'un échantillon de panic érigé selon la technique d'analyse DRX ou RMN et la méthode de détermination. Cependant cette étude montre aussi l'équivalence globale des techniques pour une estimation qualitative de l'indice de cristallinité. Plusieurs modes de détermination de l'indice de cristallinité par DRX furent proposés dans la littérature : hauteur de pic, par la méthode de Ségal, déconvolution, soustraction de la contribution amorphe, par la méthode de Rietveld. Le mode de calcul par hauteur de pics est le plus couramment utilisé pour l'analyse de cellulose. L'approche par déconvolution donne les écarts les plus faibles en comparaison avec les données RMN. Cette même étude montre qu'une hausse de la cristallinité est observée pour un substrat séché à l'air, ce qui laisse supposer une recristallisation durant ce séchage à l'air comparativement à la lyophilisation.

Bien que souvent utilisée dans la littérature pour calculer la cristallinité d'un substrat cellulosique ou lignocellulosique [92,95,112,166,167], la DRX ne semble pas être la technique la plus fiable pour évaluer la cristallinité des substrats lignocellulosiques [165], notamment comparativement à la RMN, car la part amorphe du diffractogramme est également fonction des autres macromolécules sans arrangement cristallin. Cependant, l'accès à une taille moyenne de cristallite par cette technique peut rester intéressant.

Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Pour des échantillons de biomasse, l'analyse du noyau de carbone ^{13}C en polarisation croisée est surtout investiguée.

Les phases amorphes et cristallines d'une cellulose (de tout type : celluloses I, II, III ou IV) présentent une signature particulière en RMN du carbone. Dans le cas de la paille traitée par cuisson acide, on ne rencontre que la cellulose amorphe et les allomorphes I_α et I_β (les 3 formes rencontrées à l'état natif), et on a (Figure 23) :

- Le signal à 89 ppm est attribué à la partie cristalline,
- Le signal à 84 ppm est associé à la partie amorphe.

Après décomposition du spectre et intégration des pics associées à la part amorphe et à la part cristalline, il est possible de calculer un indice de cristallinité de la cellulose [168] :

$$\%IC_{RMN} = \frac{I_{\text{bande } 89 \text{ ppm}}}{I_{\text{bande } 89 \text{ ppm}} + I_{\text{bande } 84 \text{ ppm}}} \times 100$$

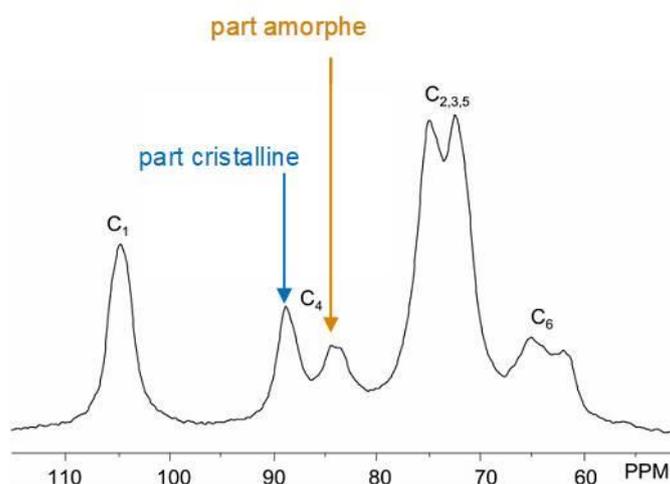


Figure 23 : Exemple d'un spectre RMN du ^{13}C de cellulose, position des pics caractéristiques de la part cristalline (pic à 89ppm) et de la part amorphe (pic à 84 ppm), spectre RMN tiré de [140]

Cette méthode présente l'avantage de donner des indices dont l'incertitude est plus réduite qu'en DRX, mais les temps d'acquisitions légèrement plus longs (1 à quelques heures), de même que le coût de l'équipement et le temps de traitement de données peuvent constituer un frein à son usage.

d. Composition, structure et propriétés chimiques

i Liens avec la digestibilité

Lignine

Taux de lignine

La littérature évoque fréquemment que la présence de lignine s'avère inhibitrice envers la réaction d'hydrolyse enzymatique [76]. La lignine peut être un obstacle physique à l'accessibilité des enzymes à la cellulose car dans la représentation classique de l'architecture de la biomasse lignocellulosique, les microfibrilles de cellulose sont entourées d'un complexe ligno-pecto-hémicellulosique. La deuxième raison

avancée pour laquelle la lignine limite la digestibilité enzymatique est l'adsorption non spécifique des cellulases [55,155,169,170]. Des études montrèrent en effet une diminution de la réactivité avec l'augmentation du taux de lignine [76,79,142,170–172], de même que la concentration en enzyme libre dans le milieu diminue avec la teneur ajoutée en lignine, et dépendamment de la nature de la lignine (biomasse source, méthode de production, [170]). Cependant, d'autres études tendent à montrer que la lignine n'est pas forcément source d'adsorption non spécifique, et que la teneur en lignine n'impacte pas nécessairement négativement la digestibilité du substrat, notamment si la réactivité du substrat est suffisamment bonne [138,173]. La lignine peut être présente sous une structure qui a peu d'affinité avec les enzymes, ou encore s'être délocalisée, ne masquant ainsi plus la fraction cellulosique. Il fut même montré par Timpano *et al.* qu'à partir de substrats natifs, une augmentation du taux de lignine d'une même espèce (*Brachypodium* sauvage et mutant) peut se traduire par une augmentation de la réactivité enzymatique [174]. Par ailleurs, l'équipe IFPEN avait montré que la délignification de paille de blé préalablement traitée par explosion vapeur n'avait pas d'impact significatif sur la digestibilité de la paille, de même que l'addition artificielle de lignine de paille de blé (rendement de conversion similaire à 48h de saccharification, et taux de conversion légèrement amoindri en présence de lignine ajoutée [173]). A l'inverse, ils montrèrent que la conversion de cellulose commerciale (cellulose microcristalline Avicel PH101) était fortement impactée par l'ajout de lignine commerciale de paille de blé (Protobind 1000). Ces différentes expérimentations valident que pour la paille de blé, la teneur en lignine n'a pas d'influence notable sur la digestibilité, pourvu que la fraction cellulosique soit suffisamment accessible. De plus, cela montre qu'il peut bien exister un phénomène d'adsorption non productif d'enzyme sur de la lignine, et que cet effet est modulé par la nature de la lignine.

Enfin, la lignine pourrait limiter le gonflement (c'est-à-dire l'augmentation du volume poreux au cours de l'hydrolyse) de la cellulose et des hémicelluloses, et donc l'accessibilité de ces fractions aux enzymes [155,175].

Récalcitrance et structure et type de lignine

Certains auteurs suggèrent que le type de lignine (proportions des unités, structure macromoléculaire, liaisons inter-unités, etc.) constitue un facteur déterminant dans le caractère réfractaire d'un substrat lignocellulosique. Nakagame *et al.* [176] montrèrent que l'ajout de lignine de résineux (pin de Murray) et dans une moindre mesure de lignine de feuillus (peuplier) lors de l'hydrolyse enzymatique de cellulose Avicel (avec une faible charge enzymatique de 5 et 10 FPU/g) diminuait la digestibilité de ce substrat, contrairement à la lignine de maïs. Dans cette étude, la mesure du taux de protéines dans le surnageant permit de mettre en évidence l'adsorption non spécifique des enzymes sur certaines lignines (de conifère notamment).

Par ailleurs, il est régulièrement suggéré que la récalcitrance à la dégradation imputée à la lignine dépend non seulement des monomères qui la constituent mais aussi des types de liaisons entre les unités telles que des liaisons aryl-aryl, C-C, C=C, ponts diféruliques. La structure de la lignine peut être plutôt branchée (comme dans la lamelle moyenne, riche en liaison C-C), ou plutôt linéaire (lignine riche en liaison aryl-éther comme dans la paroi secondaire), pourrait être également importante. Cependant, les données de la littérature peuvent être contradictoires quant à l'implication de ces paramètres chimiques [177–179]. Cela s'explique par la diversité des biomasses lignocellulosiques, des familles d'enzymes lignolytiques, et par le fait que les champignons (ou bactéries) lignolytiques sont souvent spécifiques à une essence de bois, et spécialisent dès lors leur cortège d'enzymes sécrétées à leur substrat favori. De plus, la récalcitrance de la lignine dépend évidemment des procédés impliqués, par les propriétés physicochimiques qui sont modifiées : pour la lignine par exemple, son affinité avec les enzymes (en termes de force d'adsorption) est plus élevée lorsque une lignine est issue d'un prétraitement alcalin (soude), que lorsque cette même lignine est traitée par traitement oxydatif (traitement Fenton) ou carboxylée, elle-même plus élevée que lorsque la lignine est sulfonée [180].

Plus que la teneur en lignine, c'est donc l'ensemble des caractéristiques physicochimiques de la lignine qui peuvent avoir un impact plus ou moins direct sur la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique. Pour certaines de ces caractéristiques, leur rôle fait consensus, alors que pour d'autres, leur rôle reste débattu. La Figure 24 illustre l'influence de ces différents paramètres sur la récalcitrance de la lignine [181].

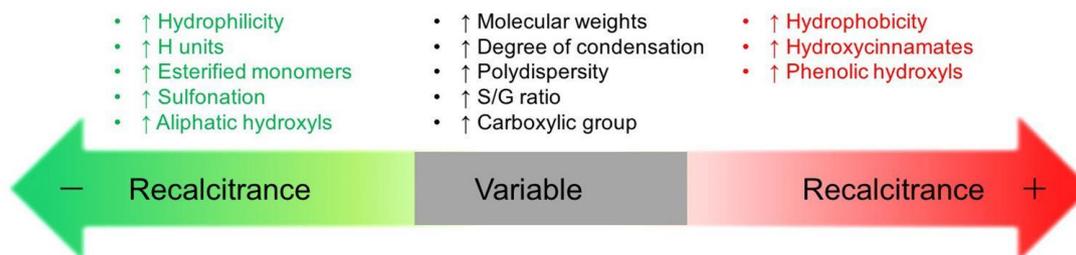


Figure 24 : Représentation schématique du rôle de différentes caractéristiques de la lignine sur la récalcitrance de celle-ci. Adapté de [181]

Interactions lignine – polysaccharides

La **forte interaction entre la lignine et les polysaccharides**, indépendamment du taux de lignine, est grandement dépendante de la nature du substrat. Ces interactions sous forme de liaisons covalentes soit directement avec la lignine, soit *via* l'intermédiaire d'une autre molécule, comme les acides hydroxycinnamiques en particulier l'acide férulique qui est déjà connus pour réaliser des ponts covalents avec la lignine par une liaison ester, chez les herbacées [182].

L'existence de liaisons covalentes avec la lignine est connue pour les hémicelluloses, mais semble également concerner la cellulose [42]. Cela modifie donc d'autant plus les propriétés chimiques de la cellulose (en plus de l'accessibilité physique), et rend le clivage par les enzymes potentiellement plus difficile [183]. Cet effet peut à la fois expliquer l'adsorption non spécifique des enzymes sur les lignines (des résineux notamment, en procédé alcalin), une diminution de l'adsorption sur certaines zones cellulosiques, ou un faible relargage des sucres monomères produits mais toujours fixés à la lignine. Selon une étude de Jin *et al.* [42], en plus de la nature intrinsèquement différente des lignines des résineux, **la proportion de cellulose liée de manière covalente à la lignine est bien plus importante chez les conifères (la moitié de la cellulose), comparativement à la proportion de cellulose liée à la lignine chez les feuillus (un sixième de la cellulose, cas du hêtre)**. La tendance est la même si l'on raisonne sur l'ensemble des polysaccharides. Ce pourrait être à ce titre un descripteur important (plus important que le taux de lignine en l'occurrence), et jusqu'à présent négligé.

Concernant les hémicelluloses, les interactions covalentes avec la lignine étaient déjà connues [42] : l'acide férulique acyle les unités arabinoses des glucurononarabinoxylanes et forme des liaisons éther avec les unités G, qui sont très stables, comparativement aux liaisons . Il constitue ainsi un pontage entre les hémicelluloses et les lignines, pouvant de ce fait réduire l'accessibilité de la cellulose.

Taux d'hémicelluloses

Les hémicelluloses jouent un rôle de barrière physique en limitant l'accessibilité de la cellulose aux cellulases [80,184,185]. Si le type des hémicelluloses n'est *a priori* pas déterminant dans le caractère réfractaire en hydrolyse enzymatique de la biomasse, il est cependant à noter que les hémicelluloses les moins stables (arabinoxylanes par exemple), sont celles qui gêneront le moins puisqu'elles ont toutes les raisons d'être éliminées lors d'un prétraitement, même peu sévère [186]. Toutefois, la teneur en hémicelluloses résiduelles après prétraitement pourra avoir une influence sur la réactivité en hydrolyse enzymatique.

Degré de polymérisation de la cellulose

Le degré de polymérisation de la cellulose est également suspecté d'être un paramètre ayant un rôle dans la réactivité enzymatique d'un substrat. Pour cette raison, l'impact de ce paramètre sur la digestibilité des substrats lignocellulosique fut étudié [33,159]. Il est cependant difficile de conclure quant à son influence spécifique, par le fait qu'un degré de polymérisation différent entre deux substrats implique le plus souvent la variation d'autres propriétés physico-chimiques. Les conclusions des études ne sont donc pas convergentes. Cependant, une étude menée par Ioelovich *et al.* montre la très faible corrélation ($R=0,1$) entre digestibilité et degré de polymérisation, pour une palette diversifiée de substrats cellulosiques (différentes origines, différents procédés d'extraction/production, pour des degrés de

polymérisation de 150 à 1600 [187]. Une autre étude confirme le faible lien entre le degré de polymérisation et digestibilité des substrats lignocellulosique [188], ou tout du moins de la difficulté à établir un lien direct entre la digestibilité en hydrolyse enzymatique et la réduction du degré de polymérisation.

D'autre part, il existe un certain nombre de méthodes (chimique, par mesure du pouvoir réducteur de la cellulose, par viscosimétrie, par chromatographie de perméation sur gel, etc.) pour calculer un degré de polymérisation, et l'obtention d'une valeur par une méthode peut ne pas être des plus informative, notamment par le fait que dans la réalité, la cellulose du substrat présente une distribution en degré de polymérisation qui se résume difficilement à une seule valeur.

L'effet du changement de degré de polymérisation sur la cinétique de saccharification serait peut-être mis en évidence plus aisément par l'utilisation de différents ratios d'enzymes utilisés. On conçoit aisément que, pour un substrat à longues chaînes celluloses, il soit préférable d'avoir une proportion plus importante d'endoglucanases, coupant aléatoirement en surface et libérant des sites pour des exoglucanases, que pour un substrat à très courtes chaînes celluloses.

Par ailleurs, il fut montré qu'au cours de l'hydrolyse enzymatique, le degré de polymérisation diminue rapidement, notamment en début d'hydrolyse, passant de 600 en début d'hydrolyse, à 200 à partir de 10h de saccharification [188], pour des substrats de peuplier et de panic érigé traités à l'acide dilué.

Taux d'acétylation des polysaccharides

Le taux d'acétylation des hémicelluloses et de la cellulose est cité comme ayant un effet négatif sur la digestibilité d'un substrat en hydrolyse enzymatique [76,189].

En effet, le squelette des hémicelluloses dans les parois cellulaires de la biomasse est largement acétylé, avec des quantités de groupements acétyles pouvant atteindre entre 1 et 6 % pds de la biomasse selon les espèces végétales. Ces groupements acétyles jouent un rôle important dans le mécanisme de résistance des parois végétales à l'hydrolyse enzymatique en interférant avec la reconnaissance des enzymes et en constituant une gêne stérique [186]. De plus, une hypothèse propose que lorsqu'un groupement hydroxyle est substitué par un groupement acétyle sur la cellulose, les enzymes de type cellobiohydrolases I (CBH I) ne peuvent plus réaliser une fixation productive par une liaison hydrogène [189].

Une dé-acétylation permet d'augmenter l'aptitude au gonflement et la digestibilité enzymatique d'une biomasse comme par exemple pour le bois de peuplier ou la paille de blé [190]. Il fut montré que l'effet d'inhibition est plus marqué en début d'hydrolyse enzymatique puis s'atténue avec le temps [76]. De plus, cet effet est plus marqué pour une forte charge d'enzymes [76].

Par ailleurs, il est à noter que les hémicelluloses acétylées sont plus stables thermiquement que les hémicelluloses non acétylées [191]. Ainsi, on peut penser que pour un traitement de cuisson acide ou explosion à la vapeur, un substrat présentant initialement des hémicelluloses fortement acétylées présentera un taux d'hémicelluloses résiduelles supérieur à un substrat avec des hémicelluloses peu acétylées, contribuant à la récalcitrance du substrat. D'un autre côté, l'élimination des acétyles contribue au phénomène d'auto-hydrolyse.

ii Moyens de caractérisation

Spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge utilise le phénomène d'absorption du rayonnement infrarouge sur des plages particulières, propres aux liaisons chimiques, et dont l'origine provient des vibrations (ou degrés de liberté) permises par la liaison. De cette manière, l'environnement chimique de la liaison peut donc aussi modifier légèrement le comportement d'absorption de ce rayonnement [192].

Dans le cas de la biomasse lignocellulosique, la spectroscopie infrarouge est très employée [92,95,100,101,105,112,166,167,193–198], par le fait qu'elle rend compte des modifications chimiques des substrats. Cette technique permet de caractériser et distinguer spectralement différentes biomasses natives

et différents tissus d'une même biomasse d'origine. Elle permet également de caractériser l'impact chimique d'un prétraitement sur le substrat et d'étudier les évolutions spectrales au cours de l'hydrolyse enzymatique (voir au paragraphe II.5.f.i l'étude en microscopie IR).

D'après la revue de Lupoi *et al.*, cette technique peut être utilisée non seulement pour déterminer les proportions des macromolécules mais également pour accéder à des informations sur la structure des polysaccharides (interactions, agencement, cristallinité) et de la lignine (proportion de monolignols G, S, H), voire estimer des taux d'extractibles [199].

Le couplage avec une analyse multivariée présente un fort potentiel pour exprimer les différences spectrales d'un lot d'échantillons, déterminer l'abondance de composés chimiques, voire prévoir le comportement en hydrolyse enzymatique. Deux études permirent ainsi une bonne prédiction de la digestibilité de différents substrats [196,200]. Cependant si l'analyse FTIR est quasi systématique dans la littérature, la démarche de faire une analyse multivariée, par composantes principales (ACP) ou une régression des moindres carrés partiels par exemple (PLS), et sur un lot d'échantillons, est beaucoup moins fréquente, en dépit de l'intérêt potentiel que cela présente. En effet, les quelques études qui se sont intéressées à la régression par PLS par exemple, pour prédire les différentes compositions en macromolécules (cellulose, hémicellulose, lignine) ou même les rendements en glucose en hydrolyse enzymatique, montrent des résultats très convaincants [196,200–205]. Dans le cas de l'étude de Jin *et al.* par exemple, la calibration du taux les coefficients de régression en calibration tournent autour de 0,95 pour la calibration, et 0,94 pour la validation. Une autre étude de Chazal *et al.* sur l'analyse de plusieurs parois cellulaires de maïs permet de réaliser de bonnes prédictions concernant la teneur en lignine des échantillons, mais aussi sur l'abondance des monomères S ou G de la lignine, et du nombre d'acides p-coumariques liés par des liaisons esters [206]. Ces modèles sont cependant souvent dépendants du substrat initial considéré. De manière plus anecdotique, des calibrations entre composition aires d'une ou plusieurs bandes normalisées et spécifiques à chacun des composés, sont également possibles [207].

Spectroscopie X par émission de photoélectrons

La XPS (X-ray photoelectron spectroscopy, ou ESCA) est parfois utilisée sur la biomasse lignocellulosique en tant qu'analyse élémentaire et d'environnement chimique d'extrême surface [194].

Cette technique spectroscopique est utilisée dans le contexte de l'analyse de la biomasse lignocellulosique, à lister les éléments présents ainsi que leur abondance relative, et de déterminer les types de liaisons carbonées présentes en extrême surface de l'échantillon. Parmi les différents éléments en abondance forte (C, H, O, N), le carbone est l'élément qui présente le plus grand déplacement chimique [125,194,208]. On distingue en l'occurrence les liaisons C1 (C-C/C-H/C=C), C2 (C-O), C3 (C=O), et C4 (O-C=O).

Johansson *et al.* décomposèrent le spectre C1s pour obtenir la proportion des différents types de liaisons carbonées et considèrent les spectres O1s et C1s dans leur ensemble pour évaluer le rapport atomique O/C. Les auteurs calculèrent ainsi le rapport atomique O/C (obtenu sur le spectre faible résolution) et la proportion de liaison de type C-C aliphatique déterminée sur le spectre en haute résolution du carbone C 1s. Ils révélèrent ainsi qu'il existait une bonne corrélation entre le rapport O/C et la proportion de liaisons C-C (Figure 25). Grâce à la composition théorique de la lignine et de la cellulose, ils purent placer, sur ce même graphe, les points correspondants à de la lignine pure et à de la cellulose pur, ce qui permet par la suite de déterminer quantitativement le caractère plutôt cellulosique ou ligneux de l'extrême surface d'un substrat lignocellulosique [209].

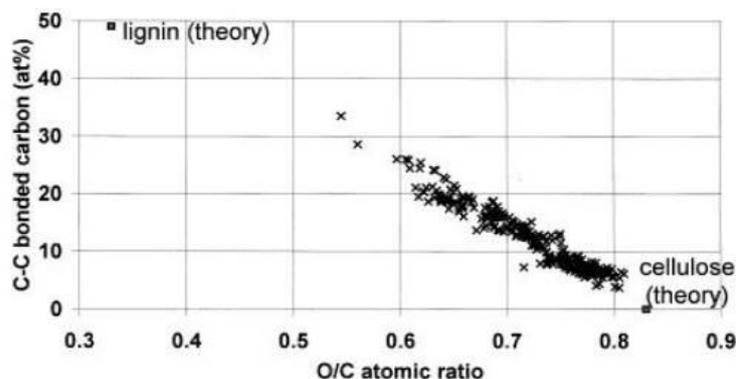


Figure 25 : Corrélation du rapport atomique O/C avec la teneur atomique en carbone aliphatique pour des extraits de pulpe de bois [209]

Notons que la composante du carbone relative aux liaisons C-C et celle du carbone relative aux liaisons C=C se superposent. Il n'est donc pas possible de les différencier l'une de l'autre.

Le ratio O/C est donc fréquemment utilisé pour estimer si un composé est majoritairement cellulosique ou plutôt lignifié en sa surface [210,211].

Kumar *et al.* [92] calculèrent ainsi le ratio O/C pour suivre l'évolution de la proportion relative des différents types de liaisons carbonées sur des échantillons de peuplier et de maïs ayant subi différents prétraitements. Ils observèrent ainsi clairement une augmentation du rapport O/C ainsi qu'une diminution de la proportion de liaison de type C-C, C=C pour tous les échantillons, ce qui est représentatif d'une augmentation de la proportion de cellulose analysée. Les prétraitements ont donc eu pour effet de rendre plus accessible la cellulose, certainement par attaque de la lignine de surface. Cette même tendance fut également observée par Yu *et al.* [212].

Analyses thermiques : ATG et DSC

L'analyse thermogravimétrique consiste à mesurer très précisément les variations de masse d'un échantillon pendant qu'il subit une élévation de température. La variation de la masse en fonction de la température donne une signature de la décomposition thermique du matériau qui est spécifique des espèces chimiques présentes, de leur abondance et des interactions entre elles. Une étude [213] montre par exemple la facilité de discriminer des essences natives *via* cette simple technique. Une autre étude de Chen, Tu *et al.* [110] montre par exemple l'impact de la température de prétraitement (cuisson acide) sur la courbe thermogravimétrique du substrat (élimination de l'hémicellulose vers 306 °C). La même équipe montre plus tardivement en ATG que l'effet de la concentration en acide (prétraitement de cuisson acide) sur le substrat de bagasse de canne à sucre [112], ce qui met en évidence l'élimination des hémicelluloses, puis la dégradation de la cellulose et de la lignine. Ces deux études permettent de conclure que les effets chimiques respectifs de la température et de la concentration en acide sont spécifiques : l'augmentation de température hydrolyse les hémicelluloses puis la cellulose et la lignine, alors que l'augmentation de la concentration en acide augmente l'hydrolyse des hémicelluloses mais a moins d'impact sur les autres macromolécules. En somme, la TGA et la DSC fournissent une signature physicochimique de l'échantillon analysé, représentative des composés chimiques présents, de leurs structures et interactions. Cependant, les informations obtenues restent essentiellement qualitatives.

e. Gouttes de lignine et pseudo-lignine/humines solides

Comme évoqué au paragraphe II.4.a.ii, le prétraitement de la biomasse par cuisson acide ou explosion vapeur peut induire la formation de gouttes de lignine au niveau de la surface et entre les parois cellulaires. Il existe au moins deux différents types de gouttes de lignine, sur la base d'observations morphologiques, de taille, de répartition spatiale, et même spectrales [103,105,108,109].

Par les différents phénomènes ayant lieu au niveau de la lignine (fonte et extraction partielle, déposition ou concentration), l'effet des modifications apportées à la répartition spatiale de la lignine sur la réactivité des substrats en hydrolyse enzymatique est difficile à évaluer, et mène à des conclusions parfois opposées. Pour certains auteurs, la présence de gouttes en surface empêche l'action processive des enzymes [103], ou empêche les enzymes d'accéder à la cellulose. Cette action négative de la lignine proviendrait de la répartition des gouttes à des localisations clés du substrat : dans les parois cellulaires ou sur des ponctuations, des coins, des zones de délamination du solide, la lignine pouvant demeurer par ailleurs présente au sein de la matrice comme initialement dans le substrat natif [105]. Pour d'autres auteurs, la lignine à l'état de goutte permet une forme compacte qui ne recouvre la fraction cellulosique que de manière très ponctuelle [109,214]. La création dans les parois de zones très localisées où la lignine est très dense peut alors jouer un rôle majoritaire dans l'amélioration de l'accessibilité de la fraction cellulosique aux enzymes [105]. Une autre étude de Li *et al.* se pencha sur l'effet de la présence des gouttes de lignines obtenues par traitement hydrothermal sur de la cellulose Avicel et du peuplier servant de source de lignine. L'Avicel imprégnée de lignine solubilisée puis recondensée en gouttes fut testée en hydrolyse enzymatique et sa digestibilité se révéla être amoindrie, du fait d'un écrantage de la surface cellulosique aux cellulases [106] par les gouttelettes de lignine. Cependant, une étude plus récente conclut que la perte de réactivité liée à la présence de lignine issue de prétraitement hydrothermal à forte sévérité (195 °C pendant 15 min) était principalement induite par blocage physique, plutôt que par adsorption non spécifique et non productive des cellulases sur ce composé [215]. Pour arriver à cette conclusion, des substrats lignocellulosiques (canne de maïs, miscanthus et paille de blé) furent mélangés pendant l'hydrolyse enzymatique à un substrat riche en lignine et potentiellement de pseudo-lignine (le substrat provient de l'hydrolyse totale de la cellulose d'un échantillon traité par traitement hydrothermal). Dans une telle configuration, aucune perte de réactivité ne fut observée [215].

A plus forte sévérité, d'autres morphologies grossièrement sphériques apparaissent en surface de la matrice. La présence de ces composés fait moins débat quant à leur effet néfaste sur la réactivité des substrats car ils sont obtenus dans des conditions opératoires trop sévères pour une digestibilité enzymatique de la cellulose optimisée. L'abondance de ce composé de pseudo-lignine, fut mise en lien avec la perte d'enzymes libres dans le milieu, comme le montre la Figure 26 où l'on voit que l'augmentation de la proportion en pseudo-lignine se traduit par une baisse notable de l'abondance d'enzyme libre dans le milieu, qui se sont probablement adsorbé sur la surface de la pseudo-lignine. Ceci amène à penser que ces composés sont propices à une adsorption non productive des enzymes cellulolytiques sur la matrice [100,216].

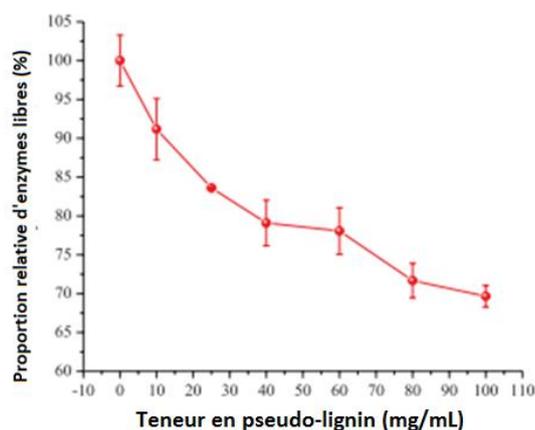


Figure 26 : Evolution de la proportion relative de protéines libres dans le milieu réactionnel en fonction de l'abondance en pseudo-lignine, adapté de [100]

f. Caractérisation morphologique et chimique combinée

i Microspectroscopie IR

La microscopie IR et la microspectroscopie IR permettent à la fois d'obtenir une information morphologique et spectrale, par l'acquisition d'une image pour chaque longueur d'onde d'absorption. Il est également possible de procéder à l'acquisition d'un spectre en tout point (pixel) du champ de vue, ce qui donne ainsi une image hyperspectrale. Après traitement des données par décomposition de bandes spécifiques, on peut également obtenir des cartographies pour les trois familles de macromolécules lignocellulosiques avec un contraste d'intensité. Il est également possible, sous réserve de réaliser des acquisitions focalisées à différents pas de profondeur, de réaliser une reconstruction 3D hyperspectrale de l'échantillon surtout pour les tissus poreux, peu denses, comme dans le domaine médical [217].

Un certain nombre d'études portant sur la caractérisation de la biomasse utilisèrent cette technique de microscopie IR [54,56,109,218,219], dont la réalisation est intéressante pour visualiser la position de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses, suivant la longueur d'onde d'émission utilisée, en calculant une image par intégration du signal aux bandes spécifiques des trois macromolécules. Cependant, de par la relative grandeur des longueurs d'onde utilisées (pour le moyen IR, de 25 à 2,5 μm), la résolution maximale théorique est relativement faible ($\sim 10 \mu\text{m}$) et la distinction des distributions des composés suivant leur position dans la/les parois cellulaires est relativement difficile. Cette technique peut être néanmoins utile pour visualiser les contrastes de composition à l'échelle des tissus par exemple. Cet outil a un fort potentiel lorsqu'il est couplé à l'analyse multivariée (ACP, PLS, MCR-ALS...) ou multiblock, comme le montrent plusieurs études [54,109,218].

Gierlinger *et al.* purent par cette technique montrer les différences de dégradation enzymatique d'un bois de peuplier et les évolutions compositionnelles aux cours de l'hydrolyse [56], suivant qu'il s'agisse de bois de tension (assez digeste à l'état natif), ou de bois normal (quasi indigeste à l'état natif). La Figure 27 montre le bois normal qui ne s'est pas dégradé en fin d'hydrolyse, comparativement au bois de tension présentant une couche additionnelle G très digeste.

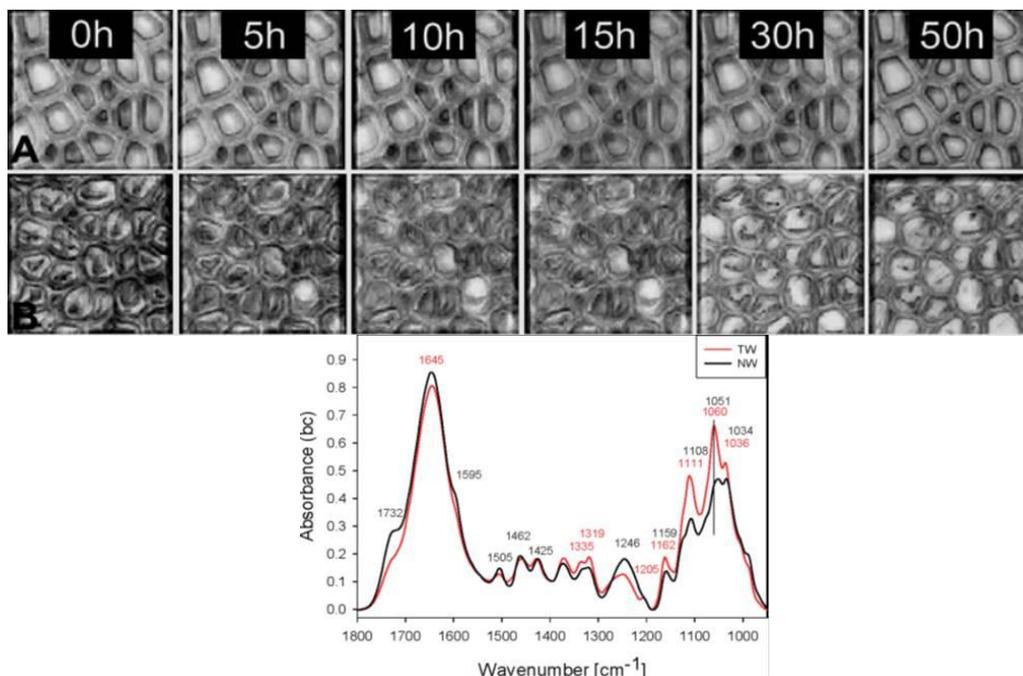


Figure 27 : Evolution morphologique et spectrale du bois normal (A, et NW sur le spectre) et du bois de tension (B, et TW sur le spectre) pendant la dégradation enzymatique

Spectralement, on observe :

- Le bois de tension a une forte évolution spectrale et donc compositionnelle au cours de l'hydrolyse enzymatique, signe de digestion. Plus précisément, on voit la disparition progressive du massif des sucres (1200-1000 cm^{-1}), et des bandes de la cellulose et des hémicelluloses (1247 cm^{-1})
- Le bois de tension présente une moindre acétylation des hémicelluloses contribuant à son caractère digeste (1732 cm^{-1})

La **microscopie infra-rouge** peut aussi être réalisée en utilisant le rayonnement synchrotron [220,221]. Elle combine une résolution spatiale correcte (5 μm) qui permet un détail suffisant pour décrire la structure alvéolaire, avec une spectroscopie chimique. Elle est par exemple accessible sur la ligne SMIS de SOLEIL et fit déjà ses preuves pour imager la distribution et la structure secondaire d'une enzyme dans un solide macroporeux polymérique [220].

ii Microspectroscopie Raman

Lorsque la lumière arrive au niveau d'une matrice solide, elle peut être diffusée par le matériau dépendamment des liaisons présentes (plus précisément dépendamment des vibrations de ces liaisons). Cette technique exploite cette interaction rayonnement/matière de manière résolue spatialement et spectralement grâce à un faisceau de lumière monochromatique dans le domaine du visible. La microscopie confocale Raman par exemple permet une légère amélioration de la résolution spatiale par l'utilisation d'une longueur d'onde plus courte (autour de 10 μm de résolution en microscopie IR, alors qu'en Raman on peut descendre à une résolution inférieure à 0,5 μm). Dans le cadre de l'étude de la biomasse lignocellulosique, cette technique peut être utilisée pour visualiser la localisation des polysaccharides et de la lignine dans les parois cellulaires. Après décomposition du signal, il est possible d'obtenir des cartographies de la répartition des macromolécules présentes (lignine et polysaccharides). Comme développé dans la revue de Lupoi *et al.* [199], la spectroscopie et microspectroscopie Raman permet d'accéder à certaines informations: abondance des polysaccharides et de la lignine, cristallinité de la cellulose, structure des polysaccharides et même proportion des unités H, G, S de la lignine (lorsque couplé à l'analyse UV).

Plusieurs études sont consacrées à cette technique dans le contexte de la caractérisation de la biomasse lignocellulosique en lien avec sa réactivité en hydrolyse enzymatique [108,130,218,222–225].

Zeng *et al.* [108] montrèrent pour leur part, l'effet du prétraitement par cuisson acide (maléique, à différentes concentrations) sur l'élimination, l'altération et la délocalisation de la lignine dans les parois de la cellule.

Enfin, Lupoi *et al.* [224] les modifications de la répartition de la cellulose et de la lignine avec l'augmentation du temps de séjour en prétraitement de liquides ioniques, ceci dépendamment du tissu considéré (sclérenchyme ou trachéide).

En conclusion, la microscopie Raman et ses variantes présente l'intérêt de pouvoir réaliser des cartographies chimiques avec une bonne résolution spatiale, pour investiguer les modifications morphologiques et physicochimiques au cours du prétraitement, ou de l'hydrolyse enzymatique par exemple.

iii Imageries de fluorescence

Macroscopie à autofluorescence

Il s'agit d'un outil de visualisation à l'échelle macroscopique (classiquement de 5 μm à 5 mm) permettant l'obtention de l'information spectrale en fluorescence, résolue spatialement. Ces appareils utilisent des filtres permettant d'exciter le substrat dans un petit nombre plages de longueurs d'ondes différentes. Par exemple, l'PAZ100 de Nikon permet d'utiliser 4 filtres. L'appareil disponible à l'INRA de Nantes-Angers est équipé des filtres UV-340 nm, UV-370 nm, le bleu-480 nm, et le vert-543 nm. Les

macroscopes sont généralement équipés de caméra couleur : dans ce cas, les trois canaux classiques (rouge, vert et bleu) sont récupérés pour chaque image de fluorescence. L'acquisition est directe et ne requiert pas de préparation particulière pour les substrats ne présentant pas une trop forte amplitude d'épaisseur de particule ($<300 \mu\text{m}$).

Si cette technique semble bien discriminer les substrats et tissus par exemple, l'interprétation chimique semble plus délicate. Les composés les plus susceptibles d'être visualisés sont les acides phénoliques (acides hydroxycinnamiques, AHC, et notamment l'acide férulique), qui présentent une forte fluorescence bleue et sont présents sur les hémicelluloses et la lignine [226]. Cela permet d'expliquer pourquoi il existe une grande fluorescence provenant du parenchyme de moelle, alors que celui-ci est peu lignifié.

Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence peut également être utilisée pour accéder à une meilleure résolution. Une étude utilisant la microscopie à fluorescence permet de visualiser la matrice lignocellulosique au cours de la dégradation enzymatique, en visualisant à la fois la lignine par autofluorescence, la cellulose par marquage spécifique (rouge Congo) et les enzymes marquées [55]. Plusieurs préparations furent observées, notamment des sections transversales de bois et des particules broyées. Les auteurs quantifièrent également la perte d'activité des enzymes entre avant et après marquage, qui s'avère être raisonnable, surtout à température ambiante, c.à.d. à $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (comparativement à $50 \text{ }^\circ\text{C}$), conversion de $8,7 \text{ mg/L}$ (respectivement de $125,9 \text{ mg/L}$) pour les enzymes non marqués, à $8,3$ (respectivement $88,6 \text{ mg/L}$) pour les enzymes marquées. Cette étude permet de mettre en évidence la présence d'une grande diversité de particules en termes de composition (tissus de diverses origines), d'affinité enzymatique, de morphologie, de digestibilité... De plus, cette étude permet d'observer l'adsorption non productive des cellulases sur un morceau de lignine extraite.

Microscopie à fluorescence par excitation bi-photonique

Un certain nombre de variantes de microscopie à fluorescence existent, notamment par changement du type d'excitation (mono, bi, multi-photonique). Une étude s'intéressa aux propriétés d'autofluorescence de miscanthus, peuplier et paille de blé, natifs ou traités à deux conditions opératoires différentes de prétraitement d'explosion vapeur [227]. Elle montra qualitativement la diminution de la fluorescence occasionnée par le prétraitement. Par ailleurs, en s'aidant d'analyses spectrofluorométriques, les auteurs purent mettre en relation l'intensité maximale de fluorescence des substrats (issue du maximum de la cartographie 3D-excitation-émission) avec la réactivité du substrat (Figure 28). Ils conclurent également que la réactivité enzymatique ne limite pas au taux de lignine, mais que cette dernière était directement en lien avec la structure de la lignine, en l'occurrence l'abondance de liaisons β -aryle-éther chez le peuplier, dont la dégradation a lieu durant le prétraitement (dépolymérisation/recondensation). Ils remarquèrent enfin que la lignine recondensée devenait un polymère avec une forte densité électronique, malgré la perte de liaisons β -aryle-éther, mettant ainsi en évidence l'existence de liaisons non encore déterminées.

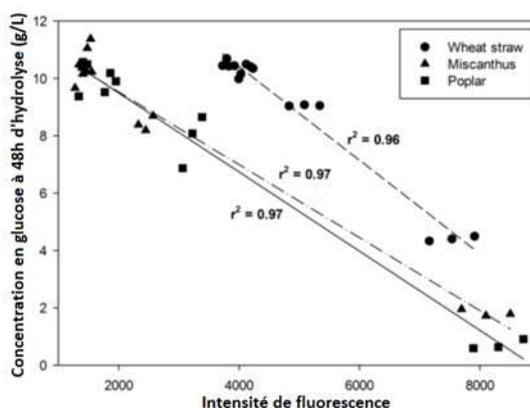


Figure 28 : Concentration en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique à 48h en fonction de l'intensité de fluorescence, pour les substrats de paille de blé, miscanthus et peuplier, traités par explosion vapeur. Adapté de [227]

Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser permet d'obtenir des images optiques à une très faible profondeur de champ (environ 400 nm), ce qui élimine le flou occasionné par les particules hors du champ, contrairement aux microscopies optiques plus classiques. Cela permet par ailleurs de se rapprocher de la limite maximale théorique de résolution, limitée par la longueur d'onde de la particule sonde (ici le photon). Le champ de vue est balayé par un laser et, en sortie du système optique, le signal est récupéré et l'image est reconstituée pixel par pixel *via* un ordinateur. Le plus souvent, le phénomène de fluorescence est exploité, soit par autofluorescence de l'échantillon analysé (Figure 29A), soit par marquage de celui-ci (Figure 29B) comme dans le cas de la macro/microscopie à fluorescence.

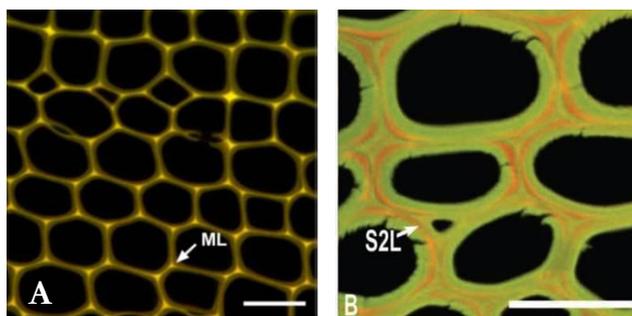


Figure 29 : A. Image en autofluorescence, de pin de Monterey non traité, en coupe transversale (signal de la lignine principalement) ; B. pin de Monterey, marqué à la safranine. La lignine apparaît en rouge, la cellulose en vert. Barre d'échelle de 40 μm . Adapté de [228]

Du fait de ses caractéristiques singulières, un certain nombre d'études portèrent sur l'observation de tissus lignocellulosiques par microscopie confocale dans un but de d'étudier la distribution des macromolécules, mais également afin de comprendre leur comportement à la dégradation enzymatique [55,109,131,228–235]. Cette technique permet de visualiser les parois cellulaires par la présence de lignine fluorescente. Par conséquent, elle permet également d'observer la coalescence de lignine sous forme de gouttes [109]. L'utilisation de marqueurs fluorescents (fluorophores) permet d'imager de manière distincte la cellulose, la lignine, mais également les enzymes liées à la cellulose [55]. La principale difficulté réside dans le choix des marqueurs qui doivent être aussi spécifiques que possible, sans modifier les propriétés chimiques du composé à visualiser. Un certain nombre de marqueurs sont couramment utilisés, comme le calcofluor [236] ou l'acriflavine [232] pour visualiser la cellulose et la lignine. A 488 nm, la safranine est une molécule qui permet de marquer à la fois la cellulose (en vert) et la lignine (en rouge) et fut utilisée dans un certain nombre d'études [228,232].

Grâce au marquage à la safranine, Bond *et al.*, montrèrent que la lignine est préférentiellement située dans la lamelle moyenne et la paroi primaire, dans le cas du pin de Monterey, du pin Douglas, et du peuplier deltoïde par exemple [228]. San'Anna mirent en pratique le marquage à la safranine pour localiser en microscopie confocale les différents composants de la biomasse [131,232]. Ils mettent ainsi en évidence une modification structurale des tissus de canne à sucre avant et après traitement thermochimique (Figure 30).

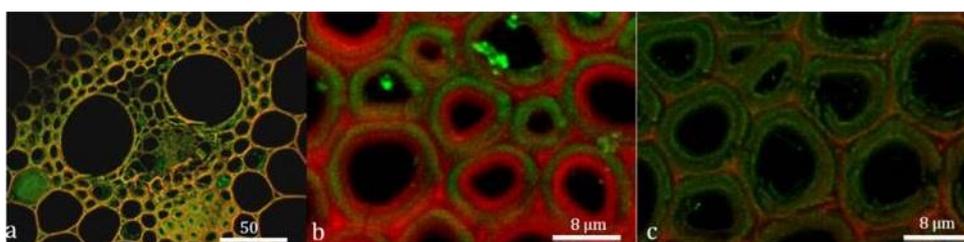


Figure 30 : Images de microscopie confocale de la cellulose (signal vert) et de la lignine (signal rouge) dans des tissus de canne à sucre marqués à la safranine a. échantillon non traité ; b. échantillon non traité – fort grandissement ; c. échantillon traité – fort grandissement [131]

L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser permet de mettre directement en évidence l'adsorption non productive des cellulases sur d'une certaine lignine, par marquage de ces enzymes [55]. Cette même étude réalisa aussi pour la première fois la co-localisation de la lignine (par autofluorescence), de la cellulose (par marquage), et des enzymes cellulolytiques (par marquage), pendant une hydrolyse enzymatique, ce qui permit de discriminer les tissus ayant les plus fortes affinités avec les enzymes (par la présence de cellulose ou de lignine), et ceux ayant les plus fortes appétences à être digérée (tissus cellulosiques non lignifiés).

Enfin, cette technique fut également mise en œuvre pour montrer d'une part l'affinité mais également l'effet de différentes technologies de prétraitement (hydrothermal, et retrait des composés cireux par traitement au chloroforme) sur l'affinité enzymatique de chaque tissu [24]. Pour finir, cette étude montra *via* la microscopie confocale, l'évolution de l'affinité enzymatique (endo- et exo-glucanases testées) indépendamment de la lignine extraite de leur substrat.

iv Microscopie par imagerie de temps de fluorescence (FLIM)

La microscopie par imagerie de temps de fluorescence exploite une propriété du phénomène de fluorescence, à savoir la persistance temporelle de la fluorescence dont la décroissance au cours du temps et le temps de vie sont propres aux matériaux considérés et font office de signature du matériau. Cette technique permet d'apporter divers types d'information sur les substrats. Par exemple, Coletta *et al.* montrèrent qu'elle pouvait fournir la cartographie précise de la lignine dans les parois cellulaires et l'évolution des substrats (la partie ligneuse) en fonction de plusieurs conditions de prétraitement (alcalin ou acide, différentes concentrations) [237]. Elle peut également discriminer le bois de compression du bois normal à partir de la décroissance temporelle de la fluorescence [230]. Enfin, elle peut aussi distinguer deux lignines des parois cellulaires dont le comportement en cuisson acide est différent. La première, appelée lignine "dense", est présente dans la lamelle mitoyenne et est extraite de la matrice puis recondensée en gouttes. La deuxième, moins dense et plus lâche, est présente dans la paroi secondaire en moins grande concentration et se retrouve solubilisée avec les hémicelluloses (Figure 31). Selon l'étude, l'élimination de cette dernière est responsable de l'amélioration de la digestibilité, et non l'extraction de la lignine "dense", qui caractérise plutôt une trop forte sévérité de prétraitement. On peut alors supposer que la lignine non soluble provient principalement (voire exclusivement) de cette lignine "dense" et que la lignine soluble provient de la lignine faiblement regroupée [108].

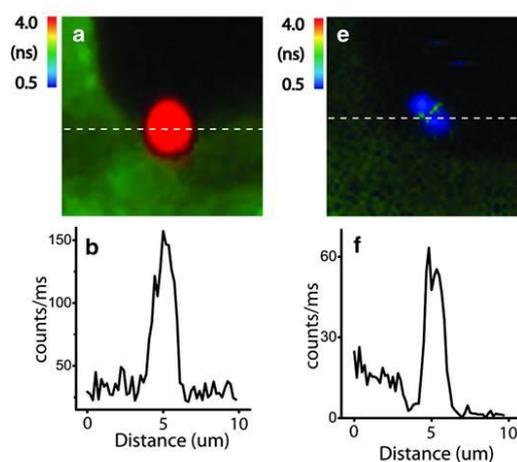


Figure 31 : a. et e., deux gouttes de lignines discriminées par des temps de vie de fluorescence différents ; b. et f., profils spatiaux d'intensité des gouttes observées ; adapté de [108]

Une étude plus récente [227] utilisa cette technique sur trois substrats lignocellulosiques (miscanthus, peuplier et paille de blé fournis par Procethol 2G), chacun prétraité à trois sévérités différentes (explosion vapeur, facteur de sévérité de 2, 2,8, et état natif). Elle permit de mettre en évidence l'influence claire de la nature du substrat et de la sévérité du prétraitement sur le temps de fluorescence, à savoir d'une part que l'augmentation de sévérité du prétraitement diminue le temps de vie de fluorescence, et d'autre part que le miscanthus possède un temps de fluorescence différent de celui mesuré pour le peuplier et la paille de blé.

L'imagerie par autofluorescence UV haute résolution semble intéressante pour le suivi *in situ* de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique car elle permet à la fois la visualisation de la dégradation du substrat, et la localisation des enzymes [238] avec une résolution spatiale élevée de 283 nm, sans préparation particulière (marquages notamment), réduisant de fait l'apparition d'artefacts (baisse d'activité des enzymes, modification du substrat etc.). Deux modes d'utilisation sont possibles : le mode multispectral (plein champ), et le mode hyperspectral (balayage point par point). Dans la configuration hyperspectrale, le faisceau d'excitation balaye point par point le champ de vue, jusqu'à compléter la totalité du champ de vue. Ainsi, pour chaque point balayé, un spectre est enregistré. Et inversement, il est possible d'imager spatialement la réponse en fluorescence à une longueur d'onde en particulier. Dans le cas de la configuration multispectrale, l'excitation est toujours monochromatique et fixée suivant le besoin ; la réponse en fluorescence est récupérée par un certain nombre de filtres choisis. Dans notre cas, cela permet d'imager respectivement en plein champ la fluorescence des parois, celle des enzymes, ou encore d'autres molécules présentant des fluorophores. Cette technique est par exemple accessible sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL, et fut utilisée par l'équipe de l'INRA de Nantes-Angers pour visualiser la dégradation de tiges de maïs en coupe transversale, afin de lier la dégradation et modifications spectrales au cours de la dégradation avec, dépendamment des tissus observés [239].

v Conclusion sur les couplages

Un grand nombre d'outils analytiques permettent d'obtenir des cartographies chimiques d'intérêt. Les intérêts principaux de l'imagerie spectrale résident dans la prise en compte et la description de l'hétérogénéité compositionnelle à l'échelle tissulaire et cellulaire. Elle permet également d'imager des phénomènes spécifiques, comme l'adsorption d'enzyme sur des fractions celluloseuses ou ligneuses. Au cours de la dernière décennie, la microscopie confocale à fluorescence et balayage laser est particulièrement utilisée, de même que la microscopie Raman

g. Conclusion sur les paramètres physico-chimiques et leur caractérisation

Les effets des paramètres structuraux d'une biomasse sur sa réactivité enzymatique ne sont pas indépendants mais, au contraire, intimement liés les uns aux autres. Certains travaux tentèrent d'étudier séparément quelques-uns de ces paramètres. Chang *et al.* préparèrent par exemple des substrats qualifiés de "modèles" en soumettant du bois de peuplier à différents prétraitements (délignification par de l'acide peracétique, déacétylation par de la potasse et diminution de la cristallinité de la cellulose par broyage à boulets) afin d'étudier de manière découplée trois paramètres structuraux : teneur en lignine, teneur en groupements acétyl et cristallinité de la cellulose. Dans cette étude, la teneur en lignine et la cristallinité ont le plus grand impact sur la digestibilité enzymatique des substrats, tandis que la teneur en groupements acétyles semble avoir moins d'effet [190]. On retiendra toutefois qu'il est difficile de modifier une caractéristique d'un substrat en conservant les autres paramètres constants d'autant plus que les effets de la composition chimique et des structures physiques sur la digestibilité enzymatique de la cellulose dépendent grandement du procédé de prétraitement. L'alternative consistera peut-être en la prise en compte mathématique des interactions entre ces propriétés, sans chercher à les séparer par différents traitements ou préparations d'échantillon, le risque étant alors d'oublier certains paramètres clés dans la description du système à étudier.

Le Tableau 5 ci-dessous résume les différents paramètres pouvant avoir une influence sur la réactivité des substrats.

Tableau 5. Paramètres pouvant influencer la réactivité des substrats

Effet positif	Effet non certain	Effet négatif
Surface accessible, volume poreux	Taille de particule, morphologie	Taux de lignine, et de pseudo-lignine
Diamètre des pores	Cristallinité de la cellulose	Structure de la lignine
Accessibilité des terminaisons de cellulose	Degré de polymérisation	Taux d'hémicelluloses
		Groupements branchés aux hémicelluloses et lignine
		Interactions faibles, et liaisons covalentes entre lignine et les polysaccharides

De plus, même si ce point n'est pas toujours évoqué dans la littérature, la préparation d'échantillons reste un point critique pour obtenir des données fiables, représentatives de l'échantillon prétraité, mais aussi pour mettre en œuvre les techniques de caractérisation. En effet, les substrats prétraités peuvent être très hétérogènes, tant en termes de composition chimique qu'au niveau de leurs propriétés physiques (état de porosité, morphologie et taille des particules), et structurale (intégrité de tissus, cellules, parois). Certaines techniques, plus particulièrement les techniques de microscopie, ne permettent pas d'analyser une grande étendue de chaque échantillon. Ainsi il faudra s'interroger sur la représentativité des prélèvements analysés.

Par ailleurs, certaines techniques telles que la microscopie électronique, la spectroscopie XPS ou la physisorption d'azote nécessitent de travailler sur échantillons secs et peuvent être très sensibles à la préparation et au séchage de l'échantillon. Nous avons vu que le séchage pouvait significativement impacter la structure de l'échantillon. Il faudra donc veiller à optimiser au mieux cette étape de séchage, ou idéalement opter pour des techniques permettant la caractérisation de substrats humides.

Ensuite, de par l'organisation multiéchelle des biomasses lignocellulosiques, il convient de mettre en œuvre plusieurs techniques analytiques pour avoir une description détaillée et cohérente de ce type de substrat. De plus, les caractérisations seront réalisées en vue de comprendre l'influence du prétraitement sur les paramètres physico-chimiques de la biomasse prétraitée, mais surtout de comprendre l'influence de ces paramètres sur la réactivité en hydrolyse enzymatique. Ainsi il convient de choisir judicieusement les techniques analytiques adaptées pour la caractérisation des paramètres supposés être clés dans cette réactivité, tels que la cristallinité, la surface accessible, la présence de lignine, etc...

De nombreuses techniques analytiques furent mises en œuvre ces dernières années dans la littérature pour caractériser des biomasses lignocellulosiques d'un point de vue chimique avec l'utilisation de spectroscopies ou d'un point de vue morphologique et structurale avec l'utilisation de techniques microscopiques. Elles présentent aussi l'avantage de permettre des analyses *in situ* au cours de l'hydrolyse enzymatique et ainsi approfondir la compréhension des mécanismes de dégradation des substrats.

Les Tableau 6, Tableau 7 et Tableau 8 ci-dessous résument les principales techniques analytiques avec leurs paramètres clefs, l'échelle d'observation ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 6. Principales techniques analytiques avec les paramètres accessibles, l'échelle d'observation ainsi que leurs avantages et inconvénients pour la caractérisation morphologique et texturale

Techniques	Paramètres sondés	Echelle d'information - Résolution	Point fort	Point faible
Physisorption de gaz	Accessibilité de la biomasse (surface BET, forme des pores, distribution en taille de pores)	1,5 à 50 nm	Information texturale à sec	Peu représentatif de la vraie structure poreuse en milieu humide, possible limite de sensibilité dans le cas natif
Cryoporométrie RMN bas champ/ Relaxométrie	Réseau poreux	Du nm à la dizaine de μm au mieux. 1 – 100 nm en pratique avec de l'eau	Analyse de substrats humides	Technique encore peu développée sur ce type de matériaux
MEB	Suivi de l'évolution morphologique, de l'état de surface	50 nm	Possibilité de suivi <i>ex situ</i> de l'évolution d'un substrat en hydrolyse enzymatique, sur zone repérées, en section polie et en observation directe	Choix des zones d'observation – représentativité de l'échantillon
Microscopie confocale à balayage laser	Morphologie des fibres, des tissus.	100 nm	Suivi in situ de la dégradation des tissus envisageable. Distinction de la cellulose et de la lignine potentielle si marquage	Préparation d'échantillon délicate et à optimiser sur coupe, jamais réalisée sur poudre
BlueBox (prototype macrovision INRA)	Morphologie, taille macroscopique des particules/fibres	3,6 μm -cm	Bonne représentativité	Pas de recul sur ces substrats, traitement d'image nécessaire pour une quantification
Réacteur enzymatique	Suivi de morphologie macroscopique, de taille de particules immergée de manière dynamique, et pendant l'hydrolyse enzymatique	4,5 μm -cm	Démonstration de principe déjà existante (INRA)	Jamais corrélé sur nos substrats, traitement d'image nécessaire
MEB	Morphologie et structure des parois cellulaires	~ 1 nm	Marquage possible au KMnO_4 de la lignine, haute résolution	Préparation d'échantillon, sensibilité de la matière au rayonnement
Mesures WRV, et mesure de gonflement	Capacité de rétention d'eau, et capacité au gonflement macroscopique	Multi-échelle (de la centaine de μm à quelques nm <i>a priori</i>)	Simplicité de l'expérience	Reproductibilité médiocre, phénomène à corrélérer avec une multitude de paramètres physico-chimiques
Exclusion de soluté	Microporosité	10-100 nm	Possibilité de travailler en substrat humide	Calibration, versatilité, lenteur des analyses...

Tableau 7. Principales techniques analytiques avec les paramètres accessibles, l'échelle d'observation ainsi que leurs avantages et inconvénients pour la caractérisation chimique

Techniques	Paramètres sondés	Echelle d'information - Résolution	Point fort	Point faible
Spectroscopie FTIR	Liaisons, composés, et structures chimiques	Moléculaire	Facilité de mise en œuvre, temps d'acquisition	Traitement de donnée, distinctions fines des effets de prétraitements difficiles
XPS	Eléments, liaisons et environnement chimique, du carbone notamment	Elémentaire et proximité atomique ($\sim \text{Å}$)	Montre l'exposition chimique surfacique, potentiellement vue par les enzymes	Pas de résolution spatiale, sensibilité d'appareil
DRX	Cristallinité de la biomasse, phases cristallines de la cellulose, diamètres des fibrilles identification d'éventuels composés cristallins (silice en particulier)	Réseau cristallin ($\sim \text{nm}$)	Potentielle facilité d'analyses de substrats humide	Evaluation de la cristallinité plus aisée sur cellulose pure. Plus délicate sur les biomasses lignocellulosiques du fait de la plus grande proportion de phase amorphe.
RMN haut champ	Eléments et leur environnement chimique, molécules, cristallinité de la cellulose	Atomique et moléculaire ($\sim \text{nm}$)	Bonne discrimination des différents carbones, suivi <i>ex situ</i> (voire <i>in situ</i>) de l'hydrolyse pertinent	Sensibilité de la technique faible, temps d'analyse
Spectrofluoromètre	Composés chimiques	Moléculaire ($\sim \text{nm}$)	Plus précis que la macrofluorescence mais information globale	Bandes de fluorescence large, attribution délicate, phénomène de non linéarité (<i>quenching</i>)

Tableau 8. Microspectroscopies pour la caractérisation morphologique et chimique - Paramètres analysés, échelle d'observation ainsi que les avantages et inconvénients

Techniques	Paramètres sondés	Echelle d'information - Résolution	Point fort	Point faible
Microspectroscopie IR	Analyse morphologique et chimique	Liaisons chimiques ($\sim \text{nm}$) – 100 nm	Distinction du comportement spectral suivant la zone d'observation <i>Suivi in situ</i> de la dégradation des substrats envisageable	Préparation d'échantillon délicate et à optimiser en section polie, jamais réalisée sur poudre, potentiel impact négatif de la résine (bandes d'absorption communes), lourdeur de mise en place
Macrofluorescence	Profils de fluorescence liés à certains composés	Info moléculaire – 1 μm	Grande discrimination de la matière	Pas relié encore à une chimie précise, manque de recul
Microscopie UV	Fluorophores du substrat, et son environnement : lignine, AHC, marqueurs et enzymes	Présence et degré d'altération des fluorophores - $\sim 100 \text{ nm}$	Pas de préparation d'échantillon, donc limitation d'un grand nombre d'artefacts (altération du comportement des molécules sondées)	Matériel peu disponible, dépendant souvent d'un rayonnement synchrotron pour pouvoir l'exploiter pleinement. Permet uniquement d'observer des molécules fluorescentes.
FLIM	Temps de vie de fluorescence	$\sim 100 \text{ ps}$ - $\sim 200 \text{ nm}$	Grande discrimination potentielle (lignines notamment)	Peu de recul, outil peu présent

6. Conclusion générale

Nous avons vu que pour répondre au besoin croissant en carburant, et donc pour limiter l'utilisation de ressources pétrolières d'origines fossiles, le développement de procédés de production de biocarburants est essentiel. Dans ce contexte, le procédé de production d'éthanol 2G par voie biochimique se décompose en quatre étapes principales : le prétraitement, l'hydrolyse, la fermentation et la distillation. L'étape principale est l'hydrolyse enzymatique qui consiste à transformer la cellulose de la biomasse lignocellulosique en glucose grâce à l'utilisation d'un cocktail enzymatique. Cependant, la structure complexe de la biomasse lignocellulosique rend difficile l'exploitation de cette ressource à l'état natif. Il est donc nécessaire de réaliser un prétraitement qui hydrolyse les hémicelluloses en sucres fermentescibles, afin de modifier la structure et la composition de la matrice lignocellulosique et de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes. Le prétraitement a un coût conséquent lié à la consommation de produits chimiques et d'énergie. Une bonne connaissance de la structure des végétaux de l'échelle macroscopique à l'échelle nanométrique, de même qu'une observation et une compréhension fines des phénomènes mis en jeu pendant le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique, sont indispensables afin de comprendre le lien entre prétraitement et hydrolyse enzymatique. Ces connaissances permettront alors de déterminer les paramètres critiques amenant à une réactivité en hydrolyse enzymatique optimale, sans pour autant disposer de prétraitements trop coûteux.

Une étude bibliographique fut ainsi menée afin (i) de décrire la structure complexe et multiéchelle de la biomasse lignocellulosique, (ii) de comprendre l'influence de l'étape de prétraitement sur les propriétés physico-chimiques de cette biomasse, (iii) d'identifier les paramètres physico-chimiques pouvant potentiellement influencer la réactivité en hydrolyse enzymatique et (iv) de décrire les techniques analytiques nécessaires à la caractérisation multiéchelle de la biomasse et à la mesure des différents paramètres critiques vis-à-vis de la réactivité en hydrolyse enzymatique.

L'étude bibliographique réalisée sur la structure des biomasses lignocellulosiques permet de souligner la complexité de ces matériaux, en termes d'organisation structurale et de composition chimique. En effet, la structure est organisée de manière multiéchelle avec des compositions chimiques locales variables. Tous ces paramètres sont sources d'hétérogénéités qu'il conviendra de prendre en compte lors de l'analyse des échantillons.

En ce qui concerne les prétraitements, le traitement à l'acide dilué et l'explosion à la vapeur permettent d'augmenter significativement la digestibilité en hydrolyse enzymatique. Nous avons vu que le prétraitement avait pour effet d'hydrolyser les hémicelluloses, d'augmenter la surface accessible et d'augmenter l'indice de cristallinité. Ces effets dépendent de la sévérité du prétraitement. Notons toutefois que les études sur l'influence d'un prétraitement sur les propriétés d'une biomasse lignocellulosique sont souvent incomplètes puisque peu de paramètres physico-chimiques sont caractérisés, ou de manière trop superficielle, ou encore avec des lots d'échantillons peu comparables (trop de paramètres à la fois changent, l'essence, le prétraitement, les conditions opératoire, etc...). La majorité des études regardent l'efficacité du prétraitement en analysant la dégradation des hémicelluloses ou la réactivité des substrats prétraités en hydrolyse enzymatique. Certains travaux s'intéressent toutefois à l'influence d'un ou plusieurs paramètres tels que la surface BET ou la cristallinité, mais très peu essayent d'étudier la globalité des paramètres susceptibles d'influencer la réactivité pour une prise de recul et une compréhension globale des phénomènes. Ils semblent que les principaux paramètres influençant la réactivité en hydrolyse enzymatique sont les teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine (solubilisée et recondensée), la taille et la morphologie des fibres, la cristallinité de la cellulose, l'accessibilité des enzymes à la cellulose et la porosité. Toutefois, peu d'études étudient la totalité de ces paramètres en lien avec la réactivité des substrats prétraités puisqu'ils se focalisent généralement sur un ou deux paramètres (généralement la surface accessible ou le taux d'hémicelluloses) et il est donc difficile de conclure quant à l'importance relative de chacun des paramètres physico-chimiques pris isolément.

Afin de comprendre le lien entre la réactivité en hydrolyse enzymatique et les paramètres physico-chimiques, de nombreuses techniques analytiques furent mises en œuvre ces dernières années pour caractériser des biomasses lignocellulosiques d'un point de vue chimique avec l'utilisation de

spectroscopies ou d'un point de vue morphologique et structural avec l'utilisation de techniques microscopiques. Il s'avère que pour pouvoir caractériser ce type de substrat, il est indispensable d'avoir recours à plusieurs techniques afin de décrire les différentes échelles de la structure, mais aussi les différents paramètres physico-chimiques (morphologiques, texturaux, structuraux et chimiques). Ainsi il convient de choisir judicieusement les techniques analytiques adaptées pour la caractérisation des paramètres supposés être clés dans cette réactivité, tels que la cristallinité, la surface accessible, la présence de lignine, etc... Enfin, depuis quelques années, certaines techniques de microspectroscopie se développent et permettent de coupler des caractérisations morphologiques et chimiques à l'échelle tissulaire. Elles présentent aussi l'avantage de permettre des analyses *in situ*, c'est-à-dire au cours de l'hydrolyse enzymatique, et ainsi approfondir la compréhension des mécanismes de dégradation des substrats.

Ainsi, malgré une littérature abondante, la relation entre les conditions du prétraitement, les propriétés physico-chimiques des biomasses prétraitées et leur réactivité en hydrolyse enzymatique restent encore mal comprises.

III. Objectifs et stratégie de la thèse

1. Objectifs de la thèse

Cette thèse présente un triple objectif :

- Apporter une meilleure compréhension de l'impact d'un prétraitement (traitement à l'acide dilué ou explosion vapeur) sur les caractéristiques physicochimiques d'une biomasse.
- Identifier les descripteurs pertinents permettant d'expliquer l'aptitude à l'hydrolyse enzymatique d'un substrat en fonction de propriétés physicochimiques clefs.
- Suivre l'évolution des propriétés physico-chimiques d'une biomasse prétraitée, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement, au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Face à cette problématique, différentes propriétés du substrat seront recherchées : la proportion relative des différentes macromolécules, la morphologie des particules, leur distribution en taille, l'état de porosité, la chimie de surface (accessible aux enzymes), l'affinité des enzymes sur les différents tissus rencontrés et leur comportement d'adsorption-désorption au cours du temps, les propriétés d'autofluorescence, ou encore l'indice de cristallinité de la cellulose.

La biomasse lignocellulosique ayant une structure organisée, complexe et multi-échelle, l'analyse de ses propriétés rend nécessaire l'approche multi-technique pour rendre compte des différents états d'organisation de la matière et de leurs évolutions suite au prétraitement, depuis l'échelle macroscopique (~cm) jusqu'à l'échelle nanométrique et même inférieure, pour ce qui est des propriétés chimiques. La Figure 32 illustre les paramètres qui peuvent être suivis, dépendamment de l'échelle considérée. Ces paramètres seront ensuite mis en lien avec les conditions opératoires du prétraitement, et avec la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique.

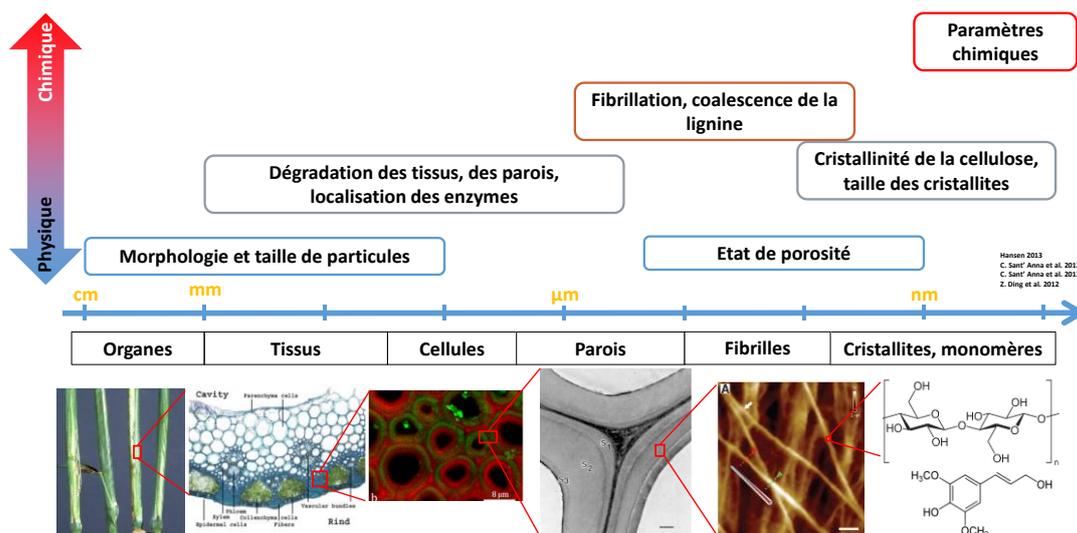


Figure 32 : Principaux paramètres étudiés pour la caractérisation de paille de blé prétraitée. Images tirées de la littérature [24,130,131,232]

2. Choix de la paille de blé et constitution d'un lot d'échantillons cohérents

Le choix de la paille de blé comme substrat d'étude s'est fait sur la base de la relative disponibilité de ce substrat notamment en Europe, sans accaparer de nouvelles surfaces avec des cultures énergétiques dédiées. Ce substrat constitue en Europe une référence comme peuvent l'être le *Miscanthus x giganteus* et le peuplier pour les cultures dédiées. Cependant, par le grand nombre d'usages des pailles céréalières, leur disponibilité réelle en est réduite : sur l'année 2011-2012, il est estimé que 25 Mt de paille furent produites sur le territoire français. Sur cette production, seules 16 Mt furent réellement exploitées (le reste étant notamment restitué au sol pour maintenir sa fertilité). Et parmi ces 16 Mt, 8Mt furent utilisées comme litière pour l'élevage. De cette manière, et dans les conditions actuelles, 8 Mt de pailles de céréales au mieux sont mobilisables par année en France [240]. Compte-tenu du rendement massique de l'ensemble de la chaîne du procédé depuis la paille jusqu'à l'éthanol (estimé à 18 %, [12]) et de la population française, cela correspond à la production de seulement 21,2 kg d'éthanol par individu et par an. En revanche, contrairement aux cultures dédiées, ce substrat est d'ores et déjà disponible, et ne nécessite pas d'adaptations immédiates dans le secteur agricole comme peuvent l'être les cultures dédiées.

Pour répondre aux objectifs de la thèse, il est nécessaire de disposer d'un inventaire très large de substrats lignocellulosiques aux propriétés physico-chimiques et aux réactivités à l'hydrolyse enzymatique très différentes. Un moyen d'obtenir cette diversité de propriétés et de digestibilité est de réaliser des prétraitements variés en termes de procédés et de conditions opératoires pour obtenir des biomasses lignocellulosiques prétraitées aux caractéristiques très différentes. Afin de répondre aux problématiques énoncées, il a été choisi de travailler sur un lot d'échantillons cohérents produits à partir de la même paille native de départ, prétraitée à l'acide dilué et explosion vapeur, avec différentes conditions opératoires. Ce travail de production a été réalisé dans le cadre de la thèse de Charlotte Loustau-Cazalet (2015-2018 [241]), effectuée en parallèle de la présente thèse.

3. Stratégie de la thèse

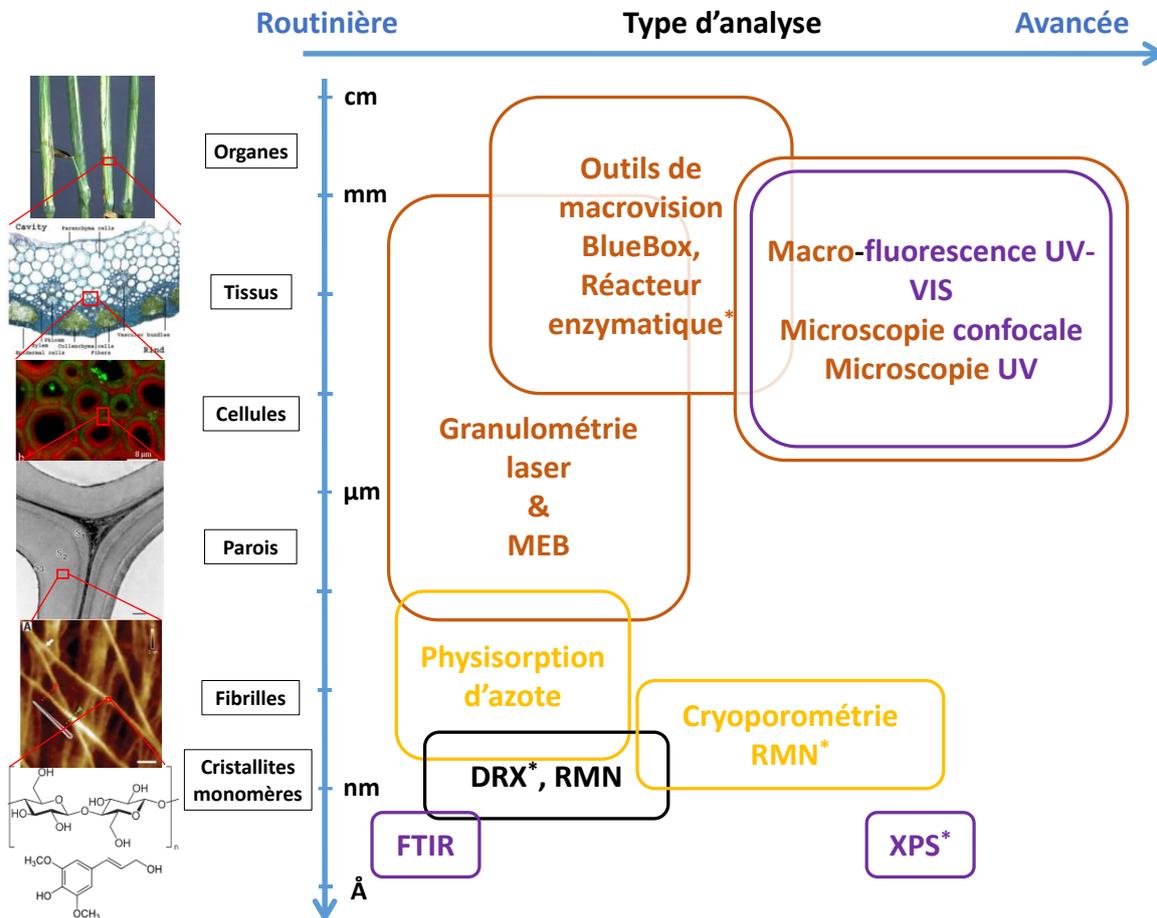
La stratégie de recherche adoptée dans le cadre de ces travaux de recherche s'articule en différentes étapes :

- **Définition des méthodologies** optimales de caractérisation en termes de choix d'outils, de conditionnement et de préparation d'échantillon ou encore d'analyse des données, afin de s'assurer de la validité des résultats
- **Caractérisation des pailles de blé prétraitées à l'acide dilué et par explosion vapeur**, afin d'obtenir une représentation détaillée de la matrice et de déterminer les effets des conditions opératoires sur le substrat et sur sa réactivité en hydrolyse enzymatique
- **Modélisation du rendement de conversion** de la cellulose en hydrolyse enzymatique à partir des descripteurs identifiés.
- **Suivi des propriétés physicochimiques au cours de la saccharification**, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement appliquées, par :
 - **Des analyses *ex situ*** sur des prélèvements à différents temps d'hydrolyse, pour comprendre comment la biomasse est modifiée au cours de l'hydrolyse, et comment cette dégradation peut impacter sa propre digestibilité
 - **Des analyses *in situ*** en microscopie de fluorescence UV pour suivre la dégradation du substrat et la localisation des enzymes en cours d'hydrolyse enzymatique, dans le but d'identifier des mécanismes de dégradation des enzymes en termes d'adsorption et de désorption, dépendamment des tissus et des conditions opératoires de prétraitement

IV. Matériels et méthodes

1. Les techniques expérimentales

La mise en lien des propriétés physicochimiques avec le rendement de conversion en hydrolyse enzymatique nécessite l'emploi d'outils de caractérisation adéquats, de même que des préparations d'échantillon adaptées et une méthodologie précise pour traiter les données, les exploiter, ou tout simplement les visualiser. On précise donc ici dans un premier temps le protocole de mise en saccharification des substrats, référence à partir de laquelle les rendements en glucose seront calculés. Ensuite sont présentés les outils utilisés dans la démarche d'une caractérisation multi-échelle et multi-technique, dans le but de sonder des propriétés physiques, chimiques, de cristallinité, de surface ou encore de porosité. La Figure 33 illustre les plages d'utilisation des différents outils analytiques mis en œuvre, dépendamment des propriétés étudiées.



*Techniques testées et écartées

Figure 33 : Représentation schématique de la structure multi-échelle de la biomasse lignocellulosique, et des techniques analytiques utilisées dans cette thèse, classées par type d'information, par échelle de caractérisation, et par facilité de mise en œuvre (depuis les analyses de routine jusqu'aux analyses avancées)

a. L'hydrolyse enzymatique

Il s'agit de tester la digestibilité d'un substrat en hydrolyse enzymatique. Les conditions suivies de saccharification se basent sur celles décrites par le protocole du NREL [50].

Ces expérimentations sont réalisées avec un équipement STEM dans lequel des flacons Schott de 100 mL sont introduits.

Le substrat est introduit à raison de 1 % pds de cellulose en solution, et est incubé en présence de deux cocktails enzymatiques composés de cellulases : (i) le cocktail GC220 (Genecor-Danisco, Rochester, NY, Etats-Unis d'Amérique, sécrétome de *Trichoderma reesei*) à 15 FPU/g de cellulose, et (ii) le cocktail N188 de β -glucosidases (Novozyme, Franklinton, NC, Etats-Unis d'Amérique, sécrétome d'*Aspergillus niger*) à 37,5 CBU/g cellulose, à un pH de 4,8 et une température de 50 °C, conformément au protocole NREL [50]. L'utilisation d'un 2^{ème} cocktail contenant majoritairement des β -glucosidases (Tableau 9) se justifie par le fait que l'on souhaite d'une part réaliser des hydrolyses enzymatiques pour lesquelles le cellobiose n'exerce pas une inhibition sur les cellulases, et d'autre part pour s'assurer que la conversion du cellobiose en glucose n'est pas une étape limitante. En effet, on considère par la suite le rendement de conversion de la cellulose en glucose, qui doit refléter au mieux la digestibilité des substrats. Le glucose libéré au cours de l'hydrolyse enzymatique est mesuré et est exprimé en % du glucose initial présent sous forme de cellulose. Le Tableau 9 indique les informations disponibles sur les deux cocktails enzymatiques utilisés.

Tableau 9 : Caractéristiques des deux cocktails enzymatiques utilisés

	GC220	N188
Fournisseur	Genecor	Novozyme
N°Lot	491121-1718	DCN00214
Enzymes dominantes	Cellulases	β -glucosidases
Densité (g.cm⁻³)	1,152	1,206
Concentration (g de protéine.L⁻¹)	187	184
Activité FPase¹ ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	1,2	0,1
Activité β-glucosidases² ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	2,1	2

Le substrat à hydrolyser est introduit dans un flacon Schott de telle sorte à ce que l'on ait dans le flacon une masse de 0,7 g de cellulose. On y ajoute ensuite 3,5 mL de tampon acétate à un pH de 4,5, 7 mL d'azide de sodium à une concentration de 10 g.L⁻¹ et qui constitue un biocide pour éviter une contamination biologique au cours de l'hydrolyse. Le tampon quant à lui, permet de se placer à un pH stable, et proche du pH optimal pour exécuter l'hydrolyse enzymatique (4,8). Le flacon est rempli d'eau déminéralisée afin que la masse totale du mélange réactionnel soit de 70 g. Pour chaque substrat à tester, les hydrolyses sont effectuées en double. Les flacons sont placés sous agitation magnétique pendant une nuit avant l'ajout des enzymes, afin de s'assurer de l'imprégnation du substrat et de l'homogénéisation du mélange réactionnel, évitant ainsi toute limitation de la conversion par des causes d'ordre rhéologique. Matinalement, le pH est ramené à 4,8, la température vérifiée, puis les enzymes sont introduites dans les quantités suivantes :

- 23 μL de cocktail GC220 (6 mg de protéine/g de cellulose).
- 70 μL de cocktail N188 (18 mg de protéine/g de cellulose)

En cours d'hydrolyse, des prélèvements de 1 mL sont effectués à différents temps de saccharification : 1,5 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, et 72h. Les prélèvements sont plongés dans un bain marie à 90 °C durant

¹FPU : unité papier filtre, 1FPU correspond à la quantité d'enzymes permettant de libérer 1 μmol de glucose par minute à partir d'un papier filtre dans les conditions standards du test.

²CBU : unité activité β -glucosidases, 1 CBU correspond à la quantité d'enzymes permettant de libérer 1 μmol par minute de glucose à partir de cellobiose dans les conditions standards du test

10 min, afin de désactiver les enzymes cellulolytiques. Après refroidissement complet, les prélèvements sont centrifugés à 4000 tr/ving durant 20 min et le surnageant est prélevé pour doser la concentration en glucose.

Afin d'évaluer la conversion des polymères de glucose (cellulose principalement) en monomères de glucose, la teneur en glucose est déterminée tout au long du test d'hydrolyse enzymatique à l'aide d'un analyseur enzymatique YSI 2700. Pour ce faire, une sonde de glucose-oxydase convertit le glucose en eau oxygénée. Cette eau oxygénée est ensuite oxydée sur une électrode de platine. Le courant produit (et mesuré) par cette réaction est proportionnel à la quantité de D-glucose libéré. La mesure est réalisée deux fois pour chaque échantillon, à chaque temps de prélèvement.

Le temps de conversion de référence pour comparer les différents échantillons est choisi à 72h. La détermination du rendement à 72h en glucose et en autres sucres est réalisée par HPLC (chromatographie en phase liquide) couplée à une détection par indice de réfraction. Pour déterminer ce rendement, il est nécessaire de connaître le potentiel de chaque sucre présent dans l'échantillon non hydrolysé et lavé. Le rendement en sucre est alors déterminé selon l'Équation (1) :

$$\eta = 100 \times \frac{C_S \times M_M}{M_S \times P_S} \quad \text{Équation (1)}$$

avec : C_S : la concentration d'un sucre glucose, mesurée dans l'hydrolysats (en g/kg)

M_M : la masse du mélange réactionnel initial (en kg)

M_S : la masse de substrat initial (en g de MS)

P_S : le potentiel en sucre (glucose ici), qui est la concentration en glucose libérée par hydrolyse acide du substrat prétraité et lavé (en g/100g de MS)

L'incertitude sur le rendement enzymatique en glucose est estimée à +/-5 % sur les hydrolyses enzymatiques.

b. Caractérisations morphologiques

Plusieurs paramètres morphologiques seront regardés à différentes échelle : forme des particules, état général de dégradation (fragmentation, taille des particules, fibrillation), tissus présents, et l'état de surface (lisse, rugueux, présence de gouttes, etc.).

i Macrovision à l'aide du prototype BlueBox

Principe

L'outil prototypique de macrovision BlueBox a été utilisé pour rendre compte des modifications morphologiques provoquées par le prétraitement sur la paille de blé étudiée. Le prototype a été construit à l'INRA Pays de la Loire de manière à réaliser l'analyse de la morphologie de tissus végétaux [135]. L'appareil permet de contrôler l'intensité de l'éclairage et les grandissements afin de pouvoir comparer des échantillons par analyse d'images. Une caméra CCD PROSILICA EC1600 (Alliance Vision, Montélimar, France) est présente, de même qu'un objectif PRECISE EYE NAVITAR à focale fixe, un anneau libre de fibres optiques (SCHOTT DCR® IV Light Source) placé sur un fond noir pour rétroéclairer les coupes avec un angle de 35 °, et des platines motorisées pour positionner la caméra et l'échantillon. L'acquisition d'images est pilotée par un logiciel développé sous LabView™ 8.2. Il permet d'observer des coupes mais également des poudres, avec la contrainte que les variations d'épaisseur d'objet ne soient pas trop importantes (jusqu'à 1mm environ). Comparativement à la microscopie optique, cette technique est bien moins résolutive (~10 µm) mais permet de visualiser de grands champs de vue. De plus, l'acquisition de

mosaïques d'images permet à la fois d'obtenir une statistique correcte descriptive de la poudre étudiée, et de sonder une gamme de taille de particules très grandes (jusqu'à quelques millimètres pourvu que la préparation d'échantillon soit adaptée et répétée). Cet équipement a été utilisé pour caractériser l'anatomie d'échantillons végétaux (tige de maïs, fruit de tomate, pomme) : proportion et agencement des différents tissus, taille des cellules ou encore taille de particules dans des broyats [135]. Une distribution de tailles de particules peut aussi être déterminée par analyse de texture d'images après application d'un masque dont la taille et la forme sont adaptables, ou encore par analyse d'image par seuillage. Dans le cas de l'analyse de texture d'images, il est possible de quantifier le type d'hétérogénéité de forme et de longueur des particules [136]. Cette technique peut être utilisée de manière complémentaire et comparative avec la granulométrie par diffraction laser. Ainsi, par la visualisation directe d'un champ de vue très macroscopique, cet outil permet une caractérisation qualitative visuelle et quantitative pour des gammes de tailles d'objets variant de 100 μm à 2-3 mm. Les principales limitations résident dans la présentation de l'échantillon sous la caméra (gestion du flou, d'hétérogénéités, de texture ou encore de luminosité). Les descripteurs fournis sont une distribution de diamètres de particules ou de facteur d'allongement.

Acquisition des images

Les échantillons sont pré-hydratés dans un peu d'eau, afin d'éviter la présence de bulles d'air gênant l'observation et l'analyse d'images. Une fois imprégnée, la matière est introduite dans une boîte de Pétri (diamètre 55 mm) :

- Pour un substrat à faible granulométrie (épaisseur de grain/particule inférieure à 0,5 mm environ), une lamelle circulaire est déposée sur la préparation, afin d'éviter les mouvements d'eau lors des acquisitions d'images
- A l'inverse, pour les substrats à grosse granulométrie (épaisseur de grain/particule $>0,5$ mm), ici granulométrie de 2 mm, la présence d'une lamelle n'est pas adaptée pour des raisons de mouvements d'eau, de plus la planéité de la lamelle ne peut être maintenue.
- Les paramètres critiques pour l'acquisition sont la quantité d'eau, la densité surfacique, et le réglage de la netteté. En effet, une forte quantité d'eau permet d'imprégner toutes les tailles de particule, mais les mouvements d'eau sont alors plus conséquents, ce qui pose des problèmes de netteté. De même, une grande concentration de particules permet une bonne représentativité, mais s'accompagne d'un risque plus important de superposition de particules.

L'utilisation correcte de l'appareil nécessite une initialisation des platines de positionnement, une calibration spatiale en x et y de l'image, et une calibration en luminosité, par l'introduction de plans diffusants et circulaires, s'adaptant au support d'échantillon, et d'épaisseurs différentes (2, 4, et 7 mm).

L'acquisition en elle-même se fait soit manuellement image par image, soit automatiquement sous forme de mosaïque *via* un déplacement motorisé des platines.

Les principaux réglages et caractéristiques de l'appareil et des images obtenues sont les suivants :

- Objectif de la caméra : 1,2 X
- Position verticale de la caméra : 105,7 mm
- Taille du pixel : 3,630 μm
- Taille du champ de vue X et Y : 5,890 mm X 4,429 mm.

Analyse d'images BlueBox

Le traitement d'images BlueBox a été réalisé à l'aide du logiciel Indigo, interne à IFP Energies nouvelles, adapté à cette thématique et ces jeux d'images, avec les étapes suivantes :

- Pseudo TopHat (précision de 6, taille de 300 px) pour corriger les fonds de la mosaïque, qui ne sont pas toujours uniformes
- Segmentation biclasse MVI. Sert à binariser l'image (en blanc les particules, en noir le fond)

- Elimination des particules de taille inférieure à 3 pixels (particules trop petites, qui ne peuvent pas être proprement caractérisées, ou issues d'un artefact, bruit ou autre)
- Remplissage des trous. Cela sert à remplir les contours trouvés des particules, afin d'obtenir la forme complète de la particule (et pas uniquement son contour)
- Labellisation des particules et mesure des diamètres.

Une fois les images finales et binarisées obtenues, un fichier .txt est généré par le logiciel. Grâce à une macro Excel pour laquelle on détermine notamment l'intervalle de regroupement pour compter le nombre de particules pour chaque partition granulométrique, les distributions en taille de particules sont obtenues.

ii Microscopie électronique à balayage

Principe

La microscopie électronique à balayage permet d'imager en haute résolution (jusqu'à des dimensions légèrement infra-microniques sans métallisation de surface) la surface d'un échantillon par différentes interactions entre les électrons et la matière. Un faisceau d'électrons est produit et balaye la surface du substrat, qui en réponse, réémet notamment des électrons qui sont collectés et permettent de reconstruire point par point, l'image de l'échantillon, avec, suivant le détecteur utilisé, un contraste plutôt topographique (électrons secondaires) ou élémentaire (électrons rétrodiffusés). La collecte des électrons secondaires se fait par piégeage grâce à un champ électrique local créé afin de récupérer les électrons les moins énergétiques et les plus facilement déviés par ledit champ créé. A l'inverse, pour les électrons rétrodiffusés, la collecte se fait en déviant préalablement les électrons secondaires par l'application d'un champ électrique, et les électrons rétrodiffusés sont collectés de manière directe (en ligne droite depuis la zone déviée). Les MEB équipés de détecteur EDS (pour *Energy Dispersive Spectroscopy*) permettent d'obtenir en des zones sélectionnées, des spectres d'émission des rayons X qui permettent d'identifier les éléments présents et de quantifier leur concentration (de numéro atomique $Z > 5$).

Protocole instrumental

Le microscope utilisé est un modèle FEG FEI Nova Nano SEM 450, pour lequel la détection des électrons secondaire en vide classique est réalisée grâce à un détecteur Everhart-Thorney.

L'observation de l'échantillon est directe, sans préparation particulière. Dans ce cas, un peu de poudre d'échantillon est simplement déposée sur un adhésif carboné. Les conditions opératoires pour l'observation sont indiquées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Conditions d'analyse par MEB

Type de préparation	Observation directe
Pression	10^{-3} - 10^{-4} Pa (vide secondaire)
Détecteur	ETD
Tension d'accélération	Souvent 2 kV
Spot	1,5
Mode	Electrons secondaires ➔ Contraste topographique

iii La granulométrie par diffraction laser

Principe

Cette technique exploite le phénomène de diffraction des rayons par des particules de petites tailles (0,05 à 900 μm), dont l'angle de diffraction dépend de la taille de la particule (théorie de Fraunhofer, pour les particules de plus de 10 μm , et théorie de Mie pour les tailles inférieures). L'acquisition des données permet de représenter la distribution en volume ou en nombre de la taille des particules.

L'inconvénient majeur limitant son utilisation à la biomasse lignocellulosique est la mauvaise représentativité de l'analyse, dont la théorie s'appuie sur l'hypothèse de particules sphériques, ce qui n'est absolument pas le cas pour ces types de poudres. De plus, les particules de la taille du millimètre ou plus ne peuvent pas être comptabilisées correctement. Cependant son utilisation peut être pratiquée afin d'avoir une idée de la distribution en tailles de particules, et notamment de son évolution dépendamment d'un broyage, de conditions opératoires de prétraitement, ou encore au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Protocole d'analyse

Les analyses de granulométrie laser sont réalisées avec un diffractomètre Malvern Mastersizer 3000, dont la plage de détection va de 0,01 μm à 2 mm.

Pour la caractérisation des substrats de cuisson acide, les échantillons sont directement analysés à l'état séché. Cependant, afin de dé-agglomérer les particules les unes des autres, une dispersion est réalisée par une détente à air, dont la variation de pression est de 2 bars.

c. Caractérisation de la porosité : analyse par physisorption d'azote

L'état de la porosité a été étudié à travers la mesure de la surface accessible, du volume poreux, ou encore la détermination d'une distribution taille de pores, par l'utilisation de la physisorption d'azote.

i Principe

Prétraitement de désorption des substrats

Afin de désorber l'eau résiduelle présente dans les échantillons, même lyophilisés, un prétraitement thermique sous vide est réalisé avant la mesure de physisorption. Cependant, afin de ne pas dégrader la structure notamment pour les échantillons lyophilisés, ni même la chimie des substrats, il est important de garder des conditions de dessiccation plutôt douces. Les conditions adoptées sont les suivantes :

- Mise en vide secondaire de l'échantillon lyophilisé
- Chauffage jusqu'à 30 °C par une rampe ascendante à 2 °C/min, puis un palier de 120 min à 30 °C, et enfin une rampe descendante à 2 °C/min.
- Remise à la pression atmosphérique sous atmosphère inerte sèche (diazote).

Analyse dans la cellule de mesure

Après avoir réalisé le vide et amené l'échantillon à la température de l'azote liquide (à -196 °C) et sous une certaine pression (environ 1,23 Bar), des quantités connues d'azote sont introduites dans la cellule. A chaque injection, l'adsorption d'azote se produit et la pression diminue jusqu'à ce que l'adsorbant et l'adsorbant restant soient en équilibre (temps d'équilibre de 15 secondes).

La mesure de la pression partielle de diazote s'effectue en continu via un système relié au dispositif de mesure de pression. Ces injections sont continuées selon une table de pression prédéfinie jusqu'à saturation, à $P/P_0 = 1$ (P_0 étant la pression atmosphérique), pour obtenir l'isotherme d'adsorption complète. Le système est ensuite purgé pas à pas pour accéder aux quantités restées adsorbées sur le solide et pour tracer l'isotherme de désorption.

L'exploitation des mesures est effectuée automatiquement et conduit à différentes valeurs des grandeurs texturales recherchées et aux tracés des différentes courbes (isothermes, répartition poreuse, etc.) :

- la surface spécifique qui correspond à l'étendue des surfaces interne et externe du solide accessible aux réactifs (atomes ou molécules). Elle est déterminée via la méthode B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller, [144]) dans le domaine P/P_0 compris entre 0,05 et 0,35 [145],

- le volume poreux total qui représente le volume des micropores et des mésopores accessibles à l'azote. Il est déterminé à la fin de l'adsorption ($P/P_0 \sim 1$),
- la distribution mésoporeuse qui est la répartition du volume poreux en fonction de la taille des pores. Elle est déterminée via le modèle Barret, Joyner, Halenda, B.J.H [146]

Pour rappel, les propriétés dimensionnelles du gaz sonde (diazote) sont les suivantes :

- Diamètre de la sphère dure : 0,386 nm
- Aire de la section transversale : 0,162 nm²

ii Répétabilité/reproductibilité de la mesure

Pour s'assurer du caractère significatif des données de physisorption, une répétition de mesure sur un prélèvement a d'abord été effectuée. Les deux mesures de surface BET étaient de 9,37 et de 9,35 m²/g, ce qui confirme la qualité de la mesure pour un prélèvement donné. Afin de s'assurer de la représentativité des prélèvements vis-à-vis de l'échantillon total, une troisième mesure a également été lancée, sur un autre prélèvement de matière de cet échantillon. Une fois encore la valeur de la surface BET de 9,33 m²/g rassure sur le fait que les prélèvements sont représentatifs de l'échantillon au complet (l'écart type des trois mesures est de 0,02).

En outre, pour l'ensemble des analyses en physisorption, il apparaît que le volume poreux (à $P/P_0 = 1$) évolue de manière rigoureusement linéaire avec la surface BET. De ce fait, la discussion sur la S_{BET} dans le manuscrit sera également directement transposable au volume poreux.

d. Caractérisations chimiques

Plusieurs paramètres chimiques seront étudiés : la composition macromolécules (cellulose, hémicelluloses, lignine), l'indice de cristallinité de la cellulose, la chimie de surface, et les propriétés d'autofluorescence.

i L'indice de cristallinité de la cellulose par Résonance Magnétique Nucléaire

Principe

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique analytique basée sur le magnétisme nucléaire des atomes. Pour des échantillons de biomasse, on s'intéresse le plus souvent à l'analyse du carbone. Cependant, le carbone est un noyau difficile à observer car l'abondance isotopique du carbone 13 (spin non nul) est extrêmement faible et présente un long temps de relaxation spin-réseau (relaxation T1). En observation directe (analyse quantitative), l'analyse demande environ 10 h d'acquisition. Il est alors possible d'effectuer une polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ selon les conditions de Hartmann et Hahn. La polarisation croisée consiste à transférer la polarisation du noyau d'hydrogène (abondant et à fort coefficient gyromagnétique) sur le noyau du carbone 13. La polarisation permet alors d'améliorer le rapport signal/bruit du spectre carbone mais l'intensité des différents signaux observés est alors directement proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène présents à proximité des atomes de carbones observés. Ainsi, les fractions de cellulose et hémicelluloses étant plus riches en hydrogène seront davantage sensibles à la polarisation croisée lors de l'analyse par RMN CPMAS $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ en comparaison de la fraction lignine (essentiellement aromatique). Dans le cas de l'analyse de la biomasse lignocellulosique, il est indispensable de faire tourner axialement l'échantillon à l'angle magique (MAS, pour *Magic-Angle Spinning*) car dans le cas contraire les raies obtenues sont larges, et les spectres non résolus en déplacement chimique ne sont pas exploitables. Une vitesse importante est requise pour affiner au mieux les pics présents, et écarter du spectre les bandes de rotation qui apparaissent, cependant cette vitesse de rotation est limitée techniquement par le rotor : plus la sonde est petite, plus une vitesse de rotation importante peut être atteinte. En contrepartie, le signal est plus faible pour un rotor petit, ce qui implique d'augmenter d'autant le temps d'acquisition pour maintenir un rapport signal sur bruit satisfaisant. De plus, un prélèvement très petit questionne sur la représentativité dudit prélèvement.

Acquisitions

Les mesures d'indice de cristallinité de la cellulose s'effectuent par analyses RMN du solide sur un spectromètre 400 MHz (Bruker ; Avance) en polarisation croisée ^1H - ^{13}C à l'aide d'une sonde 4 mm CPMAS. Les spectres ont été enregistrés après acquisition de 360 scans à une vitesse de rotation de 12 kHz, un temps de contact de 1,2 ms et un temps de recyclage de 50 s permettant la relaxation complète des protons.

Exploitation des spectres

La détermination de l'indice de cristallinité CI nécessite la décomposition du signal en ses différentes contributions (Figure 34) à l'aide du logiciel DMfit sous forme de distribution de Voigt (produit de convolution d'une distribution gaussienne et d'une distribution lorentzienne) :

- La contribution des deux distributions gaussienne/lorentzienne est fixée à 1/2.
- La position de chaque contribution de chaque pic détecté est d'abord placée approximativement à la main, de même que les intensités et largeurs des pics correspondantes.
- Les ajustements sont ensuite optimisés en laissant libres dans un premier temps les amplitudes de pic, puis les largeurs de pic, enfin et si nécessaire les positions.
- Les deux aires d'intérêt sont ensuite extraites (pic à 89 ppm pour la fraction cristalline, 84 ppm pour la part amorphe), afin de calculer l'indice de cristallinité de la cellulose.

L'indice est déterminé par la formule suivante :

$$CI_{RMN}(\%) = 100 \times \frac{A_{89}}{(A_{89} + A_{84})}$$

où A_{89} est l'aire du pic de la cellulose cristalline, et A_{84} est l'aire du pic de la cellulose amorphe.

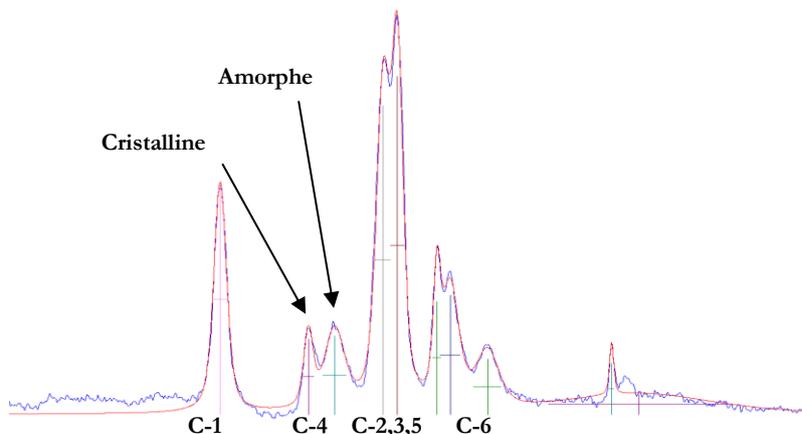


Figure 34 : Attributions des pics du domaine de la cellulose

Incertitudes de mesures

Une précédente étude interne avait montré que l'incertitude de mesure sur l'indice de cristallinité était estimée à +/-5 %.

ii Analyse compositionnelle par hydrolyse acide

Cette étape permet d'hydrolyser la totalité des polysaccharides sous forme de sucres monomériques dans le milieu liquide. Cette hydrolyse est réalisée en deux étapes : une première à 30 °C et une forte concentration en acide (72 % d'acide sulfurique), et une deuxième étape à 121 °C, à teneur réduite en acide (4 % d'acide sulfurique). La fraction liquide est ensuite séparée du solide résiduel, puis finalement le pH

est rehaussé à l'hydroxyde de sodium à une valeur autour de 4,7 pour les analyses chromatographiques. Le protocole suivi est décrit dans une note technique du NREL [242]. Les analyses ont été réalisées dans le cadre de la thèse de Charlotte Loustau Cazalet. La fraction liquide est ensuite analysée en chromatographie ionique couplée à un détecteur à ampérométrie pulsée. Il est ainsi possible de recalculer la teneur en sucres polymérisés des substrats prétraités : dans notre cas la cellulose d'une part, et d'autre part les unités xylose, arabinose, et galactose, qui sous forme polymérique, constituent les hémicelluloses. La fraction liquide est également analysée en HPLC afin de déterminer l'abondance de produits de dégradation des sucres ciblés : acides acétique, formique, lévulinique, 5-HMF et furfural.

Pour la teneur en cellulose et celle en hémicelluloses des substrats, c'est la méthode d'analyse compositionnelle par hydrolyse acide qui fait référence parmi les différentes méthodes de caractérisation chimique. L'incertitude sur les différentes teneurs est de l'ordre de 5 %.

iii Spectroscopie dans le moyen infrarouge à transformée de Fourier

L'usage de la spectroscopie a été utilisé pour étudier les évolutions des bandes d'adsorption dont les attributions chimiques sont connues. Dans un second temps, et grâce à l'analyse multivariée, ces analyses ont permis d'une part de classer les échantillons sur la base de modifications spectrales, et d'autre part de pouvoir déterminer la composition chimique des échantillons, notamment leur teneur en humines qui sont des produits de dégradations issus des sucres (polymériques ou monomériques), et qui n'était jusqu'à présent pas distinguée de la fraction de lignine non hydrolysable.

Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) exploite le phénomène d'absorption d'un champ électromagnétique dans le domaine du moyen infrarouge (4000 à 400 cm^{-1}) par un matériaux, dont les bandes spectrales d'absorption qui sont définies par leur nombre d'onde, sont spécifiques d'une liaison covalente dans la matrice, et plus précisément, spécifiques d'un mode de vibration d'une liaison covalente (par exemple étirement symétrique/antisymétrique, cisaillement, bascule, agitation, torsion).

Dans la pratique, plutôt que de balayer successivement une plage d'excitation à l'aide d'un monochromateur (ce qui aurait pour conséquence un long temps d'acquisition), le signal source passe par un interféromètre. Le signal récupéré quant à lui, est enregistré en une seule fois, et doit être traité par une transformée de Fourier, pour être interprété comme un spectre d'absorption, identique à un spectre IR dispersif (obtenu par balayage excitatif monochromatique).

Ainsi, cette technique peut être utilisée comme une méthode rapide de caractérisation chimique des échantillons. Elle permet de suivre l'évolution qualitative de la teneur en lignine, en hémicelluloses et en cellulose d'un substrat au cours du prétraitement.

Acquisition des spectres

L'acquisition est réalisée en mode ATR (*Attenuated Total Reflectance*) sur un spectromètre Nexus 670 ThermoNicolet FTI. La résolution choisie est de 4 cm^{-1} . Le substrat est déposé sous forme anhydre sur le cristal, et maintenu en contact contre celui-ci par une sorte d'étau à vis, le "golden gate"

- Accumulation de 32 spectres sur une préparation, donnant un spectre moyen pour chaque acquisition
- Le substrat n'est pas broyé spécifiquement pour l'analyse. La représentativité passe donc par l'acquisition sur plusieurs préparations, dont la moyenne est jugée représentative de l'échantillon. En l'occurrence, et sauf mention contraire, nous avons réalisé 5 préparations différentes pour un même échantillon, donnant lieu à 5 spectres moyens par échantillon. Ce point a d'ailleurs fait l'objet d'une étude de reproductibilité spécifique qui a permis de valider ces différents paramètres d'analyse.
- Le spectre obtenu s'étend de 4000 à 400 cm^{-1}

Traitement des spectres infrarouges

Les spectres bruts ont été corrigés par le fond atmosphérique mesuré régulièrement au cours des expérimentations, par des spectres de référence du CO₂(g) et H₂O(g), et enfin une correction ATR. Des traitements ultérieurs ont été réalisés pour les ACP (Analyse en Composantes Principales) et régressions PLS (*Partial Least Square*).

Attribution des bandes

L'interprétation des spectres sera basée sur l'attribution des bandes décrite dans la littérature [96,98,207,243–247] et présentée dans le Tableau 11 ci-dessous :

Tableau 11 : Attributions des différentes bandes d'absorption infrarouges, adapté de [243]

Absorptions (cm ⁻¹)	Description	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine
2918-2920	Étirements symétriques et asymétriques de la liaison C-H dans les groupements CH, CH ₂ , CH ₃	Oui	Oui	Oui
2900	Étirements CH et CH ₂	Oui	-	-
2850-2852	Étirements symétriques et asymétriques des groupements CH, CH ₂ , CH ₃	Oui	Oui	Oui
1734	Groupements acétyl, féruloyl, et <i>p</i> -coumaroyl en liaison ester entre les hémicelluloses et la lignine	-	Oui	Oui
1718	Étirements C=O des groupements non conjugués cétone, carbonyle; et ester	-	-	Oui
1654	Étirements C=O des groupements conjugués cétones aryliques substitués en position para	-	-	Oui
1597-1598	Squelette aromatique et vibrations C=O	-	-	Oui
1508	Vibration élongatoire de la liaison C=C des cycles phénoliques	-	-	Oui
1458	Déformations des C-H (CH et CH ₂) des cycles phénoliques	-	-	O
1437	Mouvement de cisaillement des groupements CH ₂	Oui	-	-
1420	Déformation de la liaison C-H (dans CH et CH ₂) dans les cycles phénoliques	-	-	Oui
1388	Elongation C-O	-	Oui	-
1376	Flexion de la liaison C-H	Oui	-	-
1320	Vibrations squelettiques des liaisons C-C et C-O	Oui	-	-
1262-1265	Groupements méthoxyl guaiacyl	-	-	Oui
1251	Elongation C-O des acétyls	-	Oui	-
1228-1235	Elongation C-O de l'unité syringyl	-	-	Oui
1161	Vibration C-O asymétrique	Oui	-	-
1127	Déformation planaire C-H, élongation C=O des unités syringyls et des alcools secondaires	-	-	Oui
1107-1112	Vibration squelettique C-OH dans le cycle pyranosyl	Oui	Oui	-
1091	Déformations C-O des liaisons d'alcools secondaires et d'éthers aliphatiques	-	-	Oui
1080	Chaines latérales du galactane	-	Oui	-

Tableau 11 (continuation)

Absorptions (cm ⁻¹)	Description	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine
1061-1066	Vibration squelettique des liaisons éthers C-O-C des pentoses et hexoses	Oui	Oui	-
1158	Elongation asymétrique de la liaison C-O d'esters	-	-	Oui
1043-1049	Elongation C-O et C-O-C de la liaison glycosidique dans le xylane	-	Oui	-
1035	Elongation C-O dans la cellulose	Oui	-	-
1033-1034	Déformation dans le plan de la liaison aromatique C-H des unités guaiacyls	-	-	Oui
993-998	Chaînes latérales d'arabinosyl	-	Oui	-
896-898	Vibration de la liaison C-H β-glycosidique des cycles des pentoses et hexoses	Oui	Oui	-
840	Déformations hors du plan de la liaison C-H	-	-	Oui

iv Microscopie confocale

La microscopie confocale a été utilisée pour donner des informations d'ordre morphologique, surtout pour étudier le caractère ligneux ou cellulosique de la surface des particules (après marquage spécifique), accessible au milieu extérieur et donc aussi aux enzymes.

Principe

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM, pour *Confocal Laser Scanning Microscopy*) utilise le principe de la fluorescence : un électron de l'atome est excité (absorption) par une source de lumière (un photon d'énergie et de couleur donc de longueur d'onde donnée), puis se désexcite par transition non radiative. L'électron partiellement désexcité revient alors à son état énergétique initial, stable, en émettant un photon de plus grande longueur d'onde (donc de couleur différente et plus basse énergie) que celle du photon incident.

Dans le cas de la biomasse lignocellulosique, l'auto fluorescence des parois peut être exploitée, quoique l'utilisation de marqueurs spécifiques de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine, ou encore des enzymes dans le cas d'une observation *in situ*, est plus répandue. Parmi ses principaux avantages, on peut citer le bon rapport signal sur bruit (par la présence d'une excitation laser puissante et focalisée), la finesse et la précision de la coupe optique (tout ce qui sort de la profondeur de champ n'est pas imagé, il n'y a donc pas de déformation, de flou, de masquage, de diffraction ou autres artefacts pouvant être présents en microscopie optique classique), ou encore la possibilité d'observer des systèmes dynamiques ou vivants.

Protocole de marquage

Différents marqueurs sont possibles, notamment pour colorer la lignine et la cellulose : rouge Congo, safranine, bleu Alcian, DTAF, calcofluor, etc. Après avoir testé un certain nombre de ces marqueurs, la coloration à la safranine a été choisie, par sa simplicité de mise en œuvre, sa sélectivité, son action de double marquage (cellulose en vert, lignine en rouge), et son intensité de fluorescence une fois fixée sur la matrice. Des pré-tests de faisabilité pour travailler sur l'auto fluorescence spécifique de la lignine et celle de la cellulose montrèrent la nécessité de passer par un marquage, principalement par le faible signal récupéré, et par la difficulté à séparer les signaux, compte tenu du système optique de sélection des plages de longueurs d'ondes en émission. La préparation d'échantillon est la suivante :

L'échantillon sous forme pulvérulente ou sous forme d'une coupe préparée par cryo-microtomie déposée sur une lame/lamelle optique (dans un tel cas, voir la préparation associée, dans la section IV.e.iii), est imprégné d'une solution de safranine concentrée à 1 % pds pendant 10 min puis rincé à l'eau. Dans le cas

d'un échantillon non coupé, celui-ci est filtré puis lavé trois fois à l'eau distillée, et enfin filtré une dernière fois.

Acquisition des données

Le microscope utilisé dans le cadre de cette étude est un ZEISS LSM 800 et est situé à Villeurbanne, sur la plateforme de microscopie CT μ (Figure 35).



Figure 35. Microscope ZEISS LSM 800 du CT μ

La source de lumière est un laser de longueur d'onde donnée. Quatre lasers sont disponibles : 405 nm, 488 nm, 561 nm et 640 nm. Un filtre acousto-optique permet de régler la puissance d'illumination de chaque laser ainsi que le temps d'illumination par pixel, deux paramètres importants pour l'optimisation de la détection du signal. Le laser est focalisé à une profondeur donnée et balaye la zone d'intérêt. Avec un réglage approprié de l'intensité du laser et du temps d'illumination par pixel, le laser peut pénétrer de façon non destructive dans l'échantillon et permettre de faire plusieurs coupes optiques dans des plans focaux différents. La superposition de ces différentes coupes permet la reconstitution en 3D de l'échantillon. Le signal émis peut être récupéré entre 390 et 710 nm. Une série de filtres permet de sélectionner la plage de longueur d'onde émise souhaitée.

Le champ de vue est de l'ordre de 600 microns à un objectif X10. De plus il est possible de réaliser des acquisitions en mode mosaïque. L'échelle est tout à fait adaptée à l'observation des parois et alvéoles de biomasses lignocellulosiques.

Acquisitions des images

Une fois l'échantillon préparé et placé correctement sur la platine, les conditions d'acquisition suivantes ont été utilisées :

Tableau 12 : Principales conditions d'analyse pour les différentes préparations : longueurs d'excitation, d'émission et puissance du laser d'excitation pour des images en zoom $\times 10$

Observation de la cellulose	Longueur d'excitation.	488 nm
	Plage d'acquisition	510-550 nm
	Puissance laser	1 %
Observation de la lignine	Longueur d'excitation.	640 nm
	Plage d'acquisition	640-700 nm
	Puissance laser	5 %

Les analyses qui sont présentées dans le manuscrit portent sur les mosaïques dans le but de couvrir une surface significative d'échantillon et d'estimer un rapport surfacique relatif de cellulose et de lignine.

Analyse des images mosaïques

Les proportions surfaciques cellulosique et ligneuse sont déterminées en raisonnant sur les intensités moyennes de fluorescence des mosaïques d'images, pour les deux acquisitions (fluorescence de la cellulose et de la lignine). Les valeurs des 2 canaux n'étant pas directement comparables, les valeurs des intensités ne sont pas directement utilisables. En revanche, les évolutions de leur proportion relative sont intéressantes. Par exemple, on considèrera par la suite, la proportion relative de la fluorescence de la cellulose :

$$\%_{cellulose\ surface} = \frac{I_{cellulose}}{I_{cellulose} + I_{lignine}} \times 100$$

v Imagerie macroscopique par autofluorescence UV-VIS

Principe de la technique

Les doubles liaisons conjuguées des groupements phénols présents dans les lignines et les acides hydroxycinnamiques (AHC, acides férulique et *p*-coumarique principalement) sont à l'origine de l'autofluorescence des tissus dans les plantes lignocellulosiques [227,248,249]. Cette fluorescence peut être mise à profit pour imager la biomasse à une échelle macroscopique comme c'est le cas avec un microscope à autofluorescence. La nature des composés phénoliques, leurs proportions relatives variables se traduit par des réponses variables des tissus aux différentes conditions d'excitation. Ces réponses peuvent être exploitées pour différencier les tissus. Les AHC présentent une forte fluorescence bleue par excitation UV [250], et sont présents sur les hémicelluloses et la lignine [226,251]. Cela permet d'expliquer pourquoi il existe une grande fluorescence provenant du parenchyme de moelle, alors que celui-ci est peu lignifié. La lignine répond dans le rouge et vert, par excitation dans le bleu notamment. L'imagerie en fluorescence présente l'intérêt de pouvoir acquérir facilement et rapidement des images plein champ des échantillons avec différents choix de résolutions spatiales et de champs de vue selon l'équipement retenu. L'analyse multivariée est de grand intérêt pour ces données multispectrales, aussi a-t-elle été utilisée dans le cadre de cette thèse, principalement en raisonnant sur les profils moyens de fluorescence, sans discrimination spatiale.

Acquisitions

La préparation retenue consiste en la réalisation de pastilles obtenues par pressage. Si cette préparation fait perdre légèrement l'origine tissulaire des profils de fluorescence, elle améliore cependant largement la statistique globale des échantillons, évite le problème de la présence d'un fond, et présente une bonne planéité qui permet d'avoir une netteté sur une grande surface (et de ce fait les acquisitions réalisées sont des mosaïques de 3 champs de vue).

Les images ont été acquises avec un système d'imagerie multizoom AZ100M de Nikon© (Japon) ou microscope équipé de 4 cubes de filtres permettant de sélectionner 4 plages d'excitation différentes. Ces filtres contiennent également un miroir dichroïque qui ne reflète que des longueurs d'onde plus grandes que celles servant à l'excitation de sorte que seule la fluorescence émise ne soit collectée. Les quatre filtres ont les propriétés suivantes :

- 327–353 nm (UVA-340 nm), avec un miroir dichroïque > 380 nm, émission > 364 nm
- 325–375 nm (UVB-370 nm), avec un miroir dichroïque >400 nm, émission > 420 nm.
- 461–489 nm (BL-488), avec un miroir dichroïque > 500 nm, émission > 515 nm.
- 510–560 nm (VE-543), avec un miroir dichroïque > 565 nm, émission > 590 nm.

La source lumineuse est une lampe à la vapeur de mercure Intensilight C-HGFIE (Nikon, Japon). La caméra monochrome Q imaging EXI Aqua microscopy est équipée d'une roue de filtres RGB-HM-S-IR, permettant de récupérer le signal de fluorescence dans trois canaux d'émission (bleu, vert, rouge). Le

grandissement est de 4, en combinant un objectif X2 (lentille AZPlan Fluor 2X, NA : 0.2/WD : 45 mm) avec un zoom optique de 2. La taille du pixel est de 2,51 μm .

L'analyse de chaque échantillon est réalisée sur les deux faces de deux pastilles, soit 4 acquisitions de mosaïques à 12 canaux. Les conditions d'acquisition d'analyse sont précisées dans le Tableau 13. Ces conditions permettent d'obtenir un signal mesurable pour les échantillons les moins fluorescents, sans pour autant obtenir une saturation pour les échantillons les plus fluorescents.

Tableau 13 : Conditions d'analyses par macrofluorescence UV-VIS

	Plage d'excitation											
	UVA-340 nm			UVB-370 nm			BLEU-488 nm			VERT-543 nm		
	Canal d'émission											
	Bleu	Vert	Rouge	Bleu	Vert	Rouge	Bleu	Vert	Rouge	Bleu	Vert	Rouge
Temps d'exposition équivalent	1373 ms			343 ms			137 ms			103 ms		

Pour chaque champ de vue, les données acquises se présentent alors sous forme d'une image multispectrale, c'est-à-dire en empilement de 4 images couleurs (RVB), représentatives de chacune des excitations. Pour représenter directement l'image multispectrale sans avoir à représenter les 4 images ou les 12 canaux, les différentes contributions dans les 4 excitations peuvent être sommées. La fluorescence bleue ne pouvant être présente aux excitations bleue et vertes, de même que la fluorescence verte en excitation verte, on norme les contributions de chacun des 3 canaux de couleur, de la façon suivante : la somme du canal bleu est divisée par 2 (l'émission bleue n'est possible que pour 2 des 4 excitations), la somme du canal vert est divisée par 3 (l'émission verte n'est possible que pour 3 des 4 excitations), et la somme du canal rouge est divisée par 4 (l'émission rouge est possible pour les 4 excitations). Il s'agit simplement de mettre à un niveau d'intensité comparable les différents canaux, dans un simple but de représentation. On donne un exemple de représentation d'une image avec superposition des contributions des 4 excitations en Figure 36.



Figure 36 : Image de fluorescence d'une pastille de paille native en sommant pour chaque excitation les signaux de fluorescence obtenus par les 4 filtres, canal par canal

Traitement des images d'autofluorescence UV-VIS multispectrales

Des régions ont tout d'abord été sélectionnées dans les images mosaïques multispectrales *via* le logiciel ImageJ, pour éliminer les zones en dehors de la pastille à analyser.

Ensuite, la moyenne d'intensité de fluorescence a été calculée pour chaque image de chaque canal, pour constituer ce que nous pouvons appeler un profil ou "pseudo-spectre" de fluorescence. Un profil d'une mosaïque de paille native est montré en exemple en Figure 37.

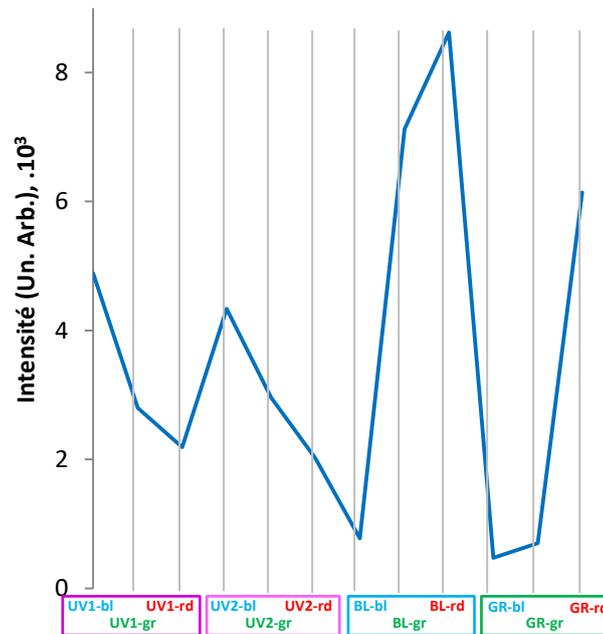


Figure 37 : Profil moyen de fluorescence de l'image multispectrale de l'acquisition de la fluorescence de la pastille de paille native

Ainsi, pour chaque face de pastille analysée, un profil moyen de fluorescence est calculé, comprenant 12 valeurs.

Une Analyse en Composantes Principales centrée a ensuite été lancée sur Matlab, sans prétraitement particulier des données, pour trier les échantillons sur la base de leurs pseudo-spectres de fluorescence. Chaque échantillon est caractérisé par quatre pseudo-spectres d'auto fluorescence, provenant des moyennes des quatre faces analysées (deux pastilles sont préparées par échantillon).

e. Imagerie dynamique de dégradation enzymatique par microscopie à fluorescence dans l'UV profond

Le but de ces expérimentations consistait à étudier à l'échelle microscopique la dégradation en temps réel de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique, à travers l'utilisation d'un équipement microscopique qui permet d'imager à la fois les parois et les enzymes, de manière distincte. Pour ce faire, une préparation microscopique de biomasse est mise en dégradation enzymatique et observée au microscope pour suivre la localisation des enzymes et la structure de la biomasse pendant la saccharification. La ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL permet de réaliser de telles expérimentations, par l'intermédiaire du microscope TELEMOS à autofluorescence UV. Il est alors possible de faire de l'imagerie de plein champ des parois et des protéines (dans notre cas, les enzymes cellulolytiques), par l'utilisation de filtres spécifiques, sans avoir à réaliser de marquages spécifiques.

i Le rayonnement synchrotron

Principe

Dans un synchrotron, des électrons sont générés, accélérés, et déviés par la présence de champs magnétiques. L'accélération provoque l'émission du rayonnement qui est utilisé pour les analyses. En effet, la déviation des électrons met en jeu le phénomène de rayonnement continu de freinage (*Bremsstrahlung*), qui a la particularité de présenter un large spectre et continu, d'où la possibilité de choisir précisément la longueur d'onde de rayonnement (i.e. source accordable en énergie de la source de photons), ce qui constitue un des avantages principaux du rayonnement synchrotron.

Le synchrotron SOLEIL

Le synchrotron SOLEIL est un synchrotron de 3^{ème} génération (synchrotron utilisé comme source de rayonnement photonique allant de l'infrarouge aux rayons X durs), avec un anneau de stockage d'électrons de 354 mètres de circonférence. Il contient 29 lignes de lumière qui sont présentement utilisables. La réinjection en électrons se réalise périodiquement. Les trois principaux composants sont le LINAC (pour LINear ACcelerator) qui produit les électrons et leur donne une première accélération, le booster qui termine l'accélération des électrons, et l'anneau de stockage qui permet la circulation à vitesse relativiste des électrons, et leur déviation pour créer les flux électromagnétiques nécessaires aux lignes de lumière.

ii Imagerie de fluorescence sur la ligne DISCO (Dichroism, Imaging, mass Spectrometry for Chemistry and biOlogy)

La ligne utilisée est constituée du système optique suivant : le faisceau blanc arrive en début de ligne, et est dirigé vers une chambre à 2 miroirs (Figure 38) qui permettent de focaliser et mettre en forme le faisceau vers l'entrée d'un monochromateur.

Ce monochromateur est de type Czerny-Turner (Figure 39), il permet de ne sélectionner qu'une seule longueur d'onde (1 à 20 eV, i.e. 60 à 700 nm) par l'intermédiaire d'une fente d'entrée, d'un premier miroir qui rend le faisceau parallèle, d'un réseau de diffraction, d'un deuxième miroir qui focalise le rayon diffracté sur la fente de sortie. La sélection de la longueur d'onde s'effectue par la rotation du réseau, qui déplace la position du faisceau au niveau du second miroir et donc aussi au niveau de la fente de sortie.

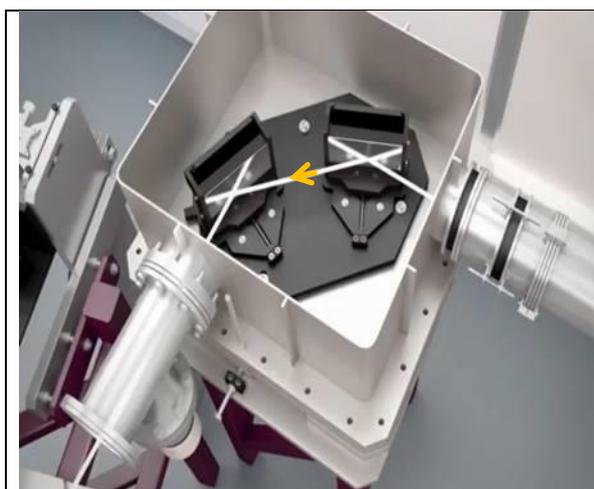


Figure 38 : Vue d'artiste de la chambre de miroirs. Image issue de la vidéo de présentation de la ligne DISCO, [252]



Figure 39 : Vue d'artiste du monochromateur. Image issue de la vidéo de présentation de la ligne de lumière DISCO [252]

Le faisceau est ensuite envoyé vers le microscope TELEMOS grâce à un jeu de miroir. A l'aide d'un système de lentilles, la forme et la taille du faisceau est légèrement ajustable avant l'entrée du faisceau au niveau du microscope. Le faisceau est réfléchi par un miroir dichroïque orienté à 45° par rapport au faisceau incident (Figure 40). Le faisceau réfléchi traverse l'objectif, puis rencontre et excite l'échantillon qui en retour se désexcite sous forme de fluorescence. La fluorescence émise en direction de l'objectif traverse alors le miroir dichroïque sans être réfléchi. Par un miroir, le rayon de fluorescence est envoyé à travers les filtres qui permettent de sélectionner la plage de fluorescence à imager. Le signal est finalement récupéré par la caméra CCD.

Il s'agit ainsi d'une imagerie de type plein champ, multispectrale, et utilisée dans notre cas pour réaliser les mosaïques.

Le microscope TELEMOS est un microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss GmbH, Allemagne) modifié. Il est équipé de 4 objectifs. Dans les expérimentations présentées dans ce manuscrit, seul l'objectif X10 a été utilisé, pour des raisons de représentativité d'échantillon. La longueur d'onde d'excitation UV a été

choisie à 275 nm pour pouvoir exciter à la fois les enzymes et la fluorescence résiduelle des parois. Pour récupérer exclusivement la fluorescence, un miroir dichroïque (Omega Optical Inc., EUA) permet de récupérer les longueurs d'onde supérieures à 300 nm. Les plages de longueurs d'onde quant à elles, sont sélectionnées *via* l'utilisation de deux filtres passe-bandes. Un premier filtre (Semrock, Rochester, EUA) laisse passer les émissions de 327 à 353 nm, ce qui permet de récupérer la fluorescence issue des protéines (donc ici des enzymes), notamment par les fluorophores présents que sont les acides aminés comme le tryptophane et la tyrosine. Un deuxième filtre (Semrock, Rochester, EUA) laisse passer la plage émise entre 420 et 480 nm, ce qui permet d'imager la fluorescence des parois par les composés phénoliques présents (acides hydroxycinnamiques et unités phénylpropanes de la lignine). L'imagerie de fond clair est réalisée en transmission, par un éclairage réalisé par une lampe mercure. La caméra utilisée est une caméra CCD (*Charge-Couple Device*) rétroéclairée (Pixis BUV, Princeton Instrument, EUA) de 1024 x 1024 pixels², et code l'intensité lumineuse sur 65536 niveaux de gris.

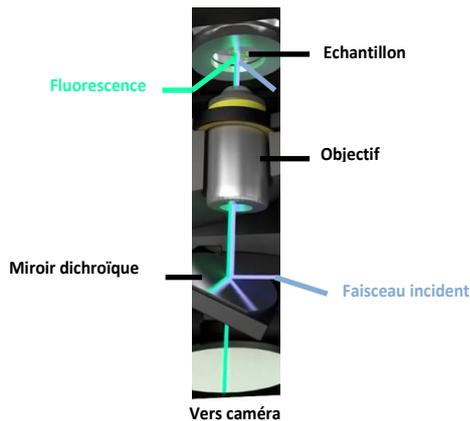


Figure 40 : Représentation du chemin optique au niveau du triplet miroir dichroïque, objectif, échantillon. Adapté d'images de la vidéo de présentation de la ligne de lumière DISCO

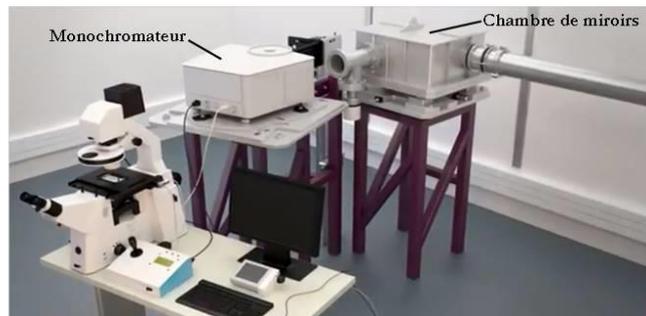


Figure 41 : vue d'ensemble de la ligne de lumière au niveau du microscope TELEMOS. Image issue de la vidéo de présentation de la ligne de lumière DISCO

iii Protocole de préparation des coupes en cryo-microtomie

Pour observer les particules de biomasse, il était d'abord nécessaire de les découper de manière propre, pour obtenir des images de qualité. La préparation retenue est un système de cryo-microtomie : la biomasse est introduite dans une goutte d'eau qui est ensuite congelée rapidement, ce qui fige aussi les particules de biomasse. La goutte est ensuite coupée, puis la coupe est déposée sur une lamelle. Une fois l'eau évaporée, seules les particules sont présentes, collées à la lamelle :

- Un mélange de 30 mg de biomasse sèche et 1 mL d'eau distillée est préparé ;
- Une goutte du mélange est prélevée et déposée sur un support à -20 °C pour la congeler ;
- Une fois la goutte à l'état congelé, elle est placée dans le cryotome.

Pour obtenir un échantillon représentatif avec suffisamment de particules, trois coupes de 20 µm sont superposées. Pour ne pas avoir plusieurs fois le même motif et éviter de sélectionner certaines particules par une possible sédimentation, les trois coupes sont prises à trois profondeurs distinctes (voir Figure 42 ci-dessous). Afin d'être observées en fluorescence dans l'UV lointain, les coupes ont été déposées sur des lamelles de quartz transparentes pour les UV (de diamètre 25 mm, d'Esco Optics).

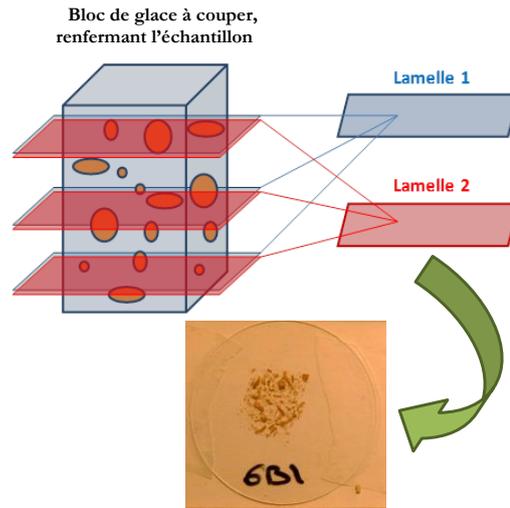


Figure 42 : Coupe en cryo-microtomie déposée sur un lamelle de quartz.

iv Prévisualisation au microscope à autofluorescence UV-VIS

Pour chaque échantillon, une vingtaine de coupes sont réalisées, issues de trois blocs de glace différents. Les coupes obtenues ont été observées et cartographiées grâce au microscope utilisé en fond clair à des fins de visualisation pour choisir les coupes à étudier.

Pour chaque coupe, une zone d'intérêt est définie sur la base de différents critères (qualité de la coupe, nature longitudinale ou transversale de la coupe, tissus présents), dans le but d'obtenir sur chaque série de coupes issues de chaque bloc coupé, des zones complémentaires en termes de tissus et d'orientation de coupe (transversale ou longitudinale). Pour chaque échantillon, 3 coupes différentes ont pu être analysées.

Je montre en Figure 33 une coupe d'échantillon avec les dimensions du cadre d'hybridation (ou *spacer*, in-situ gene frame 25 μ L Dutscher), délimitant un volume dessiné en bleu, et en rouge la délimitation d'une région d'intérêt. Le cadre d'hybridation est un adhésif qui définit par son contour fermé (de dimensions internes 10X10X0,25 mm³ soit un volume de 250 μ L) qui sera le siège de l'hydrolyse enzymatique. Pour chaque échantillon, la plus grande diversité possible de tissus est recherchée pour définir les zones d'intérêt.

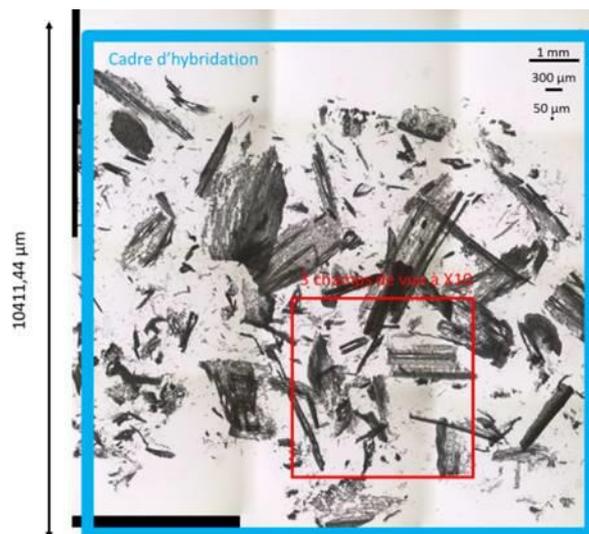


Figure 43 : Coupe cryocoupe observée par macrofluorescence imagerie de type fond clair

v Dégradation enzymatique des coupes

La purification du cocktail enzymatique

Les cocktails stockés à 4 °C sont préparés en amont des expérimentations. Chacun des deux cocktails subit une étape de purification afin d'enlever les sels et adjuvants, dont certaines espèces présentent une fluorescence non désirée. Cette étape est réalisée par l'utilisation d'une colonne de type *Hi-trap desalting* (GE Healthcare) contenant une matrice Sephadex (G25 : *cross linked dextran*) qui permet de séparer des molécules telles que des protéines d'un côté (5 000 à 100 000 g/mol) et des molécules plus petites de l'autres (sels, et sucres par exemple). Cette étape induit une dilution d'un facteur 10. Une fois purifiés, les cocktails sont congelés pour pouvoir être stockés potentiellement sur une longue période. En effet, en l'absence des adjuvants, la durée de conservation des cocktails est largement réduite. En contrepartie, la congélation provoque une petite perte d'activité enzymatique.

La préparation des cocktails enzymatiques

Un mélange des cocktails GC220 et N188 est préparé avec une proportion relative de 26 % vol de GC220, et de 74 % vol de N188, ceci afin de conserver le ratio des cocktails enzymatiques utilisés en hydrolyse standard (à défaut de pouvoir conserver le ratio entre la charge enzymatique et le taux de cellulose, de même que le ratio entre la charge enzymatique et la proportion de liquide). Ce mélange est dilué 25 fois et est maintenu au frais jusqu'au début de l'hydrolyse. En termes de ratio charge enzymatique sur quantité de substrat, il est impossible de le déterminer précisément par le fait que l'on ne peut mesurer le poids d'une coupe cryo-microtome. Cependant, par le fait qu'un bloc de préparation (composé de 30 mg de substrat) sert à la réalisation de 20 coupes, et en supposant que pour ces 20 coupes, 1/3 du matériel lignocellulosique est déposé sur ces coupes et est accessible pour une cinétique de dégradation (substrat de la coupe rentrant dans les dimensions du cadre d'hybridation), on a 0,2 % pds de substrat dans le milieu réactionnel. Pour comparaison, lors d'une hydrolyse standard, la concentration en substrat varie de 1,7 à 2,3 % pds dépendamment de la concentration en cellulose du substrat mis en dégradation, ce qui induit une quantité d'enzyme par gramme de substrat environ 30 fois moins importante que pour les hydrolyses réalisées dans le cadre des expérimentations au synchrotron. En termes de concentration en enzymes dans le milieu réactionnel, la concentration introduite lors des expérimentations est estimée à 0,2 g de protéine de cocktail GC220 par litre de mélange réactionnel, contre 0,5(5) g de protéine de cocktail N188 par litre de mélange réactionnel, ce qui est 3,2 fois plus concentré que dans une hydrolyse standard.

Montage d'une cellule pour l'imagerie dynamique de la dégradation enzymatique

Le montage de la cellule de dégradation se base sur des expérimentations préalables du même type, réalisées sur des coupes transversales de tiges de maïs [239]. Un cadre d'hybridation est placé sur la lamelle en quartz, de sorte que la cryo-coupe soit au milieu du cadre. Le cocktail enzymatique est agité puis à l'aide d'une pipette, une goutte de 25 µL est déposée au centre du volume défini par le cadre. Une deuxième lamelle est finalement déposée au-dessus de la première, afin de fixer la préparation et pouvoir observer l'ensemble sous le microscope. L'ensemble est alors placé sur une platine chauffante, maintenue à 45 °C pour maximiser l'activité enzymatique du cocktail. La Figure 44 présente le montage de l'échantillon avant qu'il ne soit placé sur la platine chauffante et la Figure 45 montre l'ensemble monté sur la platine chauffante.

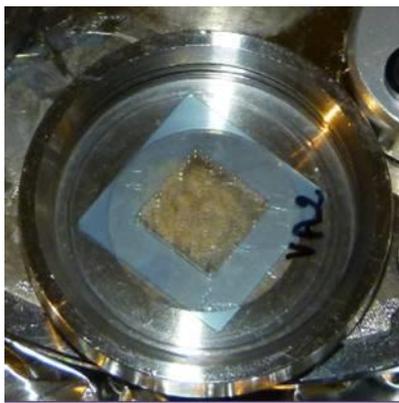


Figure 44 : Photographie de la préparation juste après le dépôt de la goutte et de la deuxième lamelle de quartz

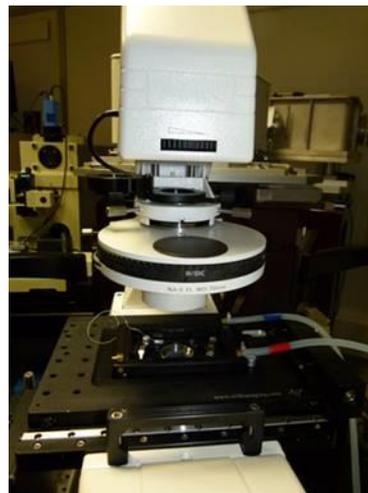


Figure 45 : Photographie de la platine chauffante fixée sur le microscope

Il faut bien noter que le système particules/enzymes n'est pas agité dans ce type d'expérimentation, ce qui est significativement différent des essais d'hydrolyse enzymatique standards pratiqués en bécher. Ainsi, il sera difficile de comparer les cinétiques d'hydrolyses entre les deux.

Suivi de la dégradation

Trois cinétiques de 2h35 de dégradation ont été suivies au microscope. Des conditions d'hydrolyse et d'acquisition (excepté les temps d'exposition) similaires pour chacun des quatre échantillons. Pour chaque échantillon, les trois coupes observées proviennent des trois blocs de glace, afin d'être sûr de d'analyser uniquement du contenu nouveau.

vi Acquisition des images au microscope TELEMOS

Avant de réaliser la première cinétique, le faisceau est réaligné, la forme du faisceau optimisée, les temps d'expositions déterminés de manière appropriée, et plus généralement la trame d'acquisition est mise en place : types de filtre, ordre d'acquisition au sein de la mosaïque, laps de temps entre la prise de deux séries, définition de la région d'intérêt (ou ROI, *Region Of Interest*) et préréglage du plan de focalisation pour chaque canal.

Trois canaux d'acquisition sont utilisés :

- Un canal utilisant un filtre passe-bande pour l'émission de fluorescence sur la plage 327-353 nm, spécifique à la fluorescence des acides aminés des enzymes
- Un canal utilisant un filtre passe-bande pour l'émission de fluorescence sur la plage 420-480 nm, spécifique à la fluorescence des parois
- Un canal sans filtre par observation en transmission dans le visible, avec une excitation par une lampe à la vapeur de mercure (imagerie de type fond clair)

Lors d'un alignement de faisceau, le ROI est défini, ce qui détermine la taille de l'image individuelle. Avec un objectif X10, la taille du pixel était de 1,046 μm .

Ensuite, les paramètres d'acquisition sont définis à travers l'interface Micro-Manager d'ImageJ:

- le temps d'acquisition : 15 s en fluorescence enzyme, 2 s pour la fluorescence paroi, et 100 ms pour l'observation en fond clair.

- Le plan de focalisation est réglé au cas par cas et un décalage pour le canal de la fluorescence des parois est appliqué, de l'ordre de $-50\ \mu\text{m}$.

Une fois la préparation prête et placée sur la platine chauffante, la coupe est imagée en mode fond clair *via* l'observation en mosaïques, afin de retrouver rapidement la zone d'analyse choisie.

Par la durée de l'acquisition totale pour une mosaïque de 6X6 images individuelles, qui est de 753 s, il a été choisi de ne pas laisser de laps de temps entre deux acquisitions.

Avec 12 acquisitions par cinétique, le suivi de la saccharification est fait sur une durée totale de 2,35 h (8459 s). Les coupes sont aussi ré-analysées après environ 6h de dégradation, durée pendant laquelle l'échantillon est placé sur une platine chauffante. Une seule mosaïque multispectrale est réalisée après s'être placé approximativement sur la même zone d'observation qu'auparavant, dans le but d'avoir un dernier point d'observation après une durée plus conséquente.

Des acquisitions de références sont aussi faites et serviront pour la correction des images :

- La première est l'acquisition du fond noir, ou bruit caméra, en l'absence d'éclairage.
- La deuxième est un fond blanc sur des enzymes seules, pour connaître l'évolution de la fluorescence des enzymes, en l'absence de saccharification, et faire la distinction entre la baisse de fluorescence témoignant du photoblanchiment (*photobleaching*) occasionné par l'irradiation. A cette occasion on y peut définir un premier ROI.
- La troisième est l'analyse d'une coupe de biomasse dans de l'eau et en l'absence d'enzymes, afin notamment de s'assurer de l'absence de fluorescence avec le filtre sélectionnant la fluorescence des enzymes.

vii Traitement d'images DISCO

Afin de pouvoir réaliser des mesures d'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence, les images ont dû être prétraitées. Les prétraitements ont été réalisés sous Matlab 2017 en utilisant des fonctions spécifiques développées à l'INRA de Nantes. L'objectif était de corriger au mieux les artefacts d'acquisitions et rendre comparables les acquisitions. Les différents effets à corriger étaient les suivants : le bruit de fond lié à la caméra (signal résiduel, sans éclairage), la non-uniformité de l'éclairage lié à la forme du faisceau synchrotron, la construction des images mosaïques. L'analyse des images a été réalisée de manière qualitative en réalisant et commentant des films d'évolution de l'échantillon au cours du temps. A partir des images mosaïques et des films, des particules ou des régions dans les particules ont été sélectionnées pour effectuer des mesures d'intensité et établir des profils d'évolution de particules au cours du temps.

Les particules ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- Pour chaque échantillon, on souhaite analyser les tissus communément trouvés dans la paille de blé, avec un nombre de mesures suffisant
- Avoir pour chaque tissu et chaque échantillon, des répétitions faites sur des coupes transversales et longitudinales
- La particule imagée est nette, et permet l'identification des tissus
- La zone analysée présente pas d'artéfact, bulle ou pollution

Pour chaque type de tissu considéré, un objectif minimal de 5 mesures est fixé, pour chaque échantillon. Les images sont légèrement découpées, pour éviter certains effets de bord lors des corrections d'image.

Prétraitement des images

On cherche d'abord à soustraire de l'image brute, l'image du fond de la caméra, qui est le bruit acquis en l'absence d'illumination. Par ailleurs, il existe une inhomogénéité spatiale de l'éclairage (ou

d'illumination), il faut donc ensuite corriger cette image par l'intensité d'illumination (dont on aura auparavant aussi soustrait l'intensité de fond de la caméra). L'image corrigée vaut donc :

$$I_{\text{corrigée}} = \frac{I_{\text{brute}} - I_{\text{fond caméra}}}{I_{\text{illumination}} - I_{\text{fond caméra}}}$$

L'inhomogénéité du fond de caméra ne dépend, par définition, que de la caméra. En revanche, l'inhomogénéité d'éclairage dépend du plan focal et de l'alignement du faisceau, elle peut donc varier au cours d'une session d'acquisition. De ce fait, pour prétraiter les images, il va falloir estimer un image de fond de la caméra d'une part, et chercher le plan focal image d'illumination qui correspond au plan focal de l'échantillon.

Image de fond liée à la caméra :

La première correction à réaliser est une soustraction du fond lié à la caméra, qui est le bruit résiduel de celle-ci en l'absence d'éclairage. Pour ce faire, une acquisition de fonds noirs a été faite pendant le temps de faisceau, en balayant la profondeur afin de s'assurer de l'indépendance du bruit caméra des paramètres de positionnement.

Trois lignes et colonnes de pixels ont été supprimées sur le tour des images de fond pour éliminer les pixels morts de la caméra. Les images obtenues ont été lissées par l'application de deux filtrages :

- filtrage médian (de diamètre 9 je crois pixels) pour enlever les grandes variations d'intensité liées à la présence des rayons cosmiques (*spikes*),
- Filtrage moyen (diamètre local de 9 pixels).

La variation de fond ne dépendant pas de la profondeur en z, l'image finale a été obtenue comme la moyenne des images lissées des tous les plans.

Ce fond noir modèle est représenté en Figure 46 avec les contrastes qui rendent compte de la variabilité spatiale du fond. Les intensités variaient entre 699 et 732 et dépendait de la localisation dans l'images,

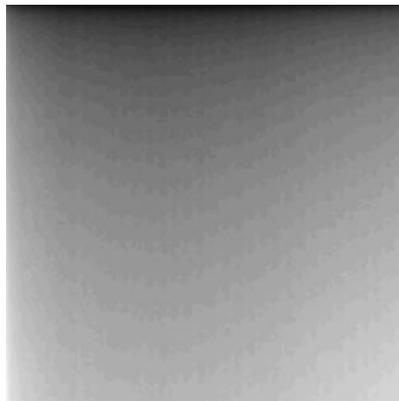


Figure 46 : Fond lié à la caméra modélisé, dont les contrastes sont ici adaptés pour montrer la variabilité spatiale du fond.

Recherche du fond blanc de fluorescence :

Le second biais instrumental à prendre en compte pour l'analyse des données est la forme de l'éclairage, c'est-à-dire l'image d'un faisceau au niveau de la caméra pour les images de fluorescence. Cette image dépend du faisceau en lui-même et du plan focal. Ainsi, une acquisition par jour de blancs d'enzymes avait été faite, en balayant la profondeur par pas régulier. Ces blancs sont ensuite lissés (moyenne, de diamètre 9 pixels), afin de s'affranchir des possibles pollutions de fond (particules résiduelles notamment). Deux tranches de l'empilement des blancs acquis et lissés, sont montrées en Figure 47 à titre d'exemple. Ces blancs ne concerneront pas les images de type fond clair, qui n'utilisent pas le rayonnement synchrotron pour l'imagerie.

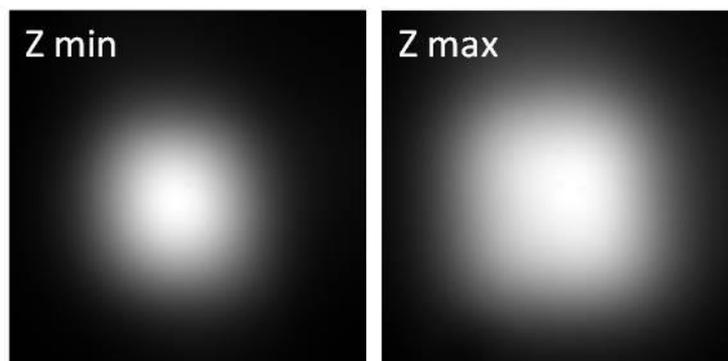


Figure 47 : Première image (gauche) et dernière image (droite) de fonds blancs, parmi les différents fonds acquis à des profondeurs de focalisation différentes.

Pour chaque acquisition, l'image de l'illumination qui correspond à la forme de l'éclairage de l'échantillon a été recherchée en même temps que la position exacte de la ROI d'acquisition.

Pour ce faire, l'estimation de la forme de l'illumination est d'abord réalisée à partir des images de l'échantillon dans lesquelles peu d'objets sont observés. Sur la base d'une sélection semi-manuelle d'images de l'échantillon, l'illumination est modélisée en considérant pour chaque pixel, l'intensité maximale. L'image est ensuite lissée par ouverture, fermeture et lissage moyen de taille 55 pixels. Les tailles de lissage ont pu être adaptées au cas par cas, par contrôle visuel afin d'éliminer les particules claires ou sombres résiduelles. La Figure 48 montre un exemple de fond reconstitué (Figure 48, image de droite) à partir des maxima en intensité de la sélection d'images (Figure 48, image de gauche) de la série d'images de d'une coupe de l'échantillon A020C (au temps initial).

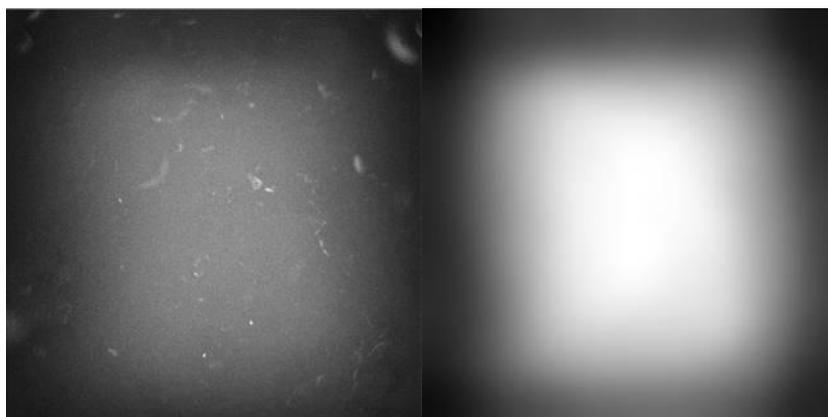


Figure 48 : A gauche, image reconstituée à partir d'une sélection pertinente d'images issue de la série d'images à corriger, en sélectionnant pour chaque pixel, le maximum en intensité obtenu sur les différentes images sélectionnées ; à droite, le fond blanc modélisé sur la base de l'image de gauche. Les contrastes ne sont pas comparables entre eux.

Enfin, l'illumination de référence est recherchée grâce à une corrélation croisée entre l'image estimée et l'ensemble des plans en Z de l'illumination mesurée. La corrélation croisée permet également de déterminer la position de la ROI d'acquisition dans l'image d'illumination et pour le fond lié à la caméra. Le plan qui donne le meilleur coefficient de corrélation est sélectionné comme image d'illumination de référence pour la série d'images.

Image de l'illumination des images fond clair :

Dans le cas des images fond blanc, la lumière ne vient pas du synchrotron et une nouvelle image d'illumination doit être déterminée. Pour cela, le maximum de chaque pixel des images de chaque champ de vue de l'acquisition est récupéré pour reconstituer une image de l'illumination. La densité de particule n'étant pas très importante, il est statistiquement probable que sur la totalité des images considérées (36) il existe pour chaque pixel au moins une image telle qu'il n'y ait pas de particule et que le fond soit observé.

L'image finale est lissée par filtrage moyen de taille 9 pixels. La Figure 49 montre le fond blanc reconstitué, pour une série d'image de type fond clair. On constate à la fois une inhomogénéité d'éclairage, et la présence de quelques pollutions, rendant cette correction nécessaire.

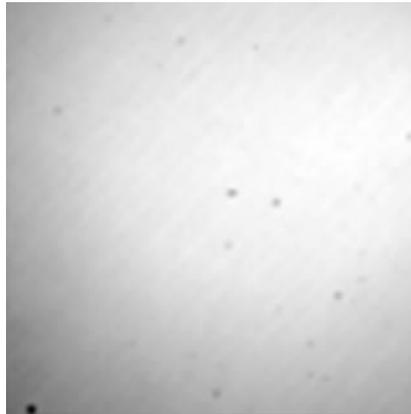


Figure 49 : Fond blanc d'imagerie de type fond clair, reconstitué en considérant pour chaque pixel le maximum d'intensité des différentes images de la série

Correction des séries d'images brutes individuelles :

Les images individuelles découpées sont d'abord corrigées du fond noir de référence (opération de soustraction).

Ensuite, pour ce qui est des images de fluorescence, l'image est corrigée de la forme de l'éclairage, par l'image de fond blanc de référence (opération de division donc) elle-même corrigée du fond noir, et normalisée par l'intensité maximale du fond.

L'intensité de chaque pixel dans chaque image individuelle de fluorescence est finalement corrigé par :

$$I_{corr} = \frac{I_{brute} - I_{fond\ caméra}}{\left(\frac{I_{illumintaion} - I_{fond\ caméra}}{\max(I_{illumintaion}) - I_{fond\ caméra}} \right)}$$

Avec I_{brute} l'intensité de départ du pixel, $I_{fond\ caméra}$ l'intensité du fond noir de la caméra à la position équivalente du pixel considéré dans l'image à corriger, et $I_{illumintaion}$ l'intensité de l'illumination à la position équivalente du pixel considéré dans l'image à corriger.

Pour les images fond clair, on procède de la même manière, mais en se servant de l'illumination déterminée pour les acquisitions de type fond clair. On montre en Figure 50 deux images individuelles corrigées et de la même zone d'observation, l'une en fluorescence de l'enzyme, l'autre en imagerie fond clair, en montrant les images brutes correspondantes.

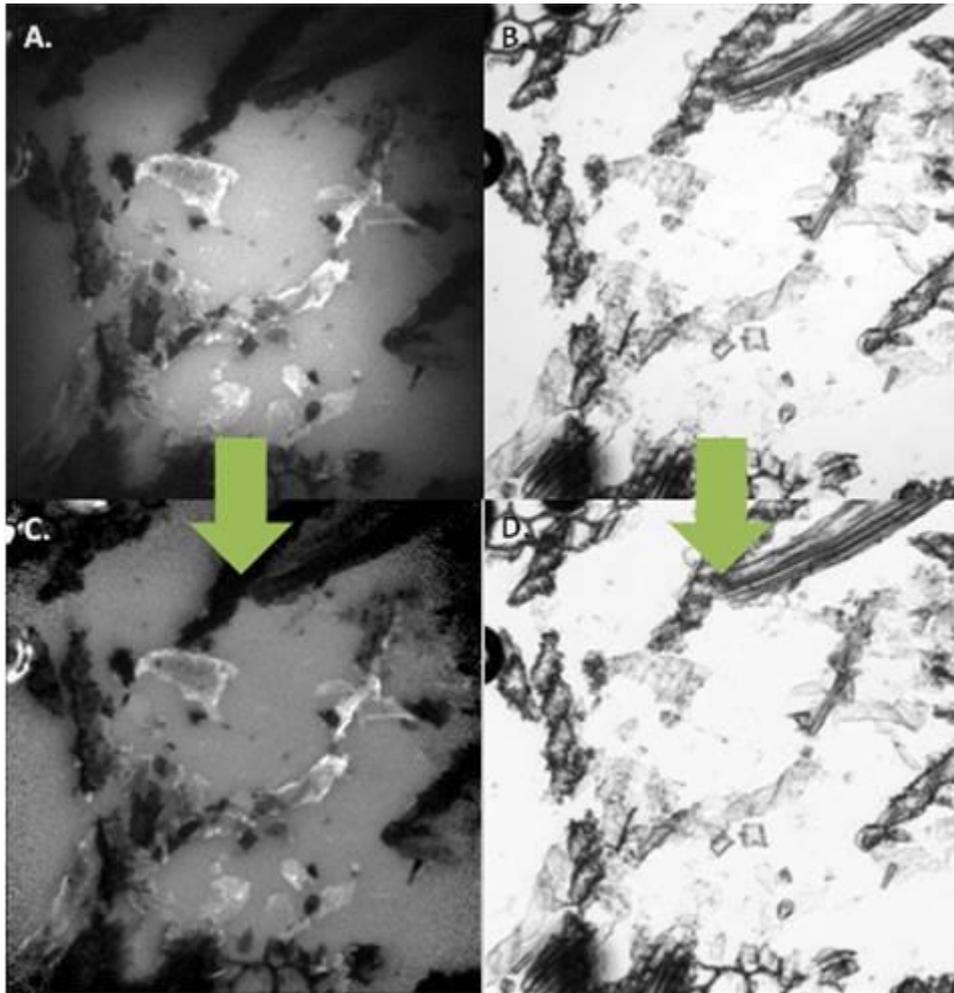


Figure 50 : Exemple de correction d'une image multispectrale individuelle. A gauche, images de fluorescence d'enzymes ; à droite imagerie de type fond clair ; en haut, images brutes ; en bas, images corrigées

Reconstitution des mosaïques temporelles, canal par canal :

Un script dédié codé sur Matlab permet de recoller les images individuelles pour chacun des temps d'observation de la dégradation enzymatique, et pour chacun des trois canaux. Ensuite, sur ImageJ, les mosaïques sont assemblées temporellement (empilement de mosaïques), canal par canal. Ce sont ces images finales qui sont utilisées pour l'analyse des données de ces expérimentations, par la mesure de profils temporels d'intensité, en des zones définies.

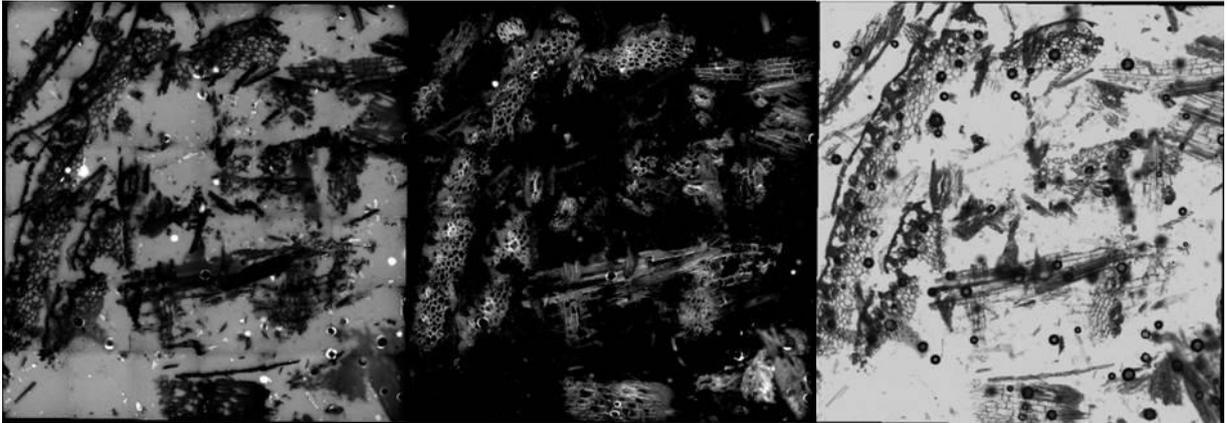


Figure 51 : Première mosaïque de la coupe cryo-micro-tome A020C observée en dégradation enzymatique, dans les canaux de fluorescence d'enzyme (à gauche), de paroi (au centre), et mode fond clair (à droite)

viii Les mesures

Les mesures effectuées sont des profils temporels d'intensité dans les différents canaux. Ils sont récupérés à partir d'ImageJ, en sélectionnant manuellement des zones d'intérêt sur les empilements d'images du canal en question. Il est important de noter qu'il existe un léger décalage spatial entre les différents canaux. En l'occurrence, pour un pixel choisi dans le canal de fluorescence d'enzymes, son pixel équivalent dans le canal de fluorescence de paroi est situé 4 pixels à gauche, et 2 pixels plus bas. Pour l'image fond clair, ce pixel est situé 5 pixels sur la gauche, et 1 pixel plus bas. A l'échelle des fonds de référence, ce décalage n'est pas suffisant pour avoir à reconsidérer la définition des ROI sur ces fonds. Cependant, pour ce qui est de la mesure de profils quasi ponctuels ou linéaires, il est important de le prendre en compte.

Plusieurs objets sont définis, sur la base de différents critères : orientation de la coupe (longitudinale ou transversale, lorsque la particule est reconnaissable), tissu, taille de la particule, morphologie non structurée (la structure cellulaire n'est alors plus reconnaissable), etc. Pour chaque objet défini, un objectif de 5 mesures est donné, afin d'essayer de garantir une représentativité des mesures vis-à-vis des profils mesurés des différents objets, par une reproduction de la mesure en différents endroits. Les objets considérés dans cette étude sont définis dans le chapitre 6 "Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique". On montre en Figure 52 un exemple de profil temporel de fluorescence d'enzymes, associé à une zone sélectionnée.

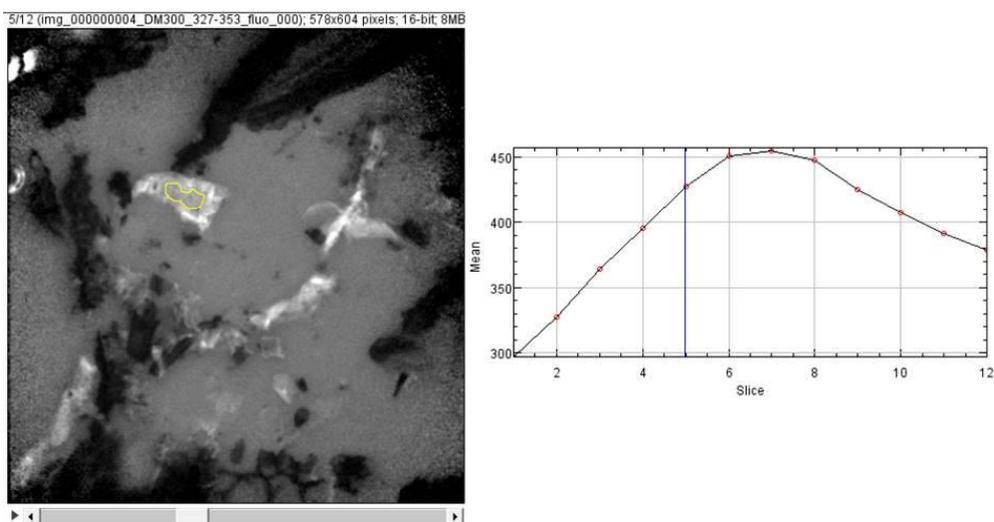


Figure 52 : A gauche, image de fluorescence d'enzymes ; à droite, profil temporel d'intensité de fluorescence associé à la zone délimitée en jaune

2. Les échantillons de l'étude

Les différentes études de la thèse ont nécessité la production de différentes pailles prétraitées. La Figure 53 illustre comment les échantillons ont été produits pour les différentes études.

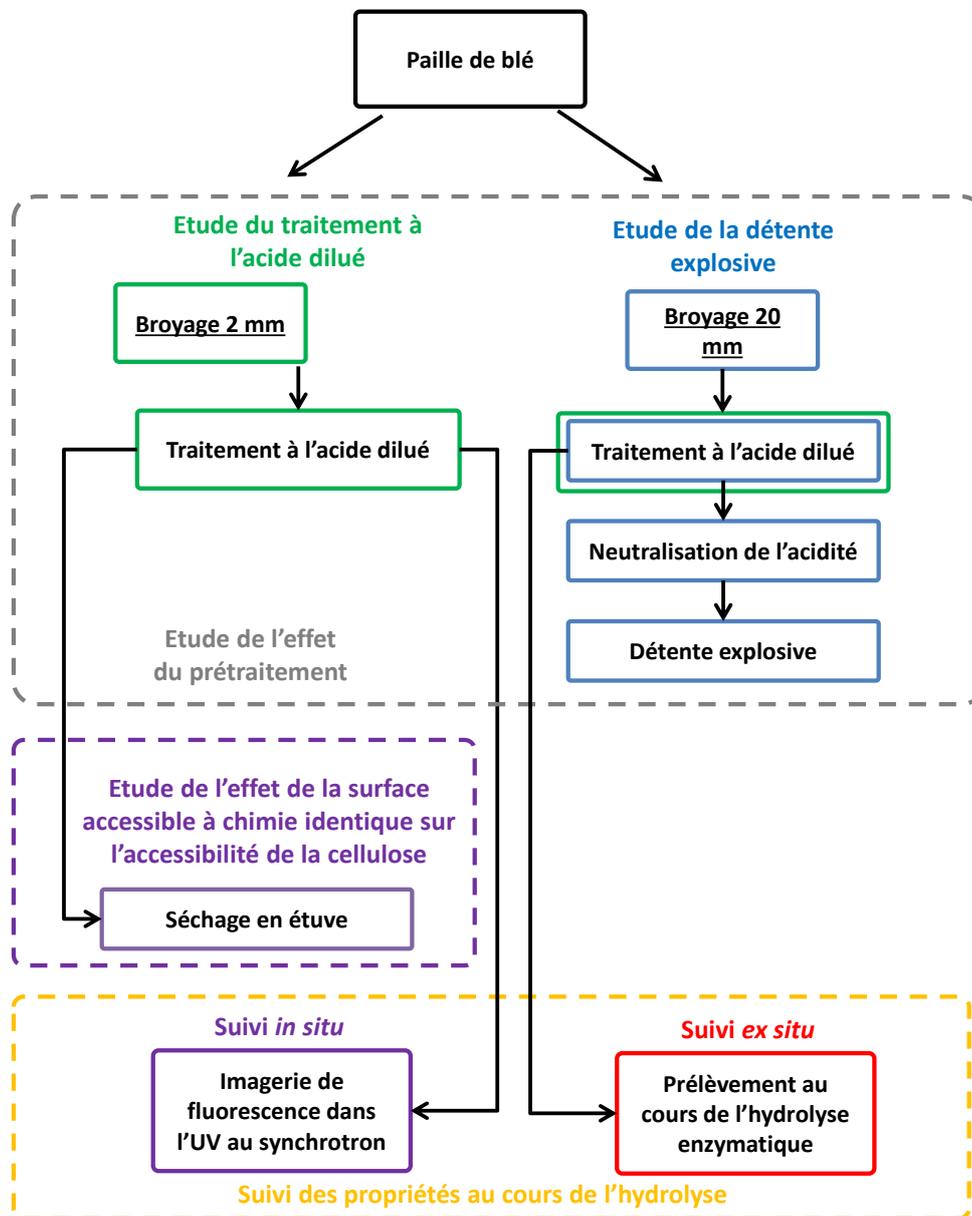


Figure 53 : Représentation schématique de l'organisation des principales études conduites dans cette thèse

f. La production des échantillons : les prétraitements

Deux prétraitements ont été considérés dans cette thèse : un traitement à l'acide dilué et un prétraitement par explosion à la vapeur modifié pour lequel une cuisson acide a été réalisée séparément de la phase de détente explosive. Les prétraitements ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Charlotte Loustau-Cazalet [241] et sont détaillés par la suite.

i La paille de blé native

Le substrat lignocellulosique choisi est une paille de blé (cultivar Bermude, récoltée en 2014 dans la Marne) récoltée en 2014 et dépoussiérée. Elle a été broyée grossièrement à 20 mm pour les études de la détente explosive, du suivi *ex situ* des substrats en hydrolyse, et pour l'étude fractions granulométriques. Elle a été broyée à 2 mm pour l'étude principale des échantillons traités à l'acide dilué. L'analyse compositionnelle de cette paille est présentée dans la suite de ce chapitre.

ii Le traitement à l'acide dilué

L'outil de prétraitement

L'outil de prétraitement est une unité U868 (Figure 54), qualifiée de pilote par son dimensionnement, et fonctionne en lot (par opposition aux fonctionnements continus et pseudo-continus) Le réacteur autoclave consiste en un corset métallique qui maintient la pression. A l'intérieur se trouve une chemise amovible en hastelloy d'une capacité totale de 1 L (hauteur interne de 13 cm ; diamètre interne de 9 cm). L'unité peut fonctionner avec une pression maximale de 40 bar et à une température maximale de 250 °C. La température de la phase liquide est maintenue dans l'autoclave par des cartouches électriques situées dans les parois, et un thermocouple dans le milieu liquide. D'autres cartouches sont situées dans la bride pour maintenir la température de la phase gazeuse à l'aide un autre thermocouple. Pendant le prétraitement, le milieu est mélangé *via* un agitateur mécanique en forme d'ancre. La vitesse maximale d'agitation est de 400 tr/min En fin de prétraitement, le refroidissement du milieu est réalisé par une circulation d'air comprimé.

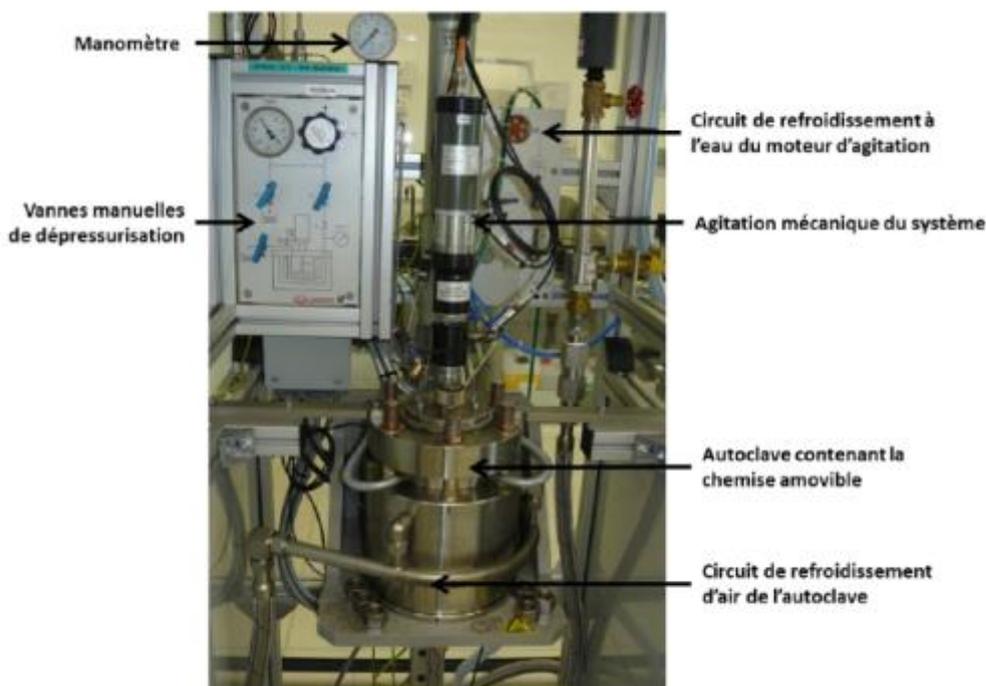


Figure 54 : Photographie de l'unité de prétraitement U868, du manuscrit de C. Loustau Cazalet, 2018

L'imprégnation

Avant de réaliser le prétraitement, un mélange d'imprégnation est préparé. Il contient l'acide sulfurique à une concentration de 72 % en poids. Compte tenu du volume du réacteur qui est d'un litre, la masse maximale du mélange réactionnel est fixée à 400 g (substrat et liqueur d'imprégnation), afin de conserver un certain volume gazeux et garantir une bonne homogénéisation du mélange durant la réaction. Le chargement en matière sèche du mélange était parfois différent pour certains échantillons, il sera précisé au cas par cas. Dans la quasi-totalité des essais de cuisson acide, il était de 10 % pds. Une fois la chemise réintroduite au sein du réacteur, l'ensemble est scellé et l'agitation est lancée à 100 tr.min⁻¹ durant 15 h à

température ambiante afin d'assurer une bonne imprégnation. Enfin l'essai est démarré, avec une vitesse d'agitation de 300 tr/min.

La cuisson

Le montée en température jusqu'à la température de consigne se fait par une rampe d'environ 12 °C/min, alors qu'en refroidissement la rampe est de 10 °C/min. Le temps de séjour est calculé sur la base de la période pendant laquelle milieu liquide était la température de consigne.

Les profils de température et de pression sont enregistrés et permettent de calculer le facteur de sévérité pour chaque essai grâce à la l'Équation (2) :

$$\text{Log}(F_0) = \log_{10} \sum \Delta t \times e^{\frac{T^\circ - T_{ref}}{14,75}} \quad \text{Équation (2)}$$

avec : Δt : l'intervalle de temps entre l'acquisition de deux mesures de température, ici de 0,08 min pour l'unité U868

T_{ref} : la température de référence fixée à 100 °C pour l'ensemble des essais car il s'agit du seuil de température à partir duquel des modifications physicochimiques peuvent être observées.

Après refroidissement par le vortex d'air comprimé, la chemise est sortie de l'autoclave.

iii L'explosion à la vapeur

Le traitement d'explosion à la vapeur (*steam explosion*) consiste en deux étapes. Dans un premier temps, le substrat est chauffé en conditions aqueuse (et présence éventuelle d'acide). Cette étape est strictement équivalente à ce qui est réalisé lors d'une cuisson acide. La différence entre les deux prétraitements réside dans la deuxième étape qui consiste à relâcher brutalement la pression par une détente soudaine de la pression. Lors de cette détente, l'eau maintenue sous forme liquide se vaporise, créant une force d'expansion sur le substrat. La projection du substrat dans le cyclone de récupération, est également source de contraintes mécaniques. Le prétraitement d'explosion à la vapeur se résume en l'action conjointe d'une action thermochimique suivie d'une déstructuration physique. A l'échelle industrielle, la cuisson acide n'est pas effectuée seule, car il est plus simple de réaliser une détente explosive pour évacuer le substrat (continuum ou pas), plutôt que de refroidir le réacteur avant de le libérer.

Dans le but d'étudier séparément l'effet physique de l'effet chimique du prétraitement d'explosion à la vapeur, en termes de modifications d'ordre physicochimique et de digestibilité, des détentes explosives de différentes magnitudes de dépressurisation ont été effectuées sur des échantillons déjà traités à l'acide dilué à différentes conditions opératoires. Ainsi, différents traitements à l'acide dilué ont été réalisées préalablement dans un réacteur autoclave afin d'obtenir plusieurs échantillons ayant des caractéristiques différentes en termes de composition et de réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Les substrats ainsi traités sont introduits dans l'outil de prétraitement d'explosion à la vapeur, pour étudier l'impact de l'amplitude de la détente explosive sur la composition des substrats, leur réactivité en hydrolyse enzymatique, et leurs propriétés physicochimiques. Il s'agit ainsi de comprendre l'impact de la détente explosive sur le substrat, indépendamment du traitement thermochimique qui le précède.

La préparation du substrat par traitement à l'acide dilué

La description de l'outil :

Du fait de la grande quantité de substrat nécessaire pour la réalisation de l'explosion vapeur (500 g sec de substrat), l'étape de cuisson acide a été réalisée dans un autre outil que celui utilisé dans l'étude du prétraitement à l'acide dilué, permettant de prétraiter 250 g de paille sèche.

L'outil utilisé pour cette étape est un modèle autoclave Parr, série 4530, situé à l'Université d'Agro-BioTech de Gembloux (Belgique). Une coquille chauffante en fibre céramique entoure une chemise amovible en titane d'un volume de 7 L. Le refroidissement du mélange réactionnel est réalisé par un

serpentin d'eau placé dans le milieu. Une agitation mécanique est réalisée à l'aide d'un système à six pales. Un contrôle de la température et de la pression est réalisé pour assurer le suivi du prétraitement.

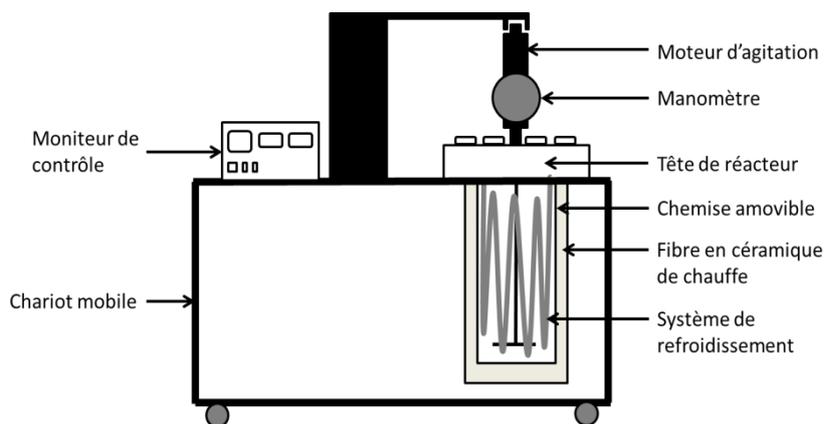


Figure 55 : Représentation schématique de l'unité Parr 4530, du manuscrit de C. Loustau Cazalet, 2018

D'après une étude [88], la granulométrie de la paille doit être suffisamment grande ($\geq 2,5$ mm) pour pouvoir subir une explosion efficace. De plus, aux vues des quantités nécessaires (500 g sec), une étape de broyage à faible granulométrie aurait été trop fastidieuse. Ainsi, il a été décidé de travailler dans cette étude sur de la paille broyée 20 mm. Par ailleurs, sur deux pailles traitées de manière équivalentes en termes de conditions opératoires, l'une sur l'outil Parr, l'autre sur l'unité U868, les compositions obtenues sont sensiblement les mêmes, de même que les rendements en glucose en hydrolyse enzymatique.

Le traitement à l'acide dilué :

Outre l'utilisation d'un outil différent pour l'étude des échantillons du traitement à l'acide dilué, le protocole suivi est du même ordre : une liqueur d'imprégnation est préparée à partir d'acide sulfurique à 72 % pds (LCH Chimie), pour une imprégnation à température pièce durant la nuit sur une durée de 15 h. Le chargement en substrat avec la liqueur d'imprégnation (dans une proportion de 7,5 % en poids de matière sèche) est fixé à 3330 g pour des raisons techniques. Une fois le substrat imprégné de sa liqueur pendant la nuit, l'unité est fermée, mise à chauffer à la température de consigne et sous agitation (300 tr/min). La rampe de la montée en température est de l'ordre de 4 °C/min, et de 12 °C/min pour ce qui est de la rampe de descente en température. De même qu'avec l'unité U868, la durée du prétraitement est estimée sur la base de la durée pendant laquelle le mélange réactionnel était à la température de consigne. Le profil temporel de température est récupéré, pour calculer le facteur de sévérité de manière plus précise.

La préparation avant explosion

L'outil réalisant l'explosion n'admettant pas de charges acides pour des raisons de corrosion, il est nécessaire de neutraliser et laver l'échantillon avant de le charger dans l'unité. (ceci nous permet aussi de distinguer séparément l'effet physique de la détente en milieu neutre du traitement acide). Ainsi, après cuisson, le pH du mélange réactionnel rehaussé à un pH de 7 par l'utilisation d'hydroxyde de sodium. Le substrat est ensuite essoré (centrifugation grossière à axe vertical). Pendant cette étape, le jus et le substrat sont séparés à l'aide d'une toile. Un lavage est ensuite réalisé en 3 fois, sous rotation, par introduction de 4 L d'eau dans l'essoreuse. Le lavage du marc se fait par l'introduction de 12 litres d'eau en 3 fois dans l'essoreuse toujours en rotation.

La détente explosive

La description de l'outil :

L'outil utilisé est un équipement pilote composé d'un générateur de vapeur dont la pression maximale générée est de 60 bar, d'un réacteur d'une contenance de 50 L qui supporte une température d'au plus 280 °C pression jusqu'à 51 bar, et d'un éclateur cyclonique, dont la vanne d'éclatement possède un

diamètre de 4 cm. Il a été conçu par le département de Chimie Biologie Industrielle-ULG-Gembloux Agro-Bio Tech [84].

Le prétraitement :

Une fois le substrat traité, neutralisé et lavé, environ 600 g (équivalent matière sèche) sont introduits dans le réacteur, ce qui correspond à la réunion de deux traitements identiques à l'acide dilué réalisées dans le réacteur Parr. Ensuite, la vanne de chargement est ouverte afin d'atteindre la pression de consigne. Une fois la consigne atteinte, cette vanne se ferme, et la vanne d'éclate s'ouvre, libérant ainsi la pression. Le substrat est récupéré dans le cyclone, *via* la vanne d'éclatement. Le résidu de prétraitement est ensuite conditionné en chambre froide en attendant les étapes de post-traitement, le moment venu.

Le post traitement

La neutralisation de l'hydrolysate :

L'hydrolysate de traitement à l'acide dilué est neutralisé par de l'hydroxyde de sodium et l'aide d'un pH-mètre, de telle sorte à obtenir un pH de 4,8 (pH optimal pour la mise en œuvre d'hydrolyse, bien qu'entre-temps le substrat sera lavé), ceci afin d'une part de cesser la modification chimique réalisée par hydrolyse acide, et d'autre part pour des raisons de sécurité.

La séparation du marc brut et du jus :

La séparation des fractions liquide et solide est réalisée par une toile filtrante dans le cas du traitement acide, pour récupérer la fraction principale du substrat d'un côté, et le jus de cuisson d'autre part. Afin de récupérer la matière résiduelle collée dans la chemise du réacteur, le jus extrait introduit dans la chemise pour la laver la chemise de l'unité de prétraitement. Puis ce mélange de résidu et jus de traitement est filtré à nouveau à travers la toile. Pour finir, une étape de centrifugation à 3300 g durant 20 min est réalisée sur la toile contenant le substrat. Le jus résiduel obtenu est versé avec le jus de prétraitement issu du premier filtrage.

Dans le cas des pailles traitées par explosion vapeur, la séparation solide/liquide est réalisée à l'aide d'une filtration Büchner, avec un filtre quartz de 11 µm. Ensuite et de même, le jus obtenu est utilisé au lavage de la chemise et est filtré de nouveau.

L'extraction des sucres solubles :

Le lavage des échantillons est une étape qui permet d'enlever les éléments extractibles. Dans le cas des substrats natifs (paille de blé), il s'agit des extractibles organiques classiquement retrouvés (cutines, phénols, terpènes et terpénoïdes, stérols, acides gras, flavonoïdes...), alors que pour les substrats traités, il s'agit des composés simples présents ou créés pendant le prétraitement (monomères et petits oligomères de sucres, lignine partiellement solubilisée, ou encore acide sulfurique, sels de sulfate de sodium, acide acétique, formique, lévulinique, 5-HMF, furfural, humines).

Deux techniques de lavage ont été utilisées : dans le cas des échantillons traités à l'acide dilué, le lavage a été réalisé à l'aide d'un appareil Dionex ASE 150, tandis que dans le cas des prélèvements à différents temps d'hydrolyse, un appareil Soxhlet a été utilisé.

Le lavage réalisé dans l'équipement spécifique Dionex ASE 150 est opéré à 40 °C et sous pression (jusqu'à 110 bar). L'outil est équipé d'une cellule en zirconium de 100 mL qui permet de réaliser des cycles de lavage. La cellule est remplie au trois quarts avec le substrat traité. Chaque cycle comprend cinq étapes que sont le remplissage de la cellule avec le solvant sous pression, une extraction statique, une vidange, le rinçage de la cellule avec un volume de solvant choisi, et l'injection d'azote sous pression pour évacuer au mieux l'eau résiduelle. Les conditions du lavage sont adaptées à partir de celles d'écrites par le NREL et sont indiquées ci-dessous :

- Un premier cycle est réalisé : temps statique de 2 min, volume de rinçage de 15 %, 180 s de purge, et un seul cycle statique. Le volume d'eau distillée utilisé est de 15 %

- Deux cycles identiques sont ensuite répétés : temps statique de 2 min, volume de rinçage de 66 %, 5 cycles statiques. Le volume de solvant utilisé est de 66 %
- Un dernier cycle est réalisé : répétition du premier cycle

Le Soxhlet est une autre technique de lavage. Elle a été utilisée pour laver les prélèvements à différents temps d'hydrolyse, suite à une panne de l'équipement dionex. Le fonctionnement se base sur une filtration continue par un cycle d'évaporation et de liquéfaction de l'eau qui permet de recycler l'eau de lavage. Une cartouche en papier filtre est remplie au trois quarts avec le substrat et 250 mL d'eau déionisée et est introduite dans le ballon. L'eau du ballon est ensuite mise en ébullition, ce qui démarre le lavage continu sur une durée de vingt-quatre heures.

Stockage

Les échantillons humides sont stockés sous forme congelée à une température de -18 à -20 °C.

Conditionnement et préparation d'échantillon préalablement à l'analyse

Suite à une pré-étude visant à déterminer le conditionnement et le type de stockage le plus adapté pour stocker les échantillons sans trop altérer leurs propriétés physicochimiques, le protocole suivant a été retenu. Les échantillons à caractériser sont stockés à l'état congelé et humide. Lorsque vient le temps de caractériser les substrats sous forme sèche, lesdits substrats sont lyophilisés selon la procédure suivante : les échantillons encore congelés sont placés dans le lyophilisateur, et mis sous vide pendant la descente en température. Les substrats sont maintenus pendant quelques heures à une température aux alentours de -60 °C, puis remontés progressivement en température par paliers jusqu'à la température ambiante, en s'assurant systématiquement que le vide secondaire est bien maintenu après chaque remontée en température. Cette étape de dessiccation secondaire, plus proche de 0 °C, a pour objectif de faciliter la désorption de l'eau plus intimement liée au substrat. Une fois la température ambiante atteinte, le vide est rompu progressivement sur une durée d'environ une minute.

g. Echantillons étudiés

L'ensemble des échantillons analysés pour les différentes études de cette thèse sont indiqués dans le Tableau 14. La nomenclature permet de connaître les conditions opératoires de prétraitement qui ont servi à produire les échantillons. Elle est construite de la manière suivante :

- L'échantillon PBN est la paille de blé native, sans prétraitement.
- la première lettre indique la température, A pour 100 °C, B pour 120 °C, etc., jusqu'à E pour 180 °C. A 140 °C pendant 60 min, 5 répétitions sont faites, on leur attribue un numéro pour chacune d'elles : A060C1 à A060C5.
- Le nombre qui suit précise la durée du séjour du prétraitement de prétraitement.
- La lettre suivante précise s'il s'agit d'un échantillon de cuisson acide (C), ou d'explosion vapeur (V), auquel cas les deux chiffres suivants indiquent la variation de pression relative à la détente explosive, en bar (0, 7, 14 ou 20).
- Dans le cas des échantillons traités à l'acide dilué, certains sont des prélèvements à différents temps d'hydrolyse, ils sont repérés par un T, suivi d'un chiffre qui indique de quel prélèvement il s'agit : 0 pour le temps initial, 1 pour un prélèvement à 3 h d'hydrolyse, 2 pour un prélèvement à 6 h, 3 pour un prélèvement à 24 h, et 4 pour un prélèvement à 48 d'hydrolyse.

L'échantillon A060C5 est le seul échantillon traité sur l'unité Parr autoclave, avec une granulométrie initiale de 20 mm. Tous les autres échantillons ont été prétraités sur l'unité U868, avec une granulométrie initiale de 2 mm.

Tableau 14 : Recensement des différents échantillons utilisés lors de cette thèse

Etude Spécimen	Effets du séchage	Traitement à l'acide dilué	Explosion à la vapeur	Prélèvements en cours d'hydrolyse	Expéri- mentations DISCO	Sévérité prétraitement	Conditions prétraitement
PBN		✓	✓			0 (-∞)	0 °C/0 min
A020		✓			✓	1,4	100 °C/20 min
C001C		✓				1,7	140 °C/1 min
C020C		✓			✓	2,5	140 °C/20 min
C060C1		✓				3	140 °C/60 min
C060C2		✓				3	140 °C/60 min
C060C3		✓				3	140 °C/60 min
C060C4		✓				3	140 °C/60 min
C060C5		✓				3	140 °C/60 min
D020C		✓			✓	3,1	160 °C/20 min
C090C		✓				3,1	140 °C/90 min
C120C		✓				3,2	140 °C/120 min
D060C		✓				3,6	160 °C/60 min
D120C		✓				3,9	160 °C/120 min
E060C		✓				4,1	180 °C/60 min
E120C		✓				4,5	180 °C/120 min
A060C	✓					1,8	100 °C/60 min
C030C	✓					2,7	140 °C/30 min
E010C	✓					3,5	180 °C/10 min
PBNV00			✓			0 (-∞)	0°C/0min/0bar
PBNV07			✓			0 (-∞)	0°C/0min/7bar
PBNV14			✓			0 (-∞)	0°C/0min/14bar
PBNV20			✓			0 (-∞)	0°C/0min/20bar
A020V00			✓			1,4	100°C/20min/0b
A020V07			✓			1,4	100°C/20min/7b
A020V14			✓			1,4	100°C/20min/14b
A020V20			✓			1,4	100°C/20min/20b
B020V00			✓			2	120°C/20min/0b
B020V07			✓			2	120°C/20min/7b
B020V14			✓			2	120°C/20min/14b
B020V20			✓			2	120°C/20min/20b
C020V00			✓			2,5	140°C/20min/0b
C020V07			✓			2,5	140°C/20min/7b
C020V14			✓			2,5	140°C/20min/14b
C020V20			✓			2,5	140°C/20min/20b
E020V00			✓			3,7	180°C/20min/0b
E020V07			✓			3,7	180°C/20min/7b
E020V14			✓			3,7	180°C/20min/14b
E020V20			✓			3,7	180°C/20min/20b
A020V00T1				✓ à 3h		1,4	100°C/20min/0b
A020V00T2				✓ à 6h		1,4	100°C/20min/7b
A020V00T3				✓ à 24h		1,4	100°C/20min/14b
A020V00T4				✓ à 48h		1,4	100°C/20min/20b
C020V00T1				✓ à 3h		2,5	140°C/20min/0b
C020V00T2				✓ à 6h		2,5	140°C/20min/7b
C020V00T3				✓ à 24h		2,5	140°C/20min/14b
C020V00T4				✓ à 48h		2,5	140°C/20min/20b

i Les échantillons de cuisson acide

Ces échantillons sont produits dans l'unité U868, et possède une granulométrie initiale de **2 mm**, à l'exception de l'échantillon C060C5 qui est un des duplicatas à des conditions opératoires de 140 °C pendant 60 min.

Les compositions des échantillons de cuisson acide sont indiquées dans le Tableau 15. Elles sont obtenues par la méthode d'hydrolyse acide décrite de manière détaillée dans le manuscrit de Charlotte Loustau Cazalet qui suit directement le protocole NREL idoine [242]. Dans ce même tableau est indiquée la sévérité calculée de chaque prétraitement effectué. La paille native n'étant pas prétraitée, l'expression de son facteur de sévérité tend vers $-\infty$, en conséquence, et tout au long du manuscrit, il sera placé arbitrairement à 0.

Les termes glucane, xylane, arabinane et galactane désignent respectivement les teneurs en glucose polymérique (cellulose, quasi exclusivement), et de xylose (hémicelluloses), arabinose (hémicelluloses), et galactose (hémicellulose) sous forme polymérique. Ces termes ne signifient donc pas que dans la paille native des polymères de galactane pur par exemple sont présents, mais simplement que la matrice polysaccharidique hémicellulosique contient des unités de galactose. On désigne par "fraction non polysaccharidique", les autres constituants, que ce soit la lignine (largement majoritaire pour une sévérité de prétraitement inférieure à 3,5), les humines (proportion non négligeable à partir d'une sévérité de 3,5), ou encore les composés minéraux (largement minoritaires).

Les rendements de conversion de la cellulose en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique sont précisés dans la partie concernée des résultats.

Tableau 15 : Caractéristiques compositionnelles des échantillons produits par cuisson acide

Echantillon	T°C	Temps (min)	Sévérité	Glucane	Xylane	Arabinane	Galactane	Fraction non polysaccharidique
PBN	0	0	0	39,8	24,4	3,0	2,1	30,7
A020C	100	20	1,4	44,0	25,1	0,1	1,3	29,6
C001C	140	1	1,7	51,8	16,8	0,8	<1.d	30,6
C020C	140	20	2,5	57,8	7,7	<1.d	<1.d	34,6
C060C1	140	60	3	59,2	4,9	<1.d	<1.d	35,9
C060C2	140	60	3	58,6	4,3	<1.d	<1.d	37,1
C060C3	140	60	3	61,2	4,0	<1.d	<1.d	34,8
C060C4	140	60	3	60,4	5,0	<1.d	<1.d	34,6
C060C5	140	60	3	59,8	3,8	<1.d	<1.d	36,4
D020C	160	20	3,1	58,8	1,1	<1.d	<1.d	40,1
C090C	140	90	3,1	61,0	3,9	<1.d	<1.d	35,2
C120C	140	120	3,2	59,5	3,7	<1.d	<1.d	36,8
D060C	160	60	3,5	57,2	<1.d	<1.d	<1.d	42,8
D120C	160	120	3,9	53,2	<1.d	<1.d	<1.d	46,8
E060C	180	60	4,1	43,2	<1.d	<1.d	<1.d	56,8
E120C	180	120	4,5	18,40	<1.d	<1.d	<1.d	81,6

Limite de détection HPLiC : glucose : 0,02 g/kg ; xylose : 0,05 g/kg ; Arabinose : 0,02g/kg ; Mannose : 0,02 g/kg ; Galactose : 0,02 g/kg. Compte tenu du protocole d'hydrolyse acide, le seuil de 0,02g/kg correspond à un pourcentage massique dans le substrat autour de 0,8 % pds.

ii Les échantillons d'explosion vapeur

Analyse compositionnelle

5 conditions opératoires de cuisson acide ont été utilisées pour générer ces échantillons. Pour chaque série de traitements à l'acide dilué, 4 échantillons ont été générés par la mise en œuvre d'une détente explosive dont l'amplitude est exprimée par la variation de pression observée entre la pression mesurée dans le réacteur et la pression atmosphérique. La pression du réacteur est choisie par l'intermédiaire du

chauffage de l'équipement, qui génère une pression de vapeur d'eau en lien direct avec la température de la vapeur d'eau (*via* la loi des gaz parfaits). La granulométrie initiale de ces échantillons est de **20 mm**.

Les compositions des échantillons d'explosion vapeur sont indiquées dans le Tableau 16. Dans ce même tableau est indiquée la sévérité calculée du prétraitement de cuisson acide réalisée antérieurement à la détente explosive.

Tableau 16 : Caractéristiques compositionnelles des échantillons produits par explosion vapeur

Echantillon	Sévérité chimique	ΔP (bar)	Glucane	Xylane	Arabinane	Galactane	Fraction non polysaccharidique
PBNV00	0	0	39,2	25,3	2,7	1,8	31,0
PBNV07	0	7	39,3	25,9	2,9	1,6	30,4
PBNV14	0	14	39,6	26,5	2,4	1,3	30,2
PBNV20	0	20	52,3	18,1	1,1	<l.d	28,5
A020V00	1,3	0	43,2	25,5	1,5	1,3	28,6
A020V07	1,3	7	43,8	24,7	1,7	<l.d	29,8
A020V14	1,3	14	44,2	23,1	1,6	<l.d	31,1
A020V20	1,3	20	54,3	19,0	1,0	1,1	24,6
B020V00	2	0	52,6	15,0	<l.d	<l.d	32,4
B020V07	2	7	53,4	16,6	<l.d	<l.d	29,9
B020V14	2	14	56,1	14,5	<l.d	<l.d	29,4
B020V20	2	20	61,2	11,2	<l.d	<l.d	27,6
C020V00	2,5	0	59,1	6,8	<l.d	<l.d	34,1
C020V07	2,5	7	60,6	8,3	<l.d	<l.d	31,2
C020V14	2,5	14	66,5	7,7	<l.d	<l.d	25,8
C020V20	2,5	20	63,9	8,0	<l.d	<l.d	28,1
E020V00	3,7	0	51,6	<l.d	<l.d	<l.d	48,4
E020V07	3,7	7	53,1	<l.d	<l.d	<l.d	46,9
E020V14	3,7	14	53,4	<l.d	<l.d	<l.d	46,6
E020V20	3,7	20	58,8	<l.d	<l.d	<l.d	41,2

Evaluation de la digestibilité enzymatique

Afin de mieux distinguer la différence de digestibilité des substrats explosés, le protocole d'hydrolyse a été légèrement adapté. En effet, par rapport au protocole standard décrit dans le paragraphe portant sur le protocole de réalisation des hydrolyses enzymatiques, la **dose d'enzymes a été doublée**, pour les deux cocktails enzymatiques utilisés, ceci dans le but de mieux distinguer les différences de digestibilité de substrats proches. Les rendements de conversion de la cellulose en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique sont précisés dans la partie concernée des résultats.

iii Les prélèvements au cours de l'hydrolyse enzymatique

Les protocoles d'obtention de ces échantillons et leur composition sont explicitées dans la partie concernée, au chapitre 6 sur le suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique.

iv Les échantillons de l'étude sur l'influence du séchage sur la porosité et la digestibilité

Les compositions des échantillons de cuisson acide qui ont servis à l'étude du séchage sur la porosité et sur la digestibilité en hydrolyse enzymatique, sont indiquées dans le Tableau 17. Dans ce même tableau est indiqué la sévérité calculée du prétraitement de cuisson acide. Les rendements de conversion de la cellulose en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique sont précisés dans la partie concernée des résultats. La

Matériels et méthodes

granulométrie initiale de ces échantillons est de 2 mm. Pour chacun de ces trois échantillons, une partie a été lyophilisée, et l'autre a été séchée à l'étuve.

Tableau 17 : Caractéristiques compositionnelles des échantillons de cuisson acide ayant servi à cette étude

Echantillon	T°C	Temps (min)	Sévérité	Glucane (%pds)	Xylane (%pds)	Arabinane (%pds)	Galactane (%pds)	Fraction non polysaccharidique (%pds)
A060C	100	60	1,8	51,6	23,4	<l.d	1,4	25,0
C030C	140	30	2,7	67,0	7,5	<l.d	<l.d	25,5
E010C	180	10	3,4	62,0	<l.d	<l.d	<l.d	38,1

V. Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

Ce chapitre vise à caractériser les modifications physicochimiques majeures provoquées par le traitement à l'acide dilué ou par explosion vapeur, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement, en appliquant une approche multi-technique et multi-échelle.

1. Effets du traitement à l'acide dilué

a. Rappel de la composition des substrats et du rendement en glucose dépendamment de la sévérité de prétraitement

Pour rappel, les échantillons étudiés ont été produits à partir d'une paille broyée à 2 mm. Les conditions de prétraitement à l'acide dilué consistent en des températures comprises entre 100 et 180 °C et pour des temps de séjour variant entre 20 et 120 min. Ainsi la plage de facteur de sévérité est large et s'étend de 1,4 à 4,5. Les analyses compositionnelles ont été évaluées par hydrolyse acide et leur réactivité en hydrolyse enzymatique correspond à une conversion mesurée à 72 h (cf chapitre 4).

La Figure 56a présente l'évolution de la teneur en cellulose, hémicelluloses, et fraction non polysaccharidique en fonction du facteur de sévérité du prétraitement. La fraction non polysaccharidique se résume très majoritairement à de la lignine lorsque la sévérité du prétraitement n'est pas extrême (sévérité inférieure à 3,2). La distinction entre la lignine et les produits solides de dégradation à très forte sévérité fera l'objet d'une étude spécifique dans ce chapitre. La Figure 56b montre l'évolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique, en fonction de la sévérité du prétraitement. Pour faciliter la visualisation des données, un code couleur est choisi (Figure 56) pour représenter les différents échantillons. Ce code est fonction de la sévérité du prétraitement à l'acide dilué, et reste identique tout au long du manuscrit.

Pour des sévérités inférieures ou égales à 1,4, l'hydrolyse des hémicelluloses n'est pas significative. Elle le devient pour des sévérités plus élevées et se révèle être totale pour une sévérité de 3,2. À partir de cette sévérité, c'est au tour de la cellulose, plus stable que les hémicelluloses, de s'hydrolyser, avec une amplitude d'autant plus grande que la sévérité du prétraitement est élevée.

Le rendement en glucose augmente jusqu'à atteindre un maximum pour une sévérité autour de 3, puis diminue lorsque la sévérité du prétraitement augmente encore. Sur la base de ces observations, on classe les échantillons suivant 3 phases dépendantes de la sévérité du prétraitement :

- une première phase concerne les échantillons depuis la paille native jusqu'à une sévérité autour de 2,3 lorsque les conditions opératoires de prétraitement sont douces. Durant cette phase, les hémicelluloses sont hydrolysées de manière plus ou moins significative (de 30 à moins de 20 %m/m) mais jamais de manière totale, et les rendements d'hydrolyse enzymatique ne sont pas optimaux
- une deuxième phase, transitoire, durant laquelle les hémicelluloses deviennent minoritaires (moins de 10 %m/m). Cette phase concerne notamment les échantillons affichant les meilleurs rendements d'hydrolyse enzymatique (autour d'un facteur de sévérité de 3)
- une troisième phase, qui concerne les échantillons produits à une sévérité supérieure à 3,2, et qui caractérise l'excès de sévérité : les polysaccharides, y compris la cellulose, sont significativement

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

hydrolysés/dégradés, et les rendements d'hydrolyse enzymatique diminuent à mesure que la sévérité augmente. Par ailleurs, la fraction non polysaccharidique augmente significativement, de 32 à 80 %m/m.

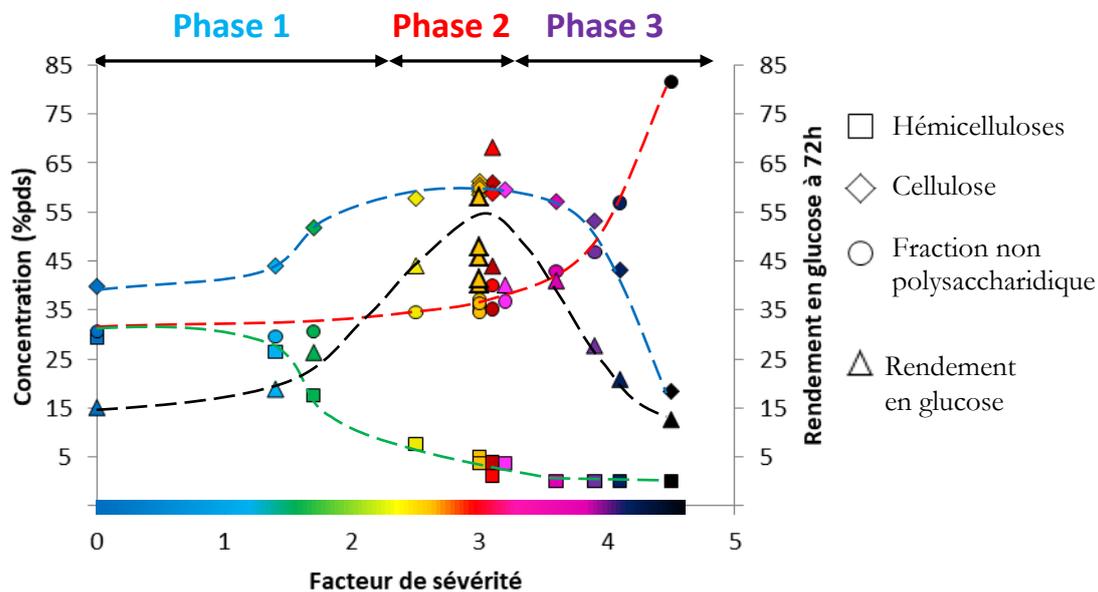


Figure 56 : Evolution de la composition chimique et du rendement en glucose en fonction de la sévérité du prétraitement

L'intérêt de ce chapitre est d'étudier les différentes modifications physicochimiques que subit la paille, dépendamment de la sévérité du prétraitement.

b. Propriétés physiques et morphologiques

i Modifications macroscopiques : taille de particule et morphologie

Par imagerie en macrovision de type fond noir :

L'outil de macrovision BlueBox a été utilisé pour rendre compte des modifications morphologiques provoquées par le prétraitement sur la paille de blé. La Figure 57 illustre qualitativement l'évolution morphologique macroscopique du substrat suivant la sévérité du prétraitement. Pour des raisons pratiques, il n'est présenté ici qu'une image par échantillon pour une sélection d'échantillons, mais il est à noter que les observations énoncées ici se basent sur les images mosaïques réalisées sur l'ensemble des préparations et pour chaque échantillon. Par ailleurs, on rappelle que pour chaque échantillon, 5 préparations *a minima* ont été réalisées et analysées en mosaïque.

Il semble que l'on peut décomposer visuellement les effets du prétraitement en trois phénomènes successifs :

- La libération de fibres, en longues et fines structures filamenteuses, qui restent néanmoins minoritaires par rapport aux particules massives (voir les images des échantillons A020C et C001C en Figure 57),
- Une érosion des particules (à partir de l'échantillon C020C),
- Une fragmentation de la matrice lignocellulosique de plus en plus forte, se traduisant par une augmentation de la proportion de particules fines à mesure que la sévérité du prétraitement augmente.

En parallèle, les échantillons s'assombrissent lorsque la sévérité du prétraitement augmente, si bien que les particules finissent par devenir moins bien identifiables.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

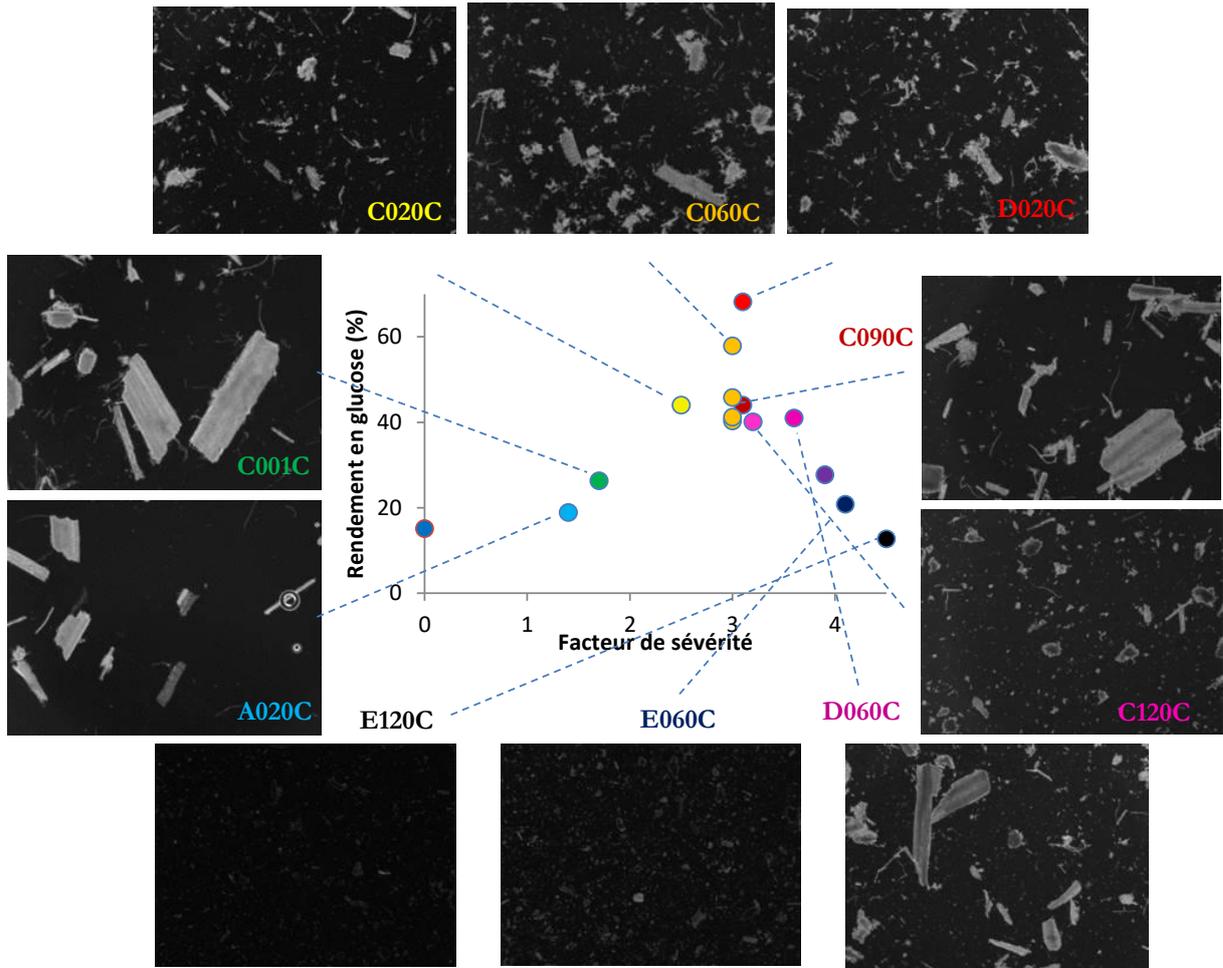


Figure 57 : Images BlueBox permettant de visualiser l'effet morphologique macroscopique du prétraitement sur le substrat. Champ de vue de 5,89x4,429 mm²

Un retraitement spécifique des images a été mis au point pendant ces travaux de thèse afin d'obtenir un histogramme en taille des particules. Cela permet une exploitation correcte des images, depuis la paille native jusqu'à l'échantillon C120C. Au-delà, la fragmentation et l'assombrissement des particules sont tels que la segmentation des images n'est plus satisfaisante.

Ces distributions sont présentées en Figure 58a. Elles permettent de se rendre compte plus quantitativement de l'effet du prétraitement sur la morphologie du substrat. Afin de mieux visualiser les résultats de ces données très bruitées, une interpolation polynomiale (de degré 6) a été réalisée (Figure 58b). Un phénomène de fragmentation est observé avec un décalage des distributions vers de plus faibles diamètres de particules lorsque la sévérité du prétraitement augmente.

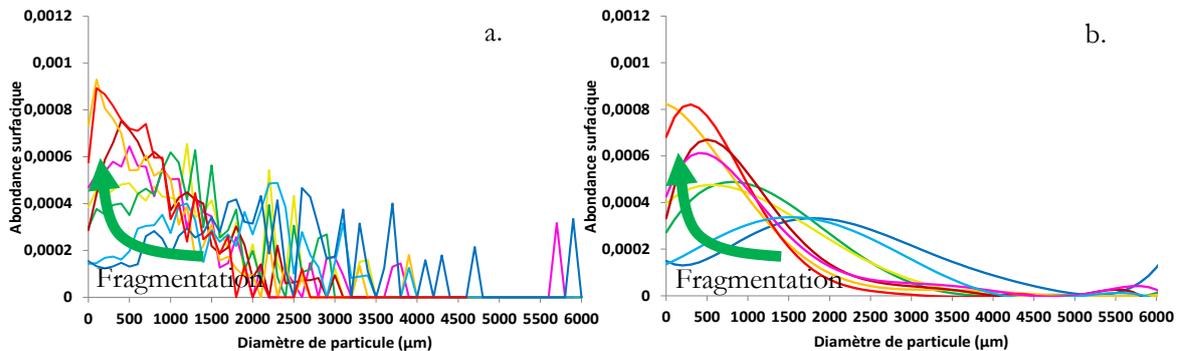


Figure 58. Distribution surfacique en taille de particule (a), interpolations polynomiales de degré 6 des distributions (b)

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

A partir des distributions, la valeur de diamètre de particule au maximum de la fréquence (abondance surfacique) est déterminée pour chaque échantillon afin de mieux quantifier l'effet du prétraitement sur l'altération des particules de biomasse. La Figure 59 montre l'évolution de ces diamètres, en fonction du facteur de sévérité du prétraitement. On constate qu'il existe une relation décroissante liant la taille des particules avec la sévérité du prétraitement.

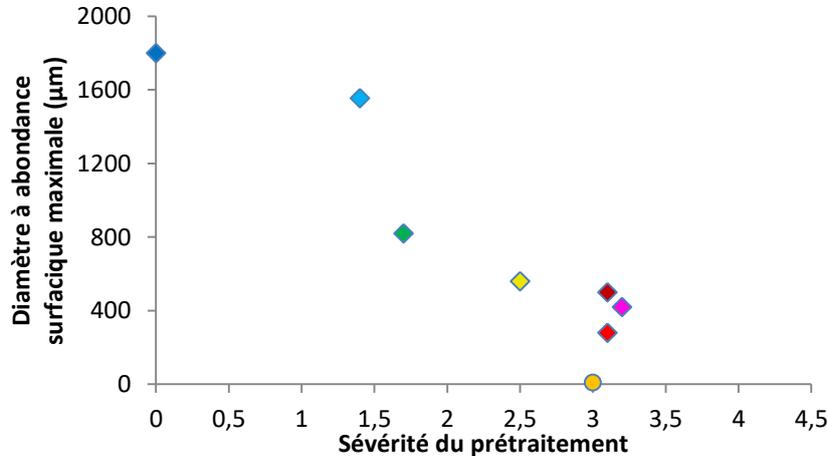


Figure 59 : Evolution du diamètre moyen de particules au maximum d'abondance surfacique, pour les différentes distributions des échantillons analysés

Il semble donc que l'analyse des images acquises en BlueBox permette une bonne discrimination des échantillons sur la base de la taille des particules, tant que celles-ci ne sont ni trop petites ($<50 \mu\text{m}$), ni trop sombres, ni même trop grandes (quelques mm et plus). Cette méthode convient donc aux échantillons des phases 1 et 2, mais pas pour les échantillons plus sévèrement prétraités. En effet, la limitation liée à la résolution de l'appareil est visible pour les échantillons C060C et D020C. La distribution de ces derniers est proche avec l'axe des ordonnées, ce qui signifie que les très petites particules sont les plus présentes. Par ailleurs, l'assombrissement des particules à forte sévérité rend plus difficile la segmentation. Enfin, il semble visuellement que plus les particules sont fines, plus elles ont tendance à se regrouper, ce qui introduit un biais sur leur nombre réel. Une caractérisation en granulométrie par diffraction laser a été effectuée pour confirmer les tendances issues de l'analyse d'image.

Par granulométrie à diffraction laser

La granulométrie par diffraction laser a été utilisée afin de pouvoir caractériser la totalité des échantillons produits, et ceci sur toute la plage des conditions opératoires testées. La Figure 60 montre les distributions granulométriques en abondance numérique (a) et en abondance volumique (b) obtenues pour ces échantillons. Les distributions en abondance numérique correspondent à un comptage des particules sur la base du diamètre moyen équivalent. Ces distributions sont donc sensibles aux petites particules. Les distributions volumiques représentent l'abondance volumique par taille moyenne de particules et sont en conséquence plus sensibles aux grosses particules.

On remarque plusieurs points. D'abord, les distributions présentent une seule population de taille de particules, plus ou moins large. Ensuite l'augmentation de la sévérité réduit globalement et progressivement la taille des particules. Les variations sont plus sensibles pour les distributions en abondance numérique que pour les distributions en abondance volumique où seuls les échantillons de la phase 3 sont bien discriminés des phases 1 et 2, du fait de leur granulométrie sensiblement plus fine. En revanche, les distributions volumiques représentent plus fidèlement l'échantillon puisqu'elles sont représentatives de la masse de ce dernier. Elles permettent de constater une diminution de la taille des particules à mesure que la sévérité du prétraitement augmente. Ainsi par la suite, seule la distribution volumique sera considérée.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

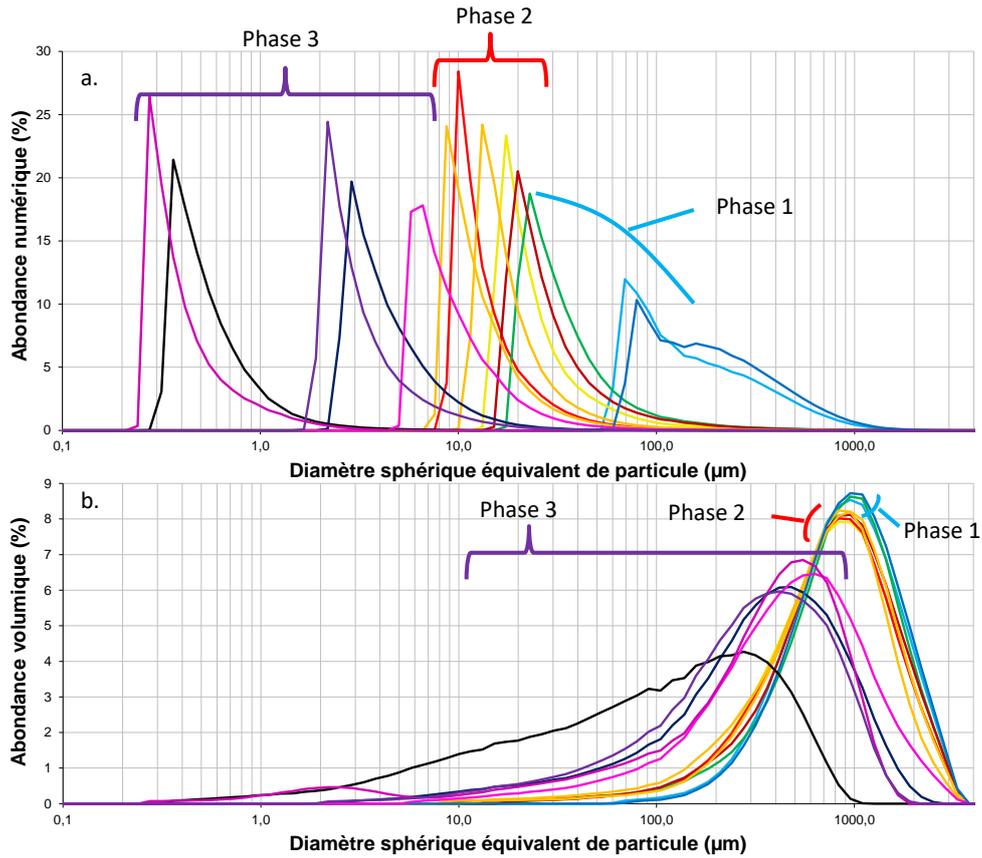


Figure 60 : Distributions granulométriques en abondance numérique (a) et en abondance volumique (b) des échantillons traités à l'acide dilué

On considère à présent à la fois le diamètre de particule au maximum d'abondance volumique, et le diamètre médian des différentes distributions, pour chacune des distributions. On montre en Figure 61 l'évolution de ces deux grandeurs en fonction du facteur de sévérité. Cette figure illustre bien que la diminution de la taille de particule devient significative à la frontière entre les phases 2 et 3 (sévérité 2,5), c'est-à-dire lorsque les hémicelluloses ne sont quasi plus présentes, ce qui fragilise probablement les tissus et mène à la réduction observée de la taille des particules. La destruction des particules se poursuit à plus forte sévérité, une fois les hémicelluloses absentes, ceci de manière concomitante à l'hydrolyse de la cellulose et à l'augmentation de la fraction non polysaccharidique observées sur Figure 56.

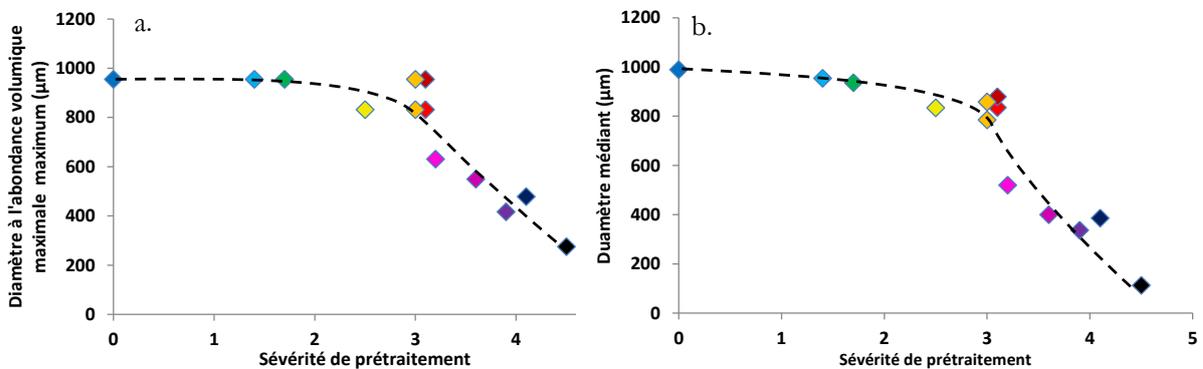


Figure 61 : Evolution du diamètre de particule au maximum d'abondance volumique (a) et du diamètre médian (b) en fonction du facteur de sévérité

Ces résultats sont cohérents termes de tendance avec ceux trouvés à partir de l'analyse d'image dans le sens où ces deux démarches analytiques montrent une réduction de la taille des particules lorsque la

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

sévérité du prétraitement augmente. En revanche, selon l'analyse d'image, une forte diminution de la taille des particules est observée dès une sévérité de prétraitement de 1,7 alors qu'en granulométrie laser, la diminution de la taille moyenne de particule en volume n'est pas encore mesurée à cette sévérité. Ainsi la distribution surfacique obtenue par analyse d'image semble être plus sensible aux premiers phénomènes de fragmentation.

Morphologie à l'échelle microscopique par microscopie électronique à balayage

L'évolution de la morphologie des particules en fonction de la sévérité du prétraitement a été étudiée *via* l'usage de la microscopie électronique à balayage depuis l'échelle millimétrique jusqu'à l'échelle de la centaine de nm, dans le but d'améliorer la compréhension des effets du prétraitement sur la matrice lignocellulosique. La Figure 62 montre des images à 3 grossissements différents, pour quelques échantillons qui permettent de couvrir la plage des sévérités de prétraitement étudiée (1,4 à 4,1). Il s'agit des échantillons A020C, C020C, D020C, D060C, et E060C. Seules quelques images sont présentées pour des raisons de clarté d'affichage, mais plusieurs clichés par échantillon et par grossissement ont été utilisés pour établir les modifications provoquées par le prétraitement dépendamment des conditions opératoires. On constate plusieurs modifications provoquées par l'augmentation de la sévérité du prétraitement, à savoir :

- Une fragmentation des particules de plus en plus marquée à mesure que le prétraitement devient plus sévère,
- Une modification de l'état de surface, qui devient de plus en plus rugueux,
- L'apparition de gouttelettes sphériques à sévérité intermédiaire (autour de 3). Si l'on se fie à la littérature il s'agit de lignine, qui migre à travers les tissus puis coalesce en gouttes pendant le prétraitement [103,105,108]. A plus haute sévérité, il peut s'agir d'humines, quoique la morphologie diffère souvent : l'état de surface est différent, plus rugueux [98,100], ou les tailles des gouttes sont plus conséquentes [101],
- La présence de matériel lignocellulosique suffisamment déstructuré pour qu'aucune structure cellulaire/tissulaire ne soit reconnaissable.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

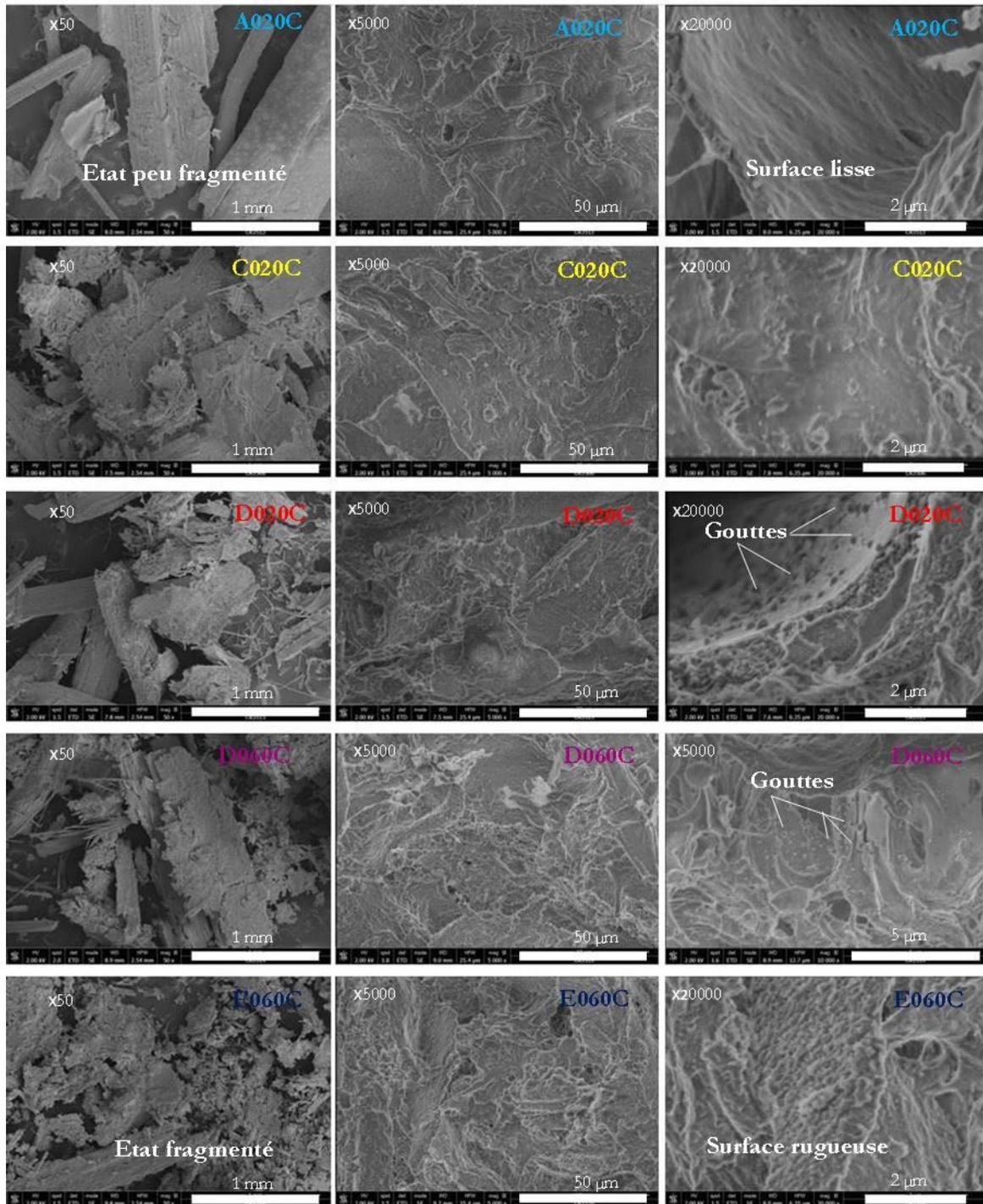


Figure 62 : Clichés MEB des échantillons A020C (A), C020C (B), D020C (C), D060C (D), et E060C (E)

Concernant les gouttes de lignine, on suppose que suite à l'hydrolyse des hémicelluloses et à la température lors du prétraitement, la lignine est ramollie d'une part et se réorganise en une structure plus stable et compacte d'autre part. La structure en gouttes s'explique bien par le fait que la lignine qui migre à travers la matrice se regroupe plus facilement en formes qui permettent de minimiser l'exposition de ladite lignine au milieu aqueux environnant, comme le font les formes sphériques.

La rugosité de surface observée s'explique probablement par le retrait des hémicelluloses et la migration progressive de la lignine, puis par l'hydrolyse de la cellulose et la création de produits de dégradation non solubles (qui donnent l'aspect visuel noir, par déshydratation des polysaccharides, création de carbonyles). Les images à fort grandissement permettent aussi de montrer la présence d'une porosité qui affleure au

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

niveau des parois secondaires des tissus lignifiés, probablement par le retrait des hémicelluloses, lorsque le prétraitement est assez intense (aux alentours de 3, ici l'échantillon D020C en Figure 63). On peut voir aussi quelques microfibrilles de cellulose directement accessibles.

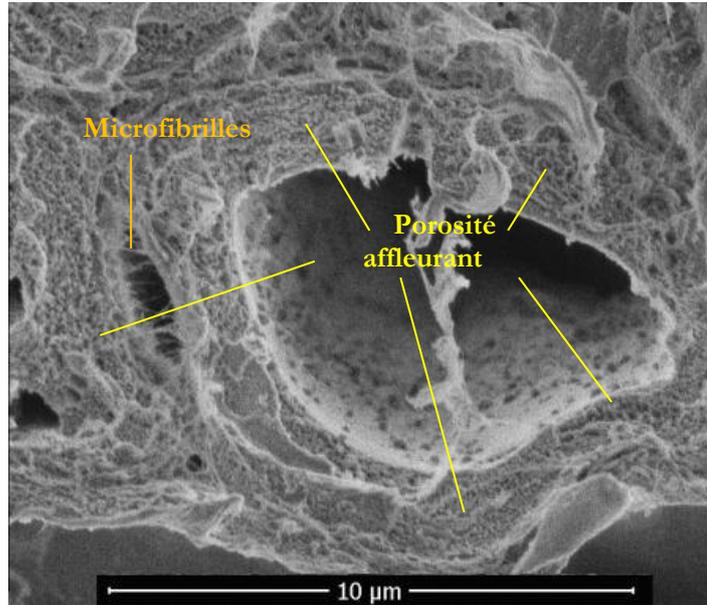


Figure 63 : Exemple de cliché montrant une porosité visible pour l'échantillon D020C dans une paroi secondaire

La fragmentation et la création de rugosité (à sévérité supérieure à 3,2), de même que la porosité intraparois (visible à une sévérité de 3,1), laissent présager une augmentation de la surface accessible aux enzymes sur ces plages de sévérité, comparativement à la paille native ou à des prétraitements plus doux.

c. L'état de porosité

L'effet du prétraitement à l'acide dilué et de ses conditions opératoires sur l'état de porosité (ou "texture") des substrats a été étudié grâce à l'analyse de physisorption d'azote.

Le traitement à l'acide dilué engendre plusieurs effets directs sur la biomasse lignocellulosique. D'après la littérature, une conséquence principale sur les propriétés du substrat est l'augmentation de la surface spécifique par l'élimination des hémicelluloses, et de ce fait la surface accessible et le volume poreux sont en lien direct avec la sévérité des prétraitements [107,117]. Dans le cadre de cette étude, les différentes pailles de blé prétraitées par prétraitement à l'acide dilué ont été analysées par physisorption d'azote. La surface spécifique BET a été tracée en Figure 64 en fonction du facteur de sévérité du prétraitement (à 140 °C).

Le volume poreux, défini comme le volume maximal adsorbé à $P/P_0=1$, est ici linéairement et directement corrélé à la surface BET (Annexe 1), sur l'ensemble des échantillons analysés. Ainsi, toute lecture d'une surface BET peut s'interpréter comme celle d'un volume poreux moyennant un facteur de proportionnalité. La surface BET augmente de 1 à 10 m²/g lorsque le facteur de sévérité augmente de 0 à 3, avant un effondrement de la surface spécifique à environ 4 m²/g pour une sévérité de 3,2 (Figure 64). Enfin, un prétraitement encore plus sévère entraîne une augmentation significative de la surface spécifique de 4 à 25 m²/g pour une sévérité évoluant de 3,2 à 4,5.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

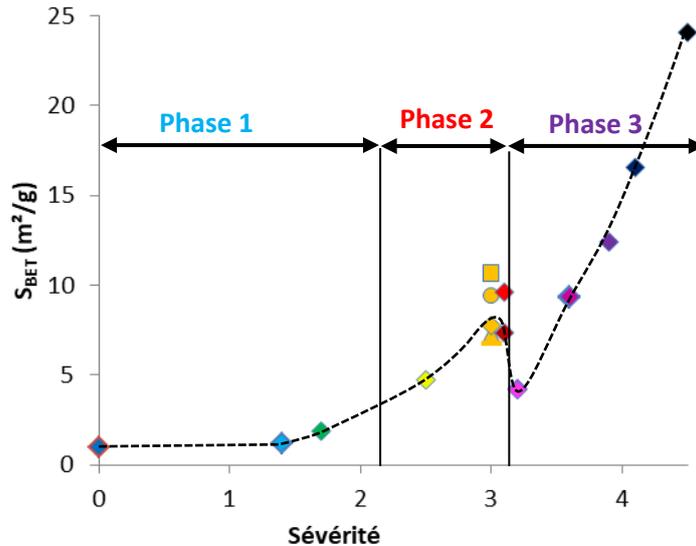


Figure 64 : Evolution de la surface BET en fonction de la sévérité du prétraitement

La Figure 65 représente l'évolution de la surface spécifique en fonction de la température du prétraitement ou en fonction du temps de séjour. On constate que pour un temps donné de prétraitement, l'augmentation de température provoque toujours une augmentation de la surface BET, alors que selon la température (à 140 °C par exemple), l'augmentation du temps de séjour ne se traduit pas nécessairement par une augmentation de cette surface. **En ce sens, la notion de sévérité de prétraitement est critiquable puisque la température et le temps de séjour à facteur identique de sévérité n'ont pas la même influence sur la surface BET.**

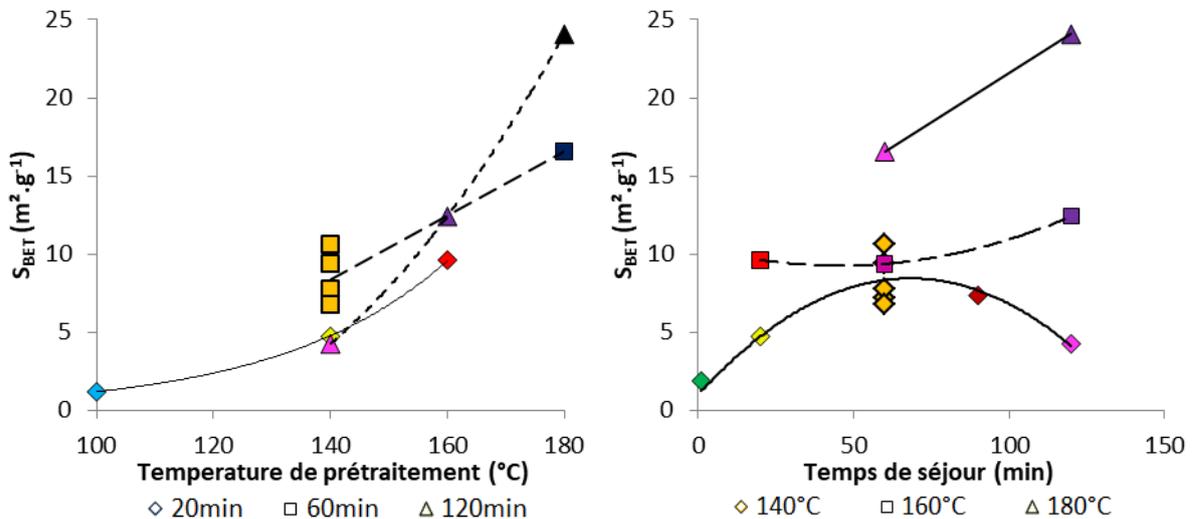


Figure 65 : Evolution de la surface BET en fonction de la température (à gauche) de prétraitement et du temps de séjour (à droite)

A ce stade, on suggère que pour des temps de séjour long (>60 min), la lignine qui s'est regroupée en gouttes par l'effet de l'hydrolyse des hémicelluloses, se redistribue progressivement et imprègne les pores créés, par simple phénomène de diffusion (une espèce mobile a tendance à migrer dans un milieu pour tendre vers une concentration homogène dans l'espace) et par capillarité. Si cette hypothèse est vraie, les plus petits pores devraient d'abord être comblés et les pores de grande dimension devraient être en proportion, plus présents, pour les échantillons concernés (en particulier l'échantillon C120C, traité à 140 °C pendant 120 min). Ce phénomène supposé expliquerait de ce fait la diminution de la surface accessible pour les longs temps de séjour à cette température. A plus haute température, ce phénomène ne

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

peut pas avoir lieu puisque d'autres modifications majeures sont à l'œuvre (hydrolyse/déshydratation de la cellulose, création de produits de dégradations solides).

A partir du modèle BJH [146] réalisé sur les branches de désorption de l'isotherme, il est possible d'obtenir une distribution en tailles de pores (Figure 66). Sur les courbes de distributions en tailles de pores, nous pouvons constater que le pic maximum de la distribution est généralement situé autour de 8,5-13 nm pour tous les échantillons. Ces pores ont des dimensions similaires aux diamètres des microfibrilles de cellulose. L'augmentation du nombre de pores lorsque les conditions opératoires sont plus sévères, suggère que des modifications ont lieu à l'échelle des microfibrilles, par exemple lors de l'hydrolyse des hémicelluloses qui recouvrent ces microfibrilles, et laissent des vides (pores) entre les microfibrilles au moment de leur retrait. Ces pores sont peu présents à l'état natif lorsque les hémicelluloses les occupent, mais deviennent de plus en plus abondants avec la sévérité du prétraitement. Excepté pour une sévérité égale à 4, le diamètre au maximum de la distribution demeure inchangé quelle que soit la sévérité du prétraitement, contrairement à la surface BET. L'augmentation du volume poreux pourrait donc être attribuée à la création de nouveaux pores (hydrolyse des hémicelluloses par exemple), et non à l'élargissement des pores existants. L'échantillon traité pendant 120 min à 140 °C (courbe mauve) a son maximum de distribution légèrement décalé (vers 17 nm) par rapport au reste des échantillons traités avec des sévérités de prétraitement proches, ce qui tend à renforcer l'hypothèse d'une relocalisation de la lignine dans le tissu par diffusion et capillarité, préférentiellement dans les petits mésopores (entre 2 et 15 nm).

A partir de sévérités supérieures ou égales à 3,2, la distribution en tailles de pores semble devenir multimodale, avec l'apparition de nouveaux pores (30 – 72 nm). Il semble donc que pour les hautes sévérités, il y ait un autre phénomène qui se produise et qui engendre la création de pores plus larges. En première approche, on peut évoquer l'influence possible de la solubilisation d'une partie de la cellulose, et de la formation d'humines provenant de la condensation de produits de dégradation des polysaccharides.

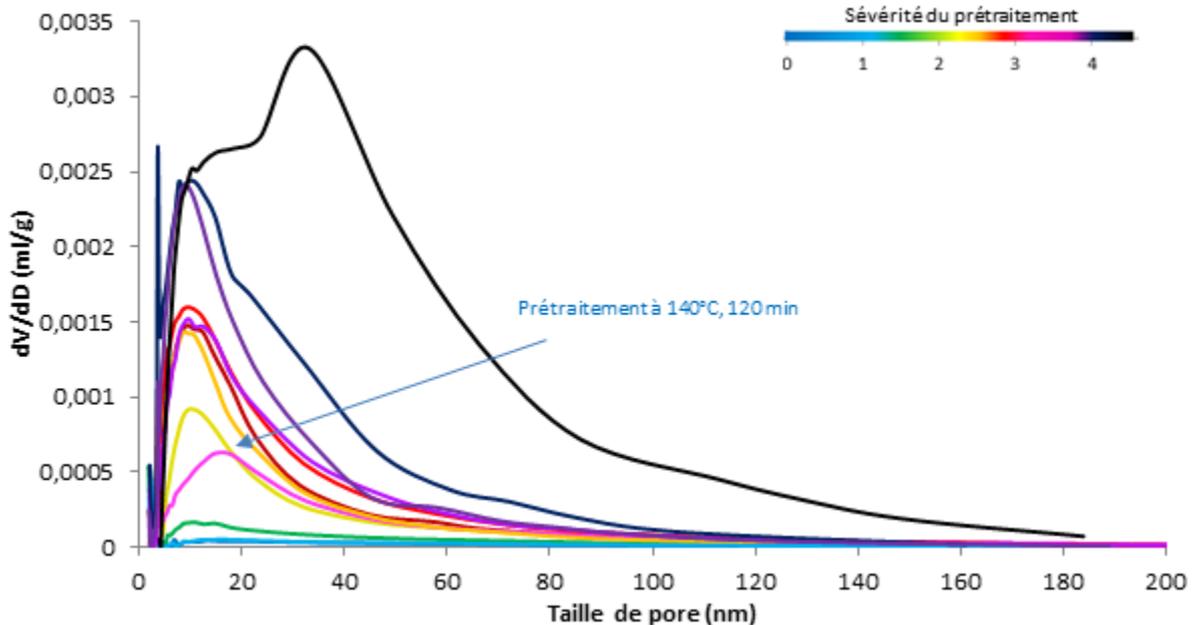


Figure 66 : Distributions en taille moyennes de pores, sur le modèle BJH en désorption

Suite aux différents résultats obtenus, le scénario suivant permettant d'expliquer l'évolution particulière de la surface spécifique suivant la sévérité du prétraitement peut être proposé. Lorsque les hémicelluloses sont encore présentes (phase 1 et 2 principalement), l'augmentation de la surface BET et du volume poreux avec la sévérité du prétraitement s'explique majoritairement par la solubilisation des hémicelluloses qui laisse des vides au sein de la matrice lignocellulosique, et ainsi une surface accessible plus importante. La Figure 67 conforte ce raisonnement avec l'évolution de la surface BET en fonction du taux d'hémicelluloses restant dans la matrice lignocellulosique. Toutefois des différences significatives de

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

surface BET entre deux échantillons qui ont des taux d'hémicelluloses très proches (notamment aux environ de 5 % pds) subsistent, signe que d'autres facteurs jouent sur la surface accessible à cette échelle.

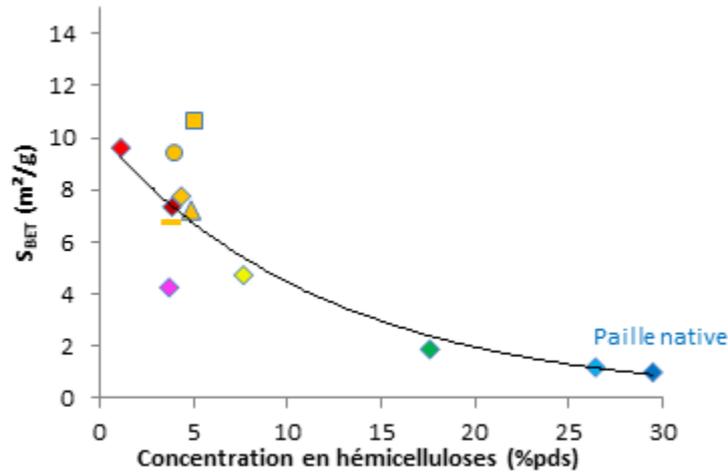


Figure 67 : Evolution de la surface BET en fonction du taux d'hémicelluloses

Il est possible que lorsque le temps de séjour est suffisamment long, la lignine qui s'était réorganisée en gouttes compactes suite à l'hydrolyse des hémicelluloses, se relocalise ensuite partiellement dans une partie de la porosité, ce qui a pour effet de diminuer le volume poreux et la surface BET. Cette relocalisation peut avoir lieu par simple effets de diffusion et de capillarité, de telle sorte que la teneur en lignine dans les parois s'homogénéise progressivement. La diminution de la surface BET suite à une augmentation de la sévérité du prétraitement est également référencée dans la littérature [117] sans être néanmoins précisément expliquée. Lorsque les temps de séjours sont plus courts, la perte de surface accessible n'aurait pas lieu car la relocalisation de la lignine dans les pores des parois n'aurait pas le temps de se faire, la lignine resterait donc sous forme coalescée, regroupée de manière compacte, notamment en gouttes visibles en surface.

Lorsque le prétraitement est très sévère (phase 3), les hémicelluloses ne sont plus présentes, mais la porosité continue d'évoluer, par une altération profonde du substrat, à travers une hydrolyse significative de la cellulose, et la formation de produits solides de dégradation (humines, ou pseudo-lignine), ce qui rend le substrat particulièrement fragmenté, avec un état de porosité spécifique à cette nouvelle physicochimie : plus grande surface accessible et plus grande taille de pores.

Des analyses chimiques des échantillons produits à forte sévérité pourront permettre de mieux comprendre l'origine de ce nouvel état de porosité en attestant notamment de la présence de nouveaux composés, issus de la dégradation des polysaccharides.

d. Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique

La surface spécifique mesurée par physisorption d'azote est une surface totale. Ainsi, aucune notion d'ordre chimique n'est prise en compte dans ce paramètre. Il n'est donc pas possible de savoir si la surface générée par le retrait des hémicelluloses est une surface cellulosique *a priori* bénéfique vis-à-vis de l'hydrolyse de la cellulose par les enzymes, ou ligneuse et donc inutile voire délétère pour l'hydrolyse enzymatique. Afin de répondre à cette question, la microscopie confocale a été employée.

Trois échantillons (A020C, C060C et D020C) ont été imagés après un marquage à la safranine. Grâce à ce marquage, la cellulose et la lignine sont distinguées par leur longueur d'onde d'émission de fluorescence qui diffère. Le rouge a été choisi pour représenter la lignine, et le vert la cellulose. Les images mosaïques pour chaque échantillon sont présentées sur la Figure 68. On remarque que la proportion de rouge (i.e. de lignine) est beaucoup plus présente chez l'échantillon A020C que chez l'échantillon C020C, elle-même

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

plus présente que chez l'échantillon D020C. La proportion relative de surface cellulosique semble donc être augmentée avec l'élévation de la température du prétraitement (et donc de la sévérité). On constate aussi que l'augmentation de l'intensité de fluorescence de la cellulose sur les tissus lignifiés n'est pas uniforme (voir pour l'échantillon D020C le fragment de parenchyme lignifié resté complètement rouge à droite du centre de l'image).

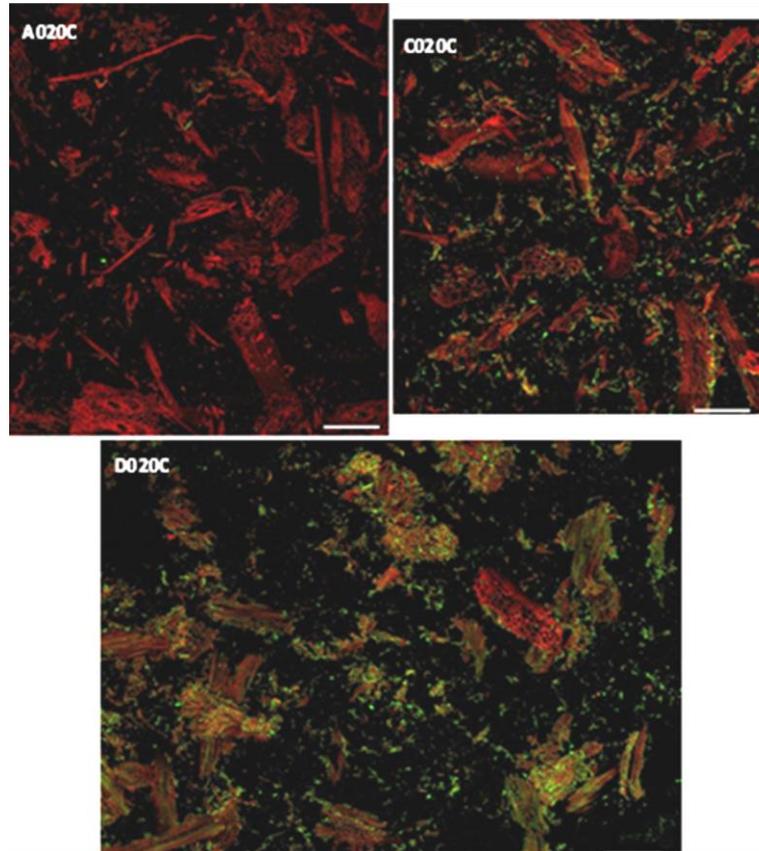


Figure 68 : Exemple de mosaïques d'image des 3 échantillons A020C, C020C, et D020C, en microscopie confocale à balayage laser, avec marquage à la safranine. La couleur rouge revient à la lignine marquée, et la couleur verte revient à la cellulose marquée. Fluorescence de la lignine : 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm), Fluorescence de la cellulose : 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm). Barre d'échelle : 300 μm

En calculant le ratio de l'intensité moyenne et relative de la cellulose ou de la lignine des mosaïques, on peut estimer de manière un peu plus quantitative la prédominance de la cellulose ou de la lignine en termes d'accessibilité immédiate au milieu extérieur (et donc vraisemblablement, aux enzymes). On trace cette grandeur en fonction de l'abondance relative en cellulose par rapport à la lignine (Figure 69a), de la surface BET (Figure 69b), et de la sévérité (Figure 69b). On constate :

- qu'il ne semble pas y avoir de lien direct entre la chimie accessible en surface et les analyses chimiques de volume, ce qui suggère que la répartition de ces composés, en particulier de la lignine, varie grandement d'un échantillon à l'autre. Beaucoup plus étalée en surface à faible sévérité, elle est regroupée de manière compacte en des zones précises à plus forte sévérité, ce qui reste cohérent avec les précédentes caractérisations et interprétations.
- que l'accessibilité de la cellulose est en lien direct avec l'augmentation de la surface BET. Ceci signifie que la surface créée à l'occasion de l'hydrolyse des hémicelluloses, est principalement cellulosique.
- que la cellulose est de plus en plus accessible lorsque la sévérité de prétraitement augmente (sur cette plage de sévérité tout du moins).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

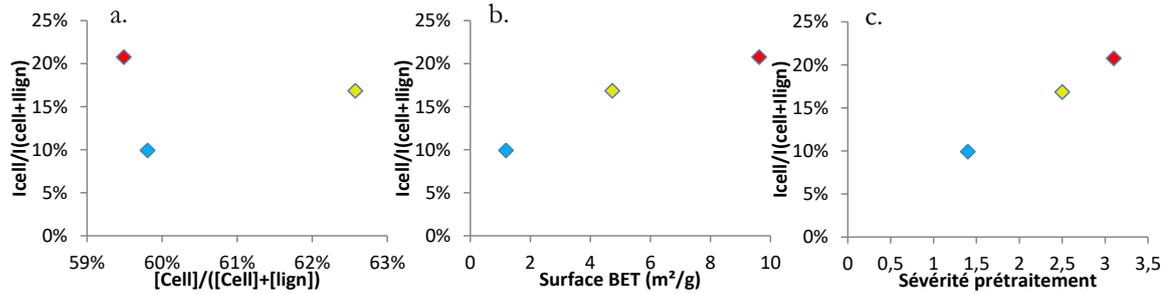


Figure 69 : Intensité moyenne et relative de la fluorescence de la cellulose (marquée), en fonction de la teneur relative en cellulose (a, à partir des analyses chimiques), de la surface BET (b), et de la sévérité(c)

Enfin, les observations microscopiques montrent aussi la présence des particules déstructurées (sans structure tissulaire ou cellulaire identifiable) pour l'échantillon C020C, prétraité à une température de 160 °C (Figure 70). Cette zone est constituée d'un amas de filaments cellulosiques et ligneux spatialement distincts les uns des autres. On s'attend donc à une bonne accessibilité de la cellulose dans ces zones-là, et à une hétérogénéité de la dégradation de ces particules, selon que la zone soit cellulosique ou ligneuse.

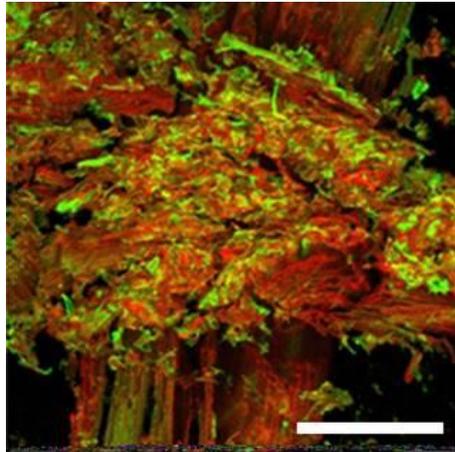


Figure 70 : Caractéristiques physicochimiques mesurées, sur un lot réduit d'échantillons

Le point important à retenir sur cette étude, est l'indépendance qu'il existe entre la chimie de surface, donc directement accessible aux enzymes, et la chimie de volume, qui est classiquement déterminée. En particulier, ces observations montrent qu'à faible sévérité, la lignine, bien que représentant moins d'un tiers (en poids) de la biomasse entière, recouvre complètement les tissus lignifiés, rendant inaccessible la plus grande proportion de la cellulose pourtant présente. A l'inverse, on montre que pour des conditions opératoires plus classiques (facteur de sévérité de 3,1), la distribution de la lignine se fait de manière beaucoup plus localisée, en dépit d'une proportion plus importante (en poids) de la lignine.

e. Les modifications des propriétés chimiques

i La composition chimique par analyse chimique et spectroscopie infrarouge

L'analyse par infrarouge a été utilisée pour trois raisons :

- Retrouver qualitativement les évolutions chimiques provoquées par le prétraitement à travers l'observation de bandes d'absorption plus ou moins spécifiques
- Réaliser un classement des échantillons sur la base de leurs propriétés spectrales par Analyse en Composantes Principales (ACP) qui soit fidèle à la sévérité de prétraitement associée à chaque échantillon

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

- Pouvoir déterminer la composition des échantillons à partir d'une signature spectrale FTIR, par régression PLS (*Partial Least Square Regression*), et notamment discriminer dans la fraction non polysaccharidique, la part de lignine et la part des produits solides de dégradation des polysaccharides, appelés pseudo-lignine ou encore humines

Analyse qualitative des spectres IR

Les spectres IR obtenus sur les différents échantillons sont reportés sur la Figure 71. On remarque un certain nombre de différences entre les échantillons, au niveau des bandes spectrales d'absorption dont les attributions sont connues (soit par analyse de composés modèles en interne et préalablement à cette étude, soit par l'apport de la littérature [253–260]). Les premières sont relatives à la présence d'hémicelluloses, et sont donc de moins en moins présentes lorsque la sévérité du prétraitement augmente. On peut citer par exemple :

- La bande à 1730 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements acetyls liés aux hémicelluloses, mais aussi aux groupements féruloyle et *p*-coumaroyl liés par une liaison ester entre les hémicelluloses et la lignine. Sa diminution à mesure que la sévérité du prétraitement augmente est donc représentative de la perte des hémicelluloses
- La bande à $1240\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ est attribuée à l'élongation des groupements acétyls branchés sur les hémicelluloses. Là aussi, leur diminution traduit simplement l'hydrolyse des hémicelluloses d'autant plus importante que le prétraitement est sévère

D'autres bandes sont relatives à la présence de lignine, elles augmentent donc progressivement au fil de l'augmentation de la sévérité du prétraitement. On retrouve par exemple :

- La bande à 1510 cm^{-1} qui est attribuée à l'élongation de la liaison C=C dans le cycle phénolique
- Les bandes à 1457 et 1420 cm^{-1} sont attribuées aux déformations CH et CH₂ dans les cycles phénoliques

D'autres apparaissent à très forte sévérité (facteur supérieur à 3,2) et semblent donc caractéristiques des humines [96] :

- La large bande à 1700 cm^{-1} est attribuée de manière générale aux groupements carbonyles. La lignine pure possède aussi souvent un épaulement vers ce nombre d'onde par la présence de cétones notamment lorsque la lignine est traitée en milieu acide, mais n'est ici pas gênant. Cette bande caractéristique est le témoin principal de la présence d'humines
- La bande à 1600 cm^{-1} est attribuée aux liaisons C=C. Cette bande n'est cependant pas spécifique, car, à proximité, la lignine répond aussi par une contribution du squelette aromatique et des vibrations des liaisons C=O

Enfin, d'autres bandes sont relatives à la présence des polysaccharides de lignocelluloses de manière générale : la bande à 896 cm^{-1} est attribuée à la vibration de la liaison β -glycosidique entre pentoses ou hexoses. De fait les hémicelluloses comme la cellulose présentent une absorption à cette longueur d'onde (mais pas l'amidon, dont les liaisons diffèrent).

Peu de bandes sont spécifiquement relatives à la présence de cellulose. On peut citer la petite bande à 1200 cm^{-1} qui devient de plus en plus présente à mesure que la sévérité du prétraitement augmente, jusqu'à une sévérité de 3-3,1, là où la teneur en lignine est maximale (suite à l'hydrolyse des hémicelluloses, et avant l'hydrolyse de la cellulose). Cette bande diminue ensuite, lorsque la déshydratation et l'hydrolyse de la cellulose devient significative. Cependant cette bande n'est pas spécifique car à très haute sévérité (autour de 4 et plus), une bande apparaît pratiquement au même niveau.

De manière moins spécifique, on peut aussi citer la présence du grand massif des sucres, entre 1170 et 920 cm^{-1} . Ce massif tend à diminuer à mesure que le prétraitement hydrolyse les polysaccharides (d'abord les hémicelluloses, ensuite la cellulose).

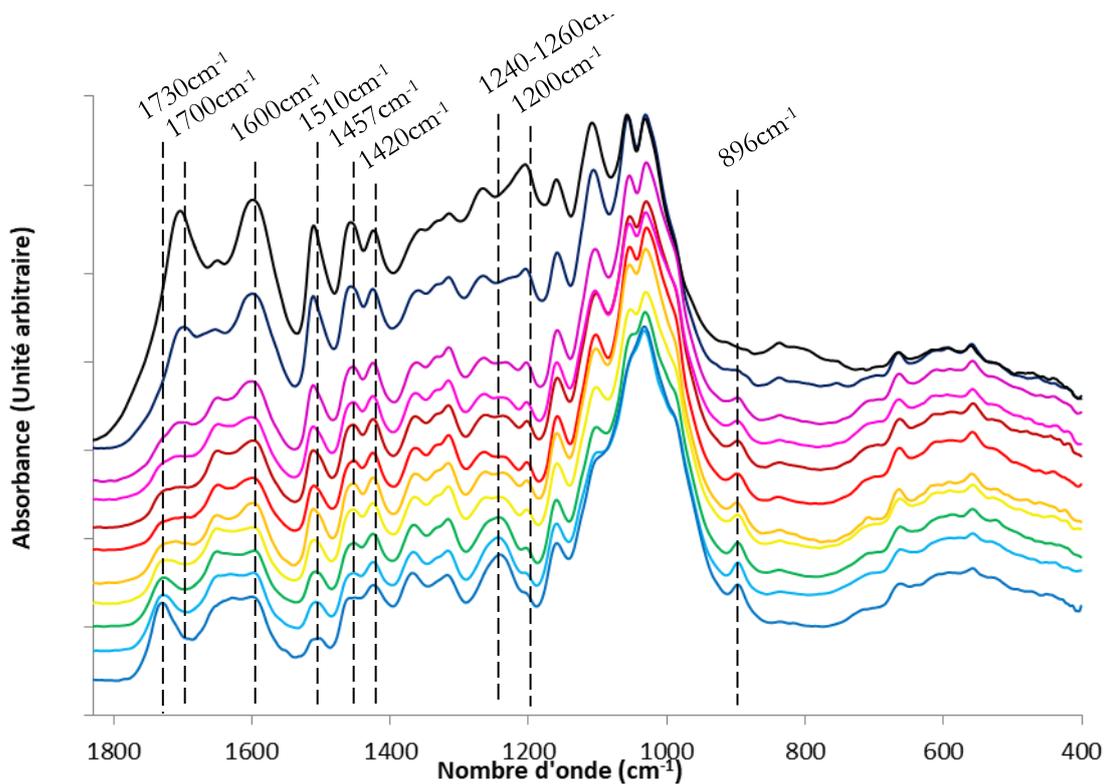


Figure 71 : Spectres moyens IR sur la zone 1850-400 cm^{-1} des échantillons de l'étude du prétraitement à l'acide dilué

Classement des échantillons par Analyse en Composantes Principales

Une ACP centrée a été réalisée sur les spectres FTIR, après un prétraitement de type SNV (*Standard Normal Variate*) et une dérivation première des spectres corrigés *via* OMNIC® du fond atmosphérique, du signal du CO₂ et de l'eau, ainsi que d'une correction ATR. Les zones spectrales 4000-3800 cm^{-1} , 2700-1800 cm^{-1} , et 500-400 cm^{-1} , ont été retirées de l'exploration, car elles contiennent une variabilité résiduelle liée à l'atmosphère (CO₂ et H₂O notamment). Le prétraitement SNV est utilisé pour réduire d'une part les variations de l'intensité générale des spectres, et d'autre part pour réduire la variabilité due à des phénomènes physiques tels que la diffusion. La projection des spectres individuels des différents échantillons sur les deux premières composantes principales est présentée sur la Figure 72 (à gauche). Vu les chevauchements présents, on représente sur la Figure 72b (à droite) les projections des spectres moyens, pour plus de clarté. La CP1 exprime 55 % de la variance, et la deuxième composante exprime 13 % de la variance.

On constate que les échantillons sont relativement bien discriminés les uns des autres, et que ce classement est cohérent : la proximité des échantillons est dépendante de la proximité des facteurs de sévérité avec lesquels ils ont été produits. La composante CP1 discrimine clairement la sévérité du prétraitement : à l'extrême droite est présente la paille native (projetée à 0,33), suivie en allant vers la gauche par les prétraitements aux plus faibles sévérités (phase 1, projetés autour de 0,23), puis aux sévérités intermédiaires (phase 2, au milieu, projeté entre 0 et 0,2), et enfin de plus en plus à gauche, les échantillons traités avec des sévérités de plus en plus extrêmes (à gauche, phase 3, projetés entre 0 et -0,73). La composante CP2 semble discriminer plus sur la teneur en cellulose : la paille native et les échantillons produits à sévérité extrême qui présentent tous une teneur réduite en cellulose, sont tous placés en bas (projections sur CP2 négatives), alors que les échantillons de la phase 2 qui présentent les plus fortes teneurs en cellulose, sont placés tout en haut de la projection (projections sur CP2 nulles ou positives).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

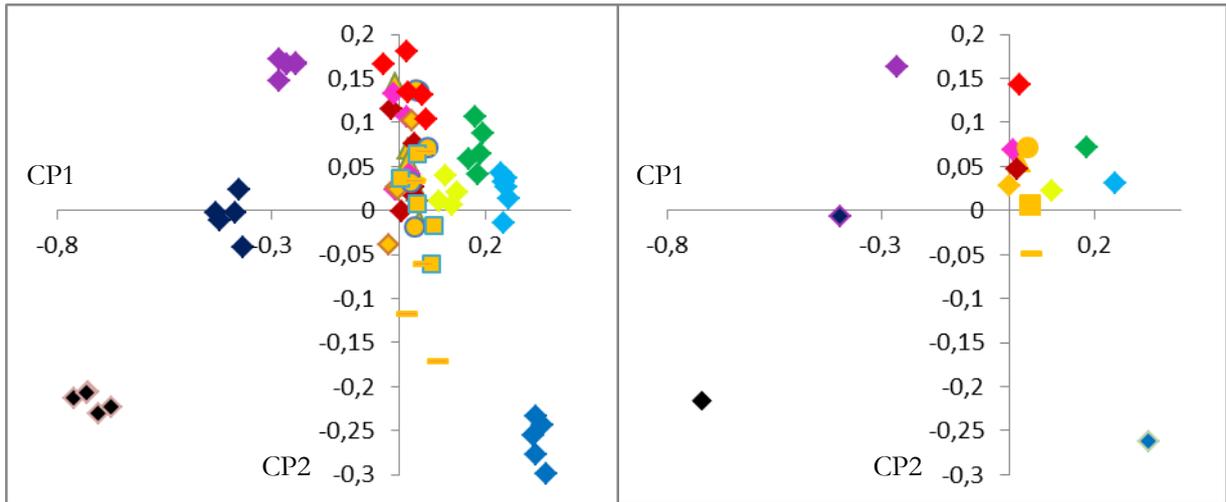


Figure 72 : Projection des différents spectres des échantillons sur les deux premières composantes principales (gauche), et projection des moyennes sur ces mêmes composantes (droite)

Pour voir comment est réalisée la discrimination des échantillons, on regarde l'expression des vecteurs que sont les deux premières composantes principales. Il faut cependant préciser que l'ACP a été faite sur des spectres dérivés, ainsi, l'interprétation directe des composantes principales n'est pas immédiate. Par exemple, les bandes d'absorption des spectres non dérivés correspondront aux endroits où les composantes principales (issues de l'ACP sur spectres dérivés) sont décroissantes et s'annulent. Pour faciliter les attributions et les interprétations, les primitives des deux premières composantes principales sont présentées sur la Figure 73, c'est-à-dire les courbes dont les dérivées donnent les 2 composantes principales. Pour la CP1, les bandes des humines (1700 et 1600 cm^{-1}) sont présentes avec les bandes de la lignine (notamment le triplet caractéristique 1510, 1457, et 1420 cm^{-1}), ce qui explique pourquoi cette composante discrimine négativement les échantillons sur la base de la sévérité du prétraitement (la lignine et les humines sont de plus en plus présentes à mesure que les polysaccharides sont hydrolysés/dégradés). Pour la primitive de la CP2, les bandes de la lignine sont absentes, mais celles des humines sont présentes (le doublet caractéristique 1700 et 1600 cm^{-1} , bien que légèrement décalé), avec aussi une bande caractéristique des hémicelluloses vers 1240 cm^{-1} . Il semble que la bande à 1720 cm^{-1} soit un mélange de la bande à 1700 cm^{-1} des humines, et de la bande à 1730 cm^{-1} des groupements acétyls fixés sur les hémicelluloses. Le fait que cette composante renvoie négativement à la fois à des bandes d'absorption relatives aux humines et aux hémicelluloses, explique le classement opéré par cette composante, avec les échantillons extrêmes et la paille native vers le bas, et les échantillons sans humines ni hémicelluloses vers le haut.

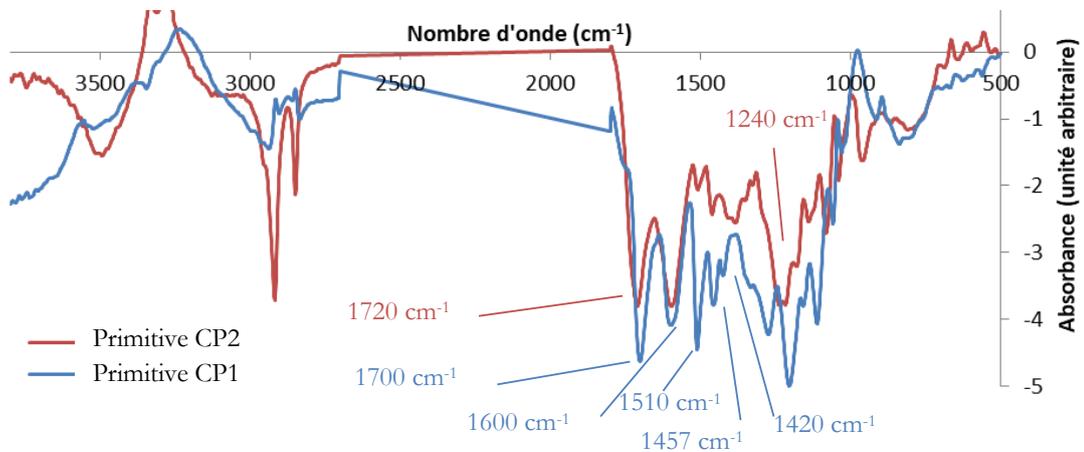


Figure 73 : Coordonnées des deux premières composantes principales

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

Grâce à cette ACP, il est possible de classer de manière cohérente le jeu d'échantillons de cette étude sur la base des spectres infrarouges. Ce classement exprime les modifications chimiques provoquées par le prétraitement, et donc aussi le facteur de sévérité du prétraitement. L'interprétation complète des composantes principales qui permettent de discriminer les échantillons peut rester cependant délicate en l'absence d'expériences, par le fait que cette analyse d'exploration n'est pas orientée, et peut coupler plusieurs contributions sur une même composante principale (humines et lignine par exemple, ou humines et hémicelluloses), d'où l'intérêt de considérer maintenant la régression PLS notamment pour espérer distinguer à haute sévérité la lignine des humines.

Composition chimique à partir des spectres FTIR par régression PLS

La régression PLS, présentée ici, vise à calibrer la teneur en hémicelluloses, cellulose, polysaccharides, à partir des teneurs déterminées par méthode chimique (dosage en voie humide). Par soustraction, on espère pouvoir déterminer un taux d'humines présentes dans la matrice, lorsque la sévérité du prétraitement le permet.

Pour réaliser cette régression, les zones spectrales de travail optimales ont d'abord été déterminées :

- 790-1850 cm^{-1} pour la cellulose, les hémicelluloses, et les polysaccharides
- 687-1790 cm^{-1} pour la lignine

Une normalisation SNV a été appliquée sur chaque spectre et spécifiquement sur chaque fenêtre spectrale. Un lissage de type Savitsky-Golay et une dérivation du premier ordre ont été finalement appliqués, avec une équation polynomiale du second degré sur une fenêtre de lissage de :

- 9 points pour la cellulose
- 7 points pour les hémicelluloses et les polysaccharides

Dans le cas de la lignine, l'équation polynomiale considérée est de degré 3, et la fenêtre de lissage est réalisée sur 11 points. Les régressions PLS ont été réalisées *via* la boîte à outils *PLS Toolbox*, du logiciel Matlab 9.3.

Pour réaliser la régression de la teneur en lignine, on a considéré que tant qu'aucune bande (ou épaulement) caractéristique des humines n'était visible sur le spectre infrarouge, la fraction non polysaccharidique se résumait à de la lignine. Ceci concerne les échantillons dont le facteur de sévérité de prétraitement ne dépasse pas 3,2. Au-delà, la fraction non polysaccharidique contient une proportion non nulle d'humines.

Pour calibrer le taux de lignine sur une plus large gamme de teneurs, nous avons produit à façon trois échantillons enrichis en lignine. Pour cela, l'échantillon C060C a été dopé avec de la lignine Protobind 1000 de blé. Trois enrichissements différents ont été réalisés : le premier échantillon est constitué de 40,8 % pds de lignine (lignine endogène + lignine Protobind), le deuxième est constitué de 47,03 % de lignine, et le dernier est constitué de 56,05 % pds de lignine.

Une fois la calibration effectuée, une validation croisée (en aveugle) a été effectuée. La Figure 74 présente les graphes de parité des 4 régressions réalisées (sur la cellulose, les hémicelluloses, les polysaccharides, et la lignine). La dispersion le long de la droite de parité est modérée, et la qualité de la corrélation est confirmée par le Tableau 18, qui précise les variables latentes utilisées pour prédire les teneurs en hémicelluloses, ainsi que les erreurs de corrélation et de validation croisée pour les 4 régressions.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

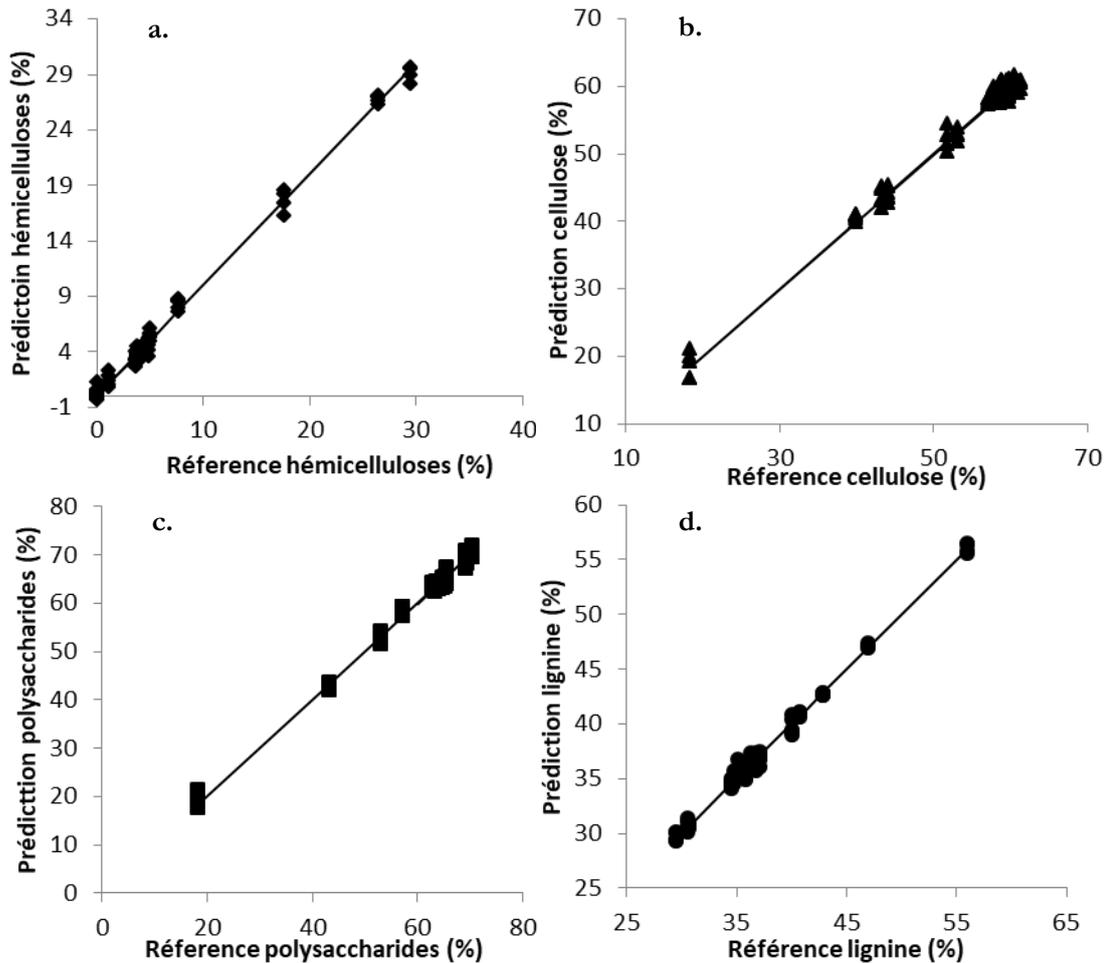


Figure 74 : Graphes de parité pour les 4 régressions effectuées sur les hémicelluloses (a), la cellulose (b), les polysaccharides (c), et la lignine

Tableau 18 : Erreur de calibration et de validation croisée, et variables latentes pour les 4 régressions effectuées

	Cellulose	Hémicelluloses	Polysaccharides	Lignine
RMSEC	0,7	0,5	0,5	0,52
RMSECV	1,1	0,7	0,9	1,16
Variables latentes	7	5	7	7

Pour les échantillons traités à une sévérité supérieure à 3,2, le taux d'humines peut être calculé de la manière suivante :

$$[Hum] = 100 - ([Lign] + [Poly])$$

[Hum], [Lign] et [Poly] étant respectivement les teneurs en humines, lignine et polysaccharides.

Ce calcul fait intervenir une soustraction et l'incertitude sur le taux d'humines cumule donc l'incertitude de la teneur en lignine et celle en polysaccharides. Le taux d'humines calculé par cette méthode est donc imprécis. Cela pose problème essentiellement pour les échantillons avec une faible teneur en humines. C'est pourquoi nous avons préféré nous baser sur l'évolution de la bande à 1700 cm⁻¹, caractéristique des humines, pour quantifier plus précisément l'évolution de la teneur en humines. En effet, même si un épaulement est observé vers 1710 cm⁻¹ pour la lignine de blé pure obtenue en milieu acide (propice à la formation de cétones absorbants vers 1710 cm⁻¹), cet épaulement demeure discret. On considère le rapport entre l'aire de la bande d'absorption à 1700 cm⁻¹ (intervalle d'intégration et ligne de base locale

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

définis de 1680 à 1726 cm^{-1}), et l'aire du massif défini par l'intervalle 400-1836 cm^{-1} (ligne de base locale et intervalle d'intégration). Les spectres considérés sont corrigés d'un fond atmosphérique, CO_2 et H_2O , et d'une correction ATR. La Figure 75 illustre un exemple d'intégration sur la bande à 1700 cm^{-1} .

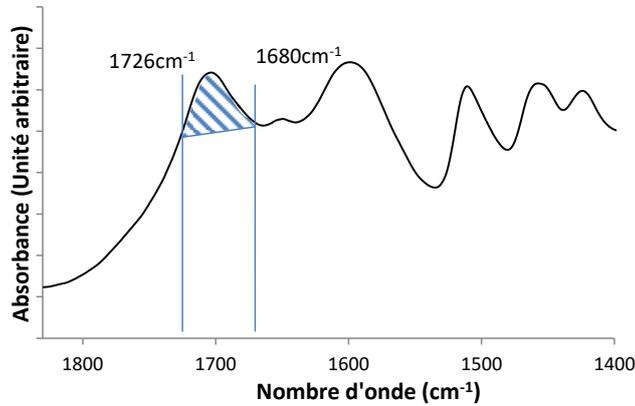


Figure 75 : Intégration de la bande à 1700 cm^{-1} , caractéristique des humines

La Figure 76 montre l'évolution de l'aire normalisée à 1700 cm^{-1} en fonction de la teneur en humines déterminée par soustraction à partir des régressions PLS. On s'aperçoit que l'aire normalisée des humines est bien plus sensible que la teneur en humines déduite par PLS. Il est d'ailleurs très probable que la teneur en humines soit de manière générale sous-estimée, au profit de la teneur en lignine.

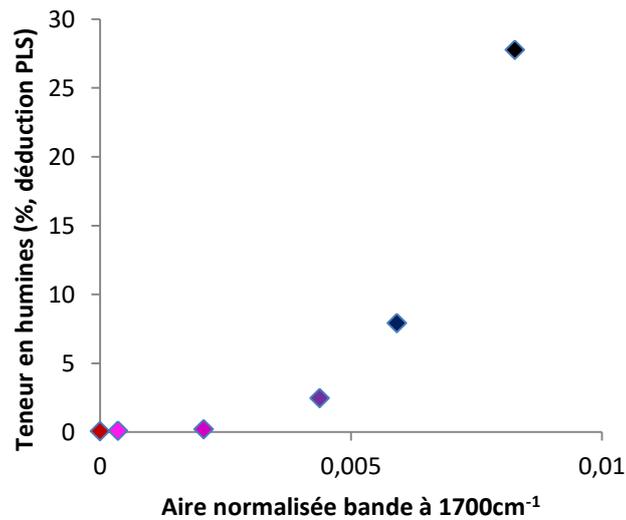


Figure 76 : Teneur en humines déduite par régression PLS en fonction de l'aire normalisée de la bande d'absorption à 1700 cm^{-1} , caractéristique des humines

Une régression empirique exponentielle entre cette aire normalisée A_{1700} et la teneur en humines déduite par PLS, de la forme $k_1 \cdot e^{k_2 \cdot (A_{1700} - k_3)}$ peut être obtenue en considérant uniquement les points non nuls par PLS :

$$[Hum] = 3,62 \cdot e^{471 \cdot (A_{1700} - 4 \cdot 10^{-3})} - 0,55 \quad \text{Équation (3)}$$

La Figure 77 montre le graphe de parité entre la teneur en humines calculée à partir de la régression empirique sur l'aire normalisée A_{1700} , et la teneur en humines déduite à partir des régressions PLS. La corrélation est satisfaisante et surtout, permettra de définir des quantités d'humines faibles (utiles au chapitre suivant).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

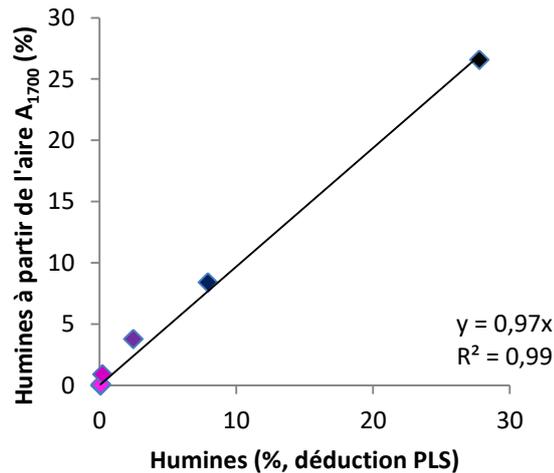


Figure 77 : Teneur en humines prédite à partir de l'aire normalisée en fonction de la teneur en humines déduite par PLS

L'évolution des teneurs en hémicelluloses, cellulose, lignine, et en humines, en fonction de la sévérité du prétraitement est représentée par la Figure 78. Les tendances observées précédemment sur la cellulose et les hémicelluloses sont bien évidemment les mêmes. Par contre cette approche permet de distinguer la partie lignine de la partie humines. Cette figure illustre bien le fait qu'en augmentant progressivement la sévérité du prétraitement, les hémicelluloses sont les premières à être touchées, suivies par la cellulose. La lignine, elle, est très stable (sa structure en revanche a changé), et son augmentation au cours de la sévérité traduit la perte progressive des polysaccharides. Cette figure illustre également l'emballement de la production d'humines à très forte sévérité, qui se forment à partir des produits de dégradation des polysaccharides.

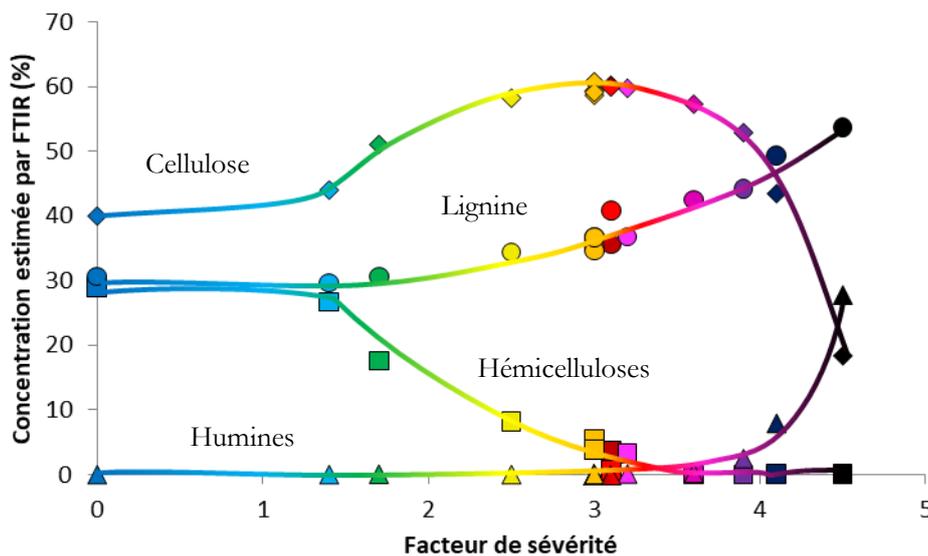


Figure 78 : Evolution de la composition chimique déterminée par FTIR en fonction du facteur de sévérité

La détermination de la concentration en humines reste empirique et pourrait donc être améliorée. La teneur en humines pourrait être calibrée de la même manière que pour les polysaccharides et la lignine. Pour cela, il faudrait fabriquer une base de données sur des substrats contenant différentes teneurs en humines. Celles-ci pourraient être produites à façon, à partir de cellulose, d'hémicelluloses ou de monomères de sucres comme cela a été réalisé dans la thèse de C. Loustau-Cazalet.

ii L'altération des propriétés d'autofluorescence

La biomasse lignocellulosique et en particulier la paille de blé présente un certain nombre de fluorophores comme les acides hydroxycinnamiques (AHC), la lignine, ou les protéines par exemple. Dans notre cas, les protéines sont présentes en très petite quantité et surtout de manière altérée (biomasse lignocellulosique fanée et vieillie, avec un taux en azote inférieur à 1 % [261]). La fluorescence observée provient donc principalement des acides phénoliques et des unités phénylpropanes de la lignine.

Dans cette étude, la caractérisation de la fluorescence a été entreprise via l'outil d'observation macroscopique d'autofluorescence UV-VIS de l'INRA. On rappelle que les images multispectrales acquises sont constituées de 4 images en couleur acquises avec les 4 cubes de filtres différents. Les images couleur sont constituées elles-mêmes de 3 canaux pour le rouge, le vert et le bleu. Au total, l'image multispectrale est donc constituée de 12 canaux.

Un exemple est donné pour la paille native, en Figure 79a. Pour chaque pixel de chaque mosaïque multispectrale, un "pseudo-spectre" de 12 valeurs peut être extrait et tracé. Ce pseudo-spectre correspond à l'intensité d'autofluorescence mesurée sur chaque canal successif pour chacune des 4 excitations. La moyenne de ces spectres sur une image mosaïque donne un profil moyen de fluorescence. Les différents profils sont présentés dans la Figure 79b. Quatre mosaïques ont été réalisées par échantillon, donnant donc 4 profils moyens de fluorescence par échantillon. Pour alléger les représentations graphiques, ce sont les profils moyens des 4 mosaïques de chaque échantillon qui sont considérés, et non pas chaque profil de chaque mosaïque (pour chaque échantillon, les profils des mosaïques sont homogènes). On constate que le prétraitement diminue fortement les intensités de fluorescence, quelles que soient les excitations ou les canaux.

Une analyse en composantes principales a été réalisée pour discriminer les différents échantillons à partir de leurs propriétés d'autofluorescence (Figure 79c et d). La première composante est une composante d'intensité (composante non nulle et de signe constant, Figure 79d), ce qui signifie que la plus grande variabilité entre les différents profils se fait sur l'intensité globale de fluorescence, tous canaux (et excitations) confondus. Ensuite, la deuxième composante oppose la fluorescence bleue et verte (par excitation UVs) avec la fluorescence rouge (par excitations verte), l'une associée à la fluorescence des AHC, l'autre associée à la lignine. Cela signifie que dépendamment des conditions opératoires, la fluorescence des AHC n'est pas altérée de la même manière que la fluorescence de la lignine.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

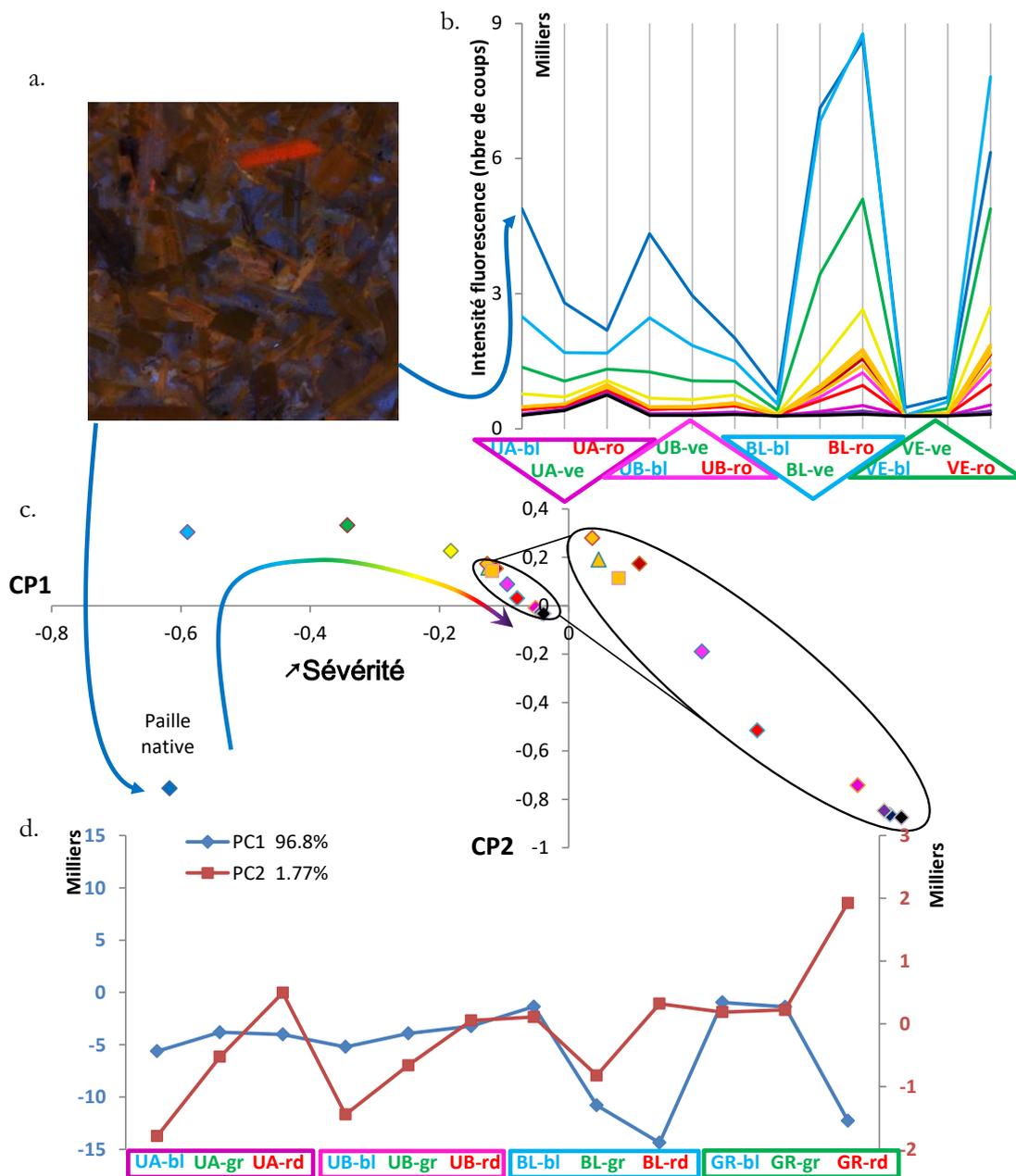


Figure 79 : a : Image multispectrale d'une acquisition sur paille native (superposition des 12 canaux) ; b : profils moyens de fluorescence par excitation (UVA, UVB, Bleue et Verte) et par canal d'émission (bleu, vert, rouge) ; c : positionnement des profils spectraux moyens des différents échantillons suivant les deux premières composantes principales ; d : projection des deux premières composantes principales

Plus précisément, par projection, on note que la fluorescence bleue est la plus touchée à faible sévérité (1,4), alors qu'à plus haute sévérité les deux fluorescences sont touchées, de manière d'autant plus prononcée que le prétraitement est rude. Pour la fluorescence rouge, l'altération semble survenir un peu plus tardivement, à partir d'une sévérité de prétraitement de 1,5. On vérifie cette affirmation en traçant la fluorescence bleue (par exemple par excitation UVB), et la fluorescence rouge (par exemple par excitation bleue) en fonction du facteur de sévérité (Figure 80). Les niveaux d'intensité n'évoluent plus significativement et sont d'ailleurs quasi nuls, à partir d'un facteur de sévérité de 3,5.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

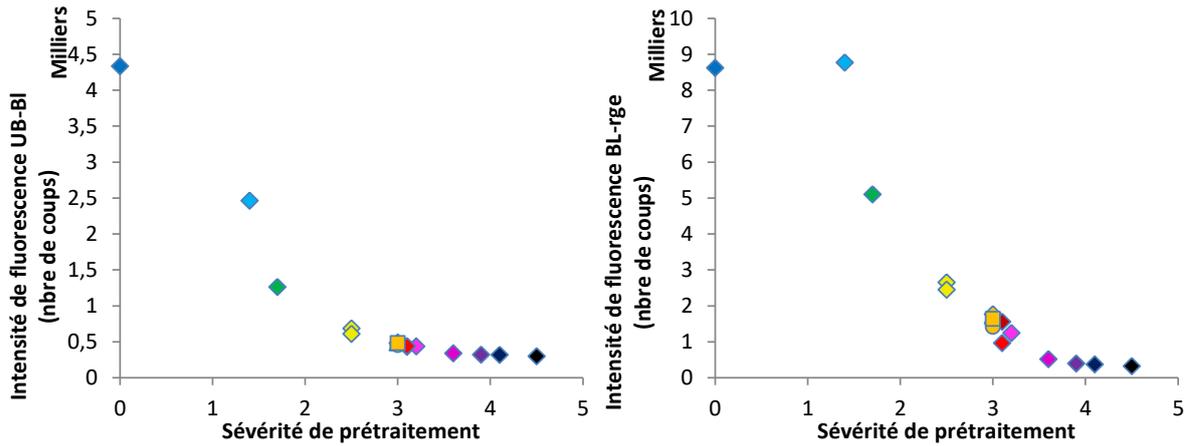


Figure 80 : Evolution de la fluorescence bleue par excitation UVB (gauche) et de la fluorescence rouge par excitation Bleue (droite), en fonction du facteur de sévérité du prétraitement

La fluorescence bleue est attribuée à la présence des acides hydroxycinnamiques fixés sur les hémicelluloses et sur la lignine, et la fluorescence rouge à la lignine elle-même (pour s'en convaincre, voir en Annexe 2, l'évolution de l'autofluorescence bleue et rouge mesurée à l'échelle de la paroi sur une section transversale de paille de blé). La Figure 81 montre d'ailleurs que l'évolution de l'intensité de fluorescence bleue (choisie ici par excitation UVB) est directement corrélée avec la concentration en hémicelluloses résiduelles non solubilisées contenues dans les substrats prétraités. La forte perte en fluorescence à conditions opératoires très douces suggère par ailleurs que les fluorophores sont altérés/éliminés avant que les hémicelluloses qui les supportent soient hydrolysées.

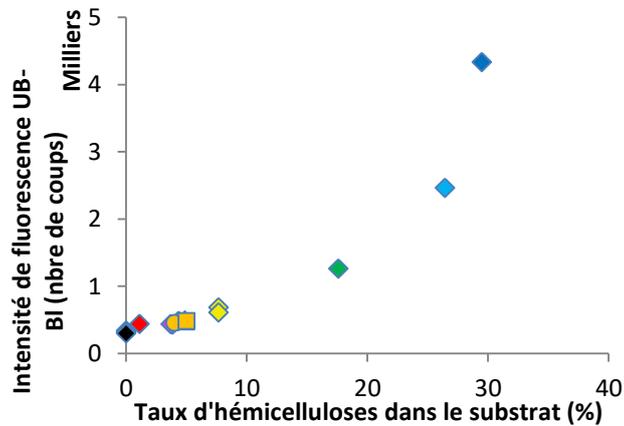


Figure 81 : Evolution de l'intensité de fluorescence bleue par excitation UVB, en fonction du taux d'hémicelluloses

De manière tout aussi intéressante, l'intensité de fluorescence rouge (provenant de la lignine), semble aussi dépendante de la teneur en hémicelluloses, et de manière linéaire (Figure 82, ici avec une excitation bleue), bien qu'il n'y ait *a priori* pas de lien direct entre les deux.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

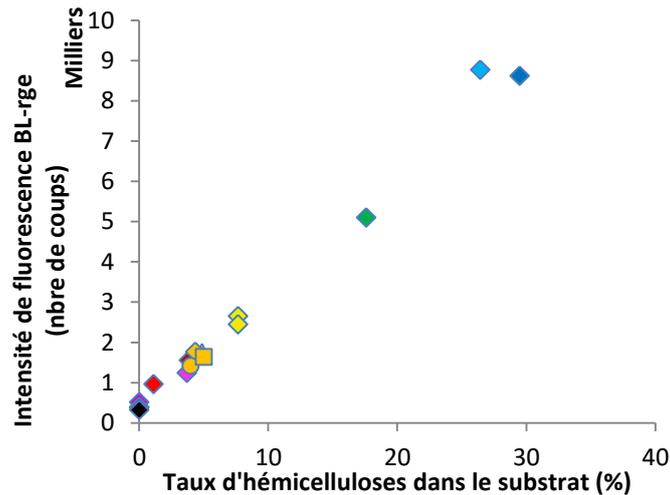


Figure 82 : Evolution de l'intensité de fluorescence rouge par excitation Bleue, en fonction du taux d'hémicelluloses

Si on se base sur les caractérisations et interprétations précédentes, on peut supposer que ce n'est pas seulement les fluorophores de la lignine (réputée stable thermiquement) qui sont altérés, mais également leur distribution spatiale. Celle-ci passe d'une distribution surfacique (et donc répondant fortement en autofluorescence) à une distribution localisée, compacte et donc avec une réponse très faible et une amplitude qui dépend du degré d'hydrolyse des hémicelluloses dans la matrice.

En conclusion, les propriétés de fluorescence permettent de rendre fidèlement compte de modifications physicochimiques pour des matrices traitées à des sévérités inférieures à 3,2. Ces évolutions sont largement liées à la disparition de fluorophores, et à la modification de leur distribution dans la matrice. A des sévérités plus élevées, la fluorescence est si faible que sa mesure devient de moindre utilité, et ne témoigne plus des modifications opérées par le prétraitement.

Perspectives sur l'analyse des images multispectrales

L'analyse de variabilité spatiale des profils en macrofluorescence dépendamment du prétraitement, représente un potentiel certain, vu la diversité des tissus natifs présents. Il devrait alors être possible de montrer la capacité du prétraitement à modifier et uniformiser (ou sa non capacité) les divers profils de fluorescence de la paille native. De plus, cela permettra de comprendre plus en détail et de manière plus spécifique l'effet du prétraitement sur les différents tissus, notamment le parenchyme riche en hémicelluloses caractérisé par une forte fluorescence bleue, et le sclérenchyme avec une forte lignification des parois apparaissant plus jaune.

iii L'indice de cristallinité de la cellulose

L'indice de cristallinité de la cellulose au sein des substrats prétraités a été mesuré par RMN du solide. Les indices sont tracés en fonction du facteur de sévérité sur la Figure 83. Il apparaît clairement que l'augmentation de la sévérité de prétraitement augmente la cristallinité de la cellulose du substrat. En particulier, entre deux facteurs de sévérité de 3 et 3,6, l'indice de cristallinité passe de 29 à 42 %. L'augmentation de la cristallinité s'explique par la solubilisation préférentielle de la cellulose amorphe en conditions acides (comparativement à la cellulose cristalline). Ce phénomène a déjà été recensé dans la littérature, avec la même hypothèse suggérée [100,117]. A partir d'une sévérité de 3,5-3,8, le retrait de la cellulose par hydrolyse et déshydratation de celle-ci, se poursuit indifféremment sur la fraction amorphe ou cristalline (indice de cristallinité de la cellulose constant).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

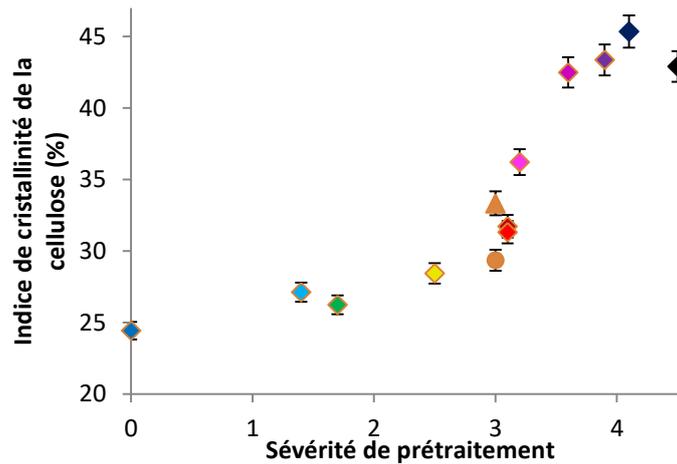


Figure 83 : Evolution de la cristallinité de la cellulose de la paille de blé en fonction de la sévérité combinée

f. Conclusion sur l'impact du prétraitement à l'acide dilué sur les substrats

Le rassemblement des données issues des différentes caractérisations mais également des informations de la littérature, permet de dresser le scénario probable des phénomènes mis en jeu par augmentation de la sévérité, du temps de séjour, et de la température du prétraitement.

A 100 °C (pendant 20 min, soit une sévérité de 1,4), les hémicelluloses ne sont pas encore significativement hydrolysées. De ce fait, la surface BET n'augmente pas de manière sensible. En parallèle, les acides hydroxycinnamiques présents sur hémicelluloses et la lignine sont altérés ou retirés, ce qui provoque une chute de la fluorescence dans le canal bleu après excitation UVB.

A 140 °C (temps de séjour testés de 1 à 120 min, soit une sévérité de 1,2 à 3,3), l'hydrolyse des hémicelluloses devient significative. Le taux de solubilisation augmente d'abord avec le temps de séjour, ce qui crée de la porosité. En effet, les hémicelluloses étant initialement présentes (avec la lignine) autour des microfibrilles de cellulose, leur retrait provoque à la fois l'exposition de la cellulose au milieu extérieur, mais encore une délocalisation d'une partie de la lignine ramollie, sous une forme compacte. A temps de séjour élevé, cette température ne suffit pas à solubiliser les hémicelluloses les plus stables (quelques pourcents résiduels), et de plus un phénomène intervient de tel sorte que la surface accessible diminue. On suggère un effet de relocalisation d'une partie de la lignine dans les pores créés plus tôt, par effet de capillarité et de diffusion (qui tend à homogénéiser la répartition de lignine dans la matrice. D'autres hypothèses ne sont pas écartées, comme la possibilité que les fibrilles désormais libres de cellulose se regroupent en agglomérats (état plus stable), ce qui diminuerait leur surface spécifique. L'altération ou élimination des AHC est quasi totale, et la lignine est fortement altérée, à en juger par l'autofluorescence de celle-ci qui est très réduite. Deux phénomènes semblent impliqués : l'altération des fluorophores, et la migration de la lignine en une structure moins distribuée en surface. A cette température, la production d'humines débute tout juste, pour le temps de séjour le plus long (120 min).

A 160 °C (temps de séjour testés de 20 et 120 min, soit une sévérité de 3,1 et 3,9), la solubilisation des hémicelluloses est totale. La cellulose commence aussi légèrement à se solubiliser si le temps de séjour est suffisant. Ce dernier devient une condition opératoire pouvant rapidement devenir un facteur d'excès de sévérité. Les humines sont formées suite à la polymérisation des produits de dégradation de la cellulose et des hémicelluloses. L'hydrolyse des fractions hémicellulosiques et cellulosiques augmente la surface accessible et le volume poreux, ce qui fragilise la matrice. Cela se traduit par la fragmentation conséquente des particules. La solubilisation des hémicelluloses libère dans un premier temps la cellulose, mais conduit rapidement à la formation des humines (à partir de 60 min). Dans un tel cas, l'état de porosité commence à changer de nature : des pores plus gros sont présents, et la surface accessible augmente fortement. Des

structures cellulaires et tissulaires résiduelles sont encore bien identifiées, mais beaucoup de tissus ont été complètement déstructurés. La fluorescence est tellement touchée qu'elle est à peine mesurable.

A 180 °C (60 et 120 min, soit une sévérité de 4,1 à 4,5), la production d'humines est significative, la matrice très fragile est fortement fragmentée, et présente une grande surface accessible. Ces modifications texturales sont vraisemblablement causées par la présence des humines déposées. La lignine résiduelle est aussi très altérée.

2. Effets de la détente explosive

L'effet de la détente explosive sur le substrat a aussi été étudié. Pour ce faire, la paille de blé a d'abord été traitée à l'acide dilué à différentes conditions opératoires : paille non traitée, 100 °C pendant 20 min, 120 °C pendant 20 min, 140 °C pendant 20 min, et 180 °C pendant 20 min pour une teneur en acide sulfurique de 1 % poids dans la liqueur d'imprégnation. Ensuite, une fois le substrat refroidi, l'acidité a été neutralisée par ajout de soude, pour éviter une éventuelle poursuite de l'hydrolyse des polysaccharides, en particulier des hémicelluloses. La paille traitée a ensuite été chauffée pour être mise sous pression et pouvoir réaliser des détentes explosives avec différentes amplitudes de dépressurisation choisies : 0 bar (aucune détente), 7 bar, 14 bar, et 20 bar. La température nécessaire à l'obtention de chaque pression est directement liée à la valeur de celle-ci, par l'eau liquide qui impose une pression de vapeur saturante en eau dans la phase gaz. On donne dans le Tableau 19 l'équivalence entre la température et cette pression.

Tableau 19 : Correspondance entre la pression dans l'unité et la température nécessaire à l'obtention de la pression, à saturation de la phase gazeuse en eau

Pression de vapeur saturante de consigne (bar)	7	14	20
Température équivalente (°C)	165	195	212

Ces températures sont élevées, et de fait, malgré l'absence d'acidité et des temps de séjour dans le réacteur d'explosion très courts, on peut redouter une évolution de la matrice lignocellulosique par cet effet de dégradation purement thermique, notamment concernant les hémicelluloses présentes, en plus de l'effet physique de la dépressurisation. On s'intéresse donc dans un premier temps aux compositions chimiques des différents substrats considérés, et à leur rendement en glucose à 72 h, pour vérifier ce point.

a. Rappel de la composition des substrats et du rendement en glucose dépendamment de la sévérité de prétraitement

La Figure 84 présente l'évolution de la composition chimique (teneur en hémicelluloses (a), cellulose (b), et donc en polysaccharides (c), et proportion de la fraction non polysaccharidique (d)), en fonction de la sévérité du prétraitement (à l'acide dilué) et de la pression de la détente explosive. Ces résultats ont été obtenus par des analyses chimiques (protocole d'hydrolyse acide suivi d'analyses chromatographiques de l'hydrolysât). L'utilisation du modèle de régression PLS (calibré sur les échantillons de l'étude du prétraitement à l'acide dilué), des spectres infrarouges, donne sensiblement les mêmes résultats qui ne seront pas présentés ici.

Les mêmes tendances sont observées que dans les cas des échantillons prétraités exclusivement à l'acide dilué : le taux d'hémicelluloses diminue à mesure que la sévérité du prétraitement augmente. La cellulose commence à être hydrolysée significativement seulement à haute sévérité, c'est-à-dire ici à une sévérité de 3,7 (échantillon E020V).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

Pour ce qui est de l'effet de la détente explosive, on constate que l'augmentation de la variation de pression provoque une perte partielle d'hémicelluloses pour les échantillons produits aux plus faibles sévérités, à savoir la paille native, les échantillons A020V et les échantillons B020V. L'effet est particulièrement visible pour une détente explosive de 20 bar, où la paille native est la plus impactée, suivi de l'échantillon A020V20, lui-même suivi par l'échantillon B020V20. Cela montre que la température a provoqué la poursuite de la réaction d'hydrolyse des hémicelluloses. On appelle par la suite cet effet "reprise d'hydrolyse", car il s'agit d'une hydrolyse secondaire des hémicelluloses. Lorsque ce phénomène est observable, l'effet physique de la décompression brutale ne peut être dissocié de la reprise d'hydrolyse qui précède. A plus haute sévérité et lorsque le taux d'hémicelluloses est faible (inférieur à 10 %, cas des échantillons C020V), la reprise d'hydrolyse ne semble pas avoir lieu.

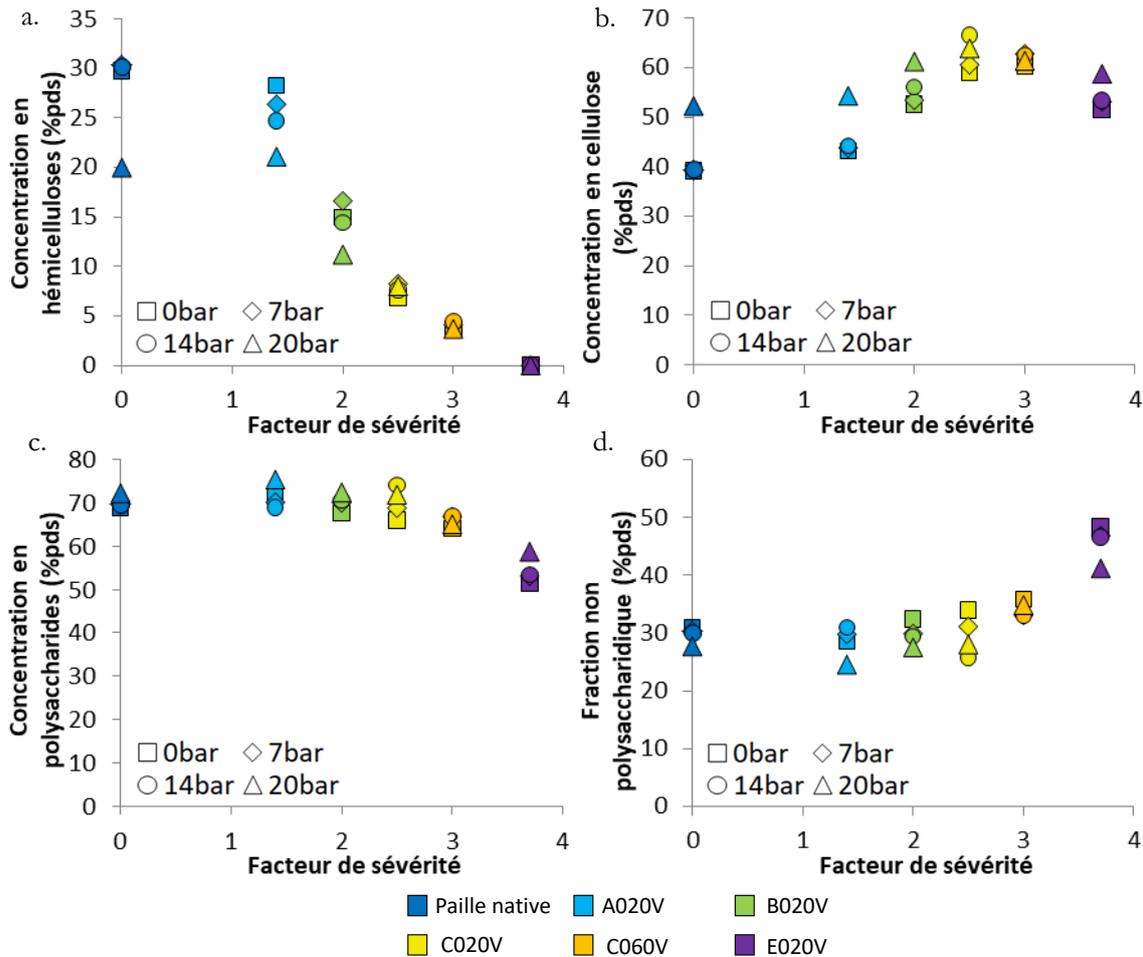


Figure 84 : Evolution de la teneur en hémicelluloses (a), cellulose (b), polysaccharides (c), et fraction non polysaccharidique (d), en fonction du facteur de sévérité (du traitement à l'acide dilué) et de l'amplitude de la dépressurisation

La Figure 85 montre l'évolution du rendement en glucose en fonction du facteur de sévérité et de l'amplitude de dépressurisation. On constate que la dépressurisation n'a pas nécessairement un effet positif sur le rendement en glucose, contrairement à ce que l'on aurait pu penser du fait de la déconstruction de la matrice. En réalité, l'effet positif n'est clairement visible que lorsque une reprise d'hydrolyse significative a lieu (détente explosive sur paille non traitée, dépressurisation de 20 bar). Dans ce cas particulier, le gain de rendement en glucose pourrait donc être directement attribuable à cette reprise d'hydrolyse avant détente explosive, et pas à la détente en elle-même. Pour les échantillons dont la sévérité de prétraitement est comprise entre 1,4 et 2,5, il semble même que des amplitudes de détente explosives de 7 et 14 bar soient néfastes pour la saccharification. A partir d'une sévérité de 3, la détente explosive ne semble plus avoir d'effet significatif sur l'hydrolyse enzymatique, quelle que soit la variation de pression opérée.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

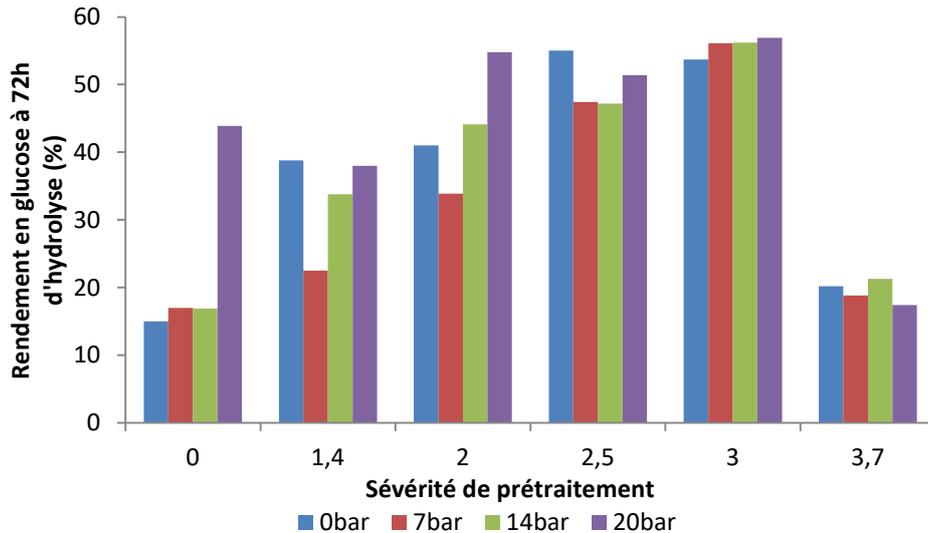


Figure 85 : Rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique dépendamment de la sévérité du traitement à l'acide dilué, et de la variation de pression subie lors de la détente explosive

b. Evolution de la granulométrie

L'étude de la granulométrie est intéressante car elle rend compte de l'effet de la détente explosive sur le substrat en termes de taille de particule. Cependant, la granulométrie initiale de ces échantillons étant de 20 mm, l'analyse en granulométrie laser ne peut convenir pour une granulométrie aussi grossière. De même la structure en longues fibres fines des substrats rend l'analyse d'image impossible, par le fait que ces longues fibres se chevauchent systématiquement et même à faible concentration, ce qui empêche de réaliser une segmentation satisfaisante.

L'analyse par diffraction laser a tout de même pu être réalisée lorsque le traitement à l'acide dilué était suffisamment intense pour fragmenter les particules à des tailles plus compatibles avec cette analyse. On prend l'exemple de la condition opératoire C020V, pour l'échantillon sans détente explosive (C020V00) et l'échantillon détendu à 20 bar. La Figure 86 montre les distributions granulométriques (abondance volumique), de ces deux échantillons. La détente provoque un décalage global de la distribution composée de plusieurs populations de tailles de particules, vers des diamètres équivalents plus petits. Le diamètre médian passe d'ailleurs de 325 à 106 μm après une détente de 20 bar. La population de taille la plus grossière diminue en abondance (elle passe de 4,6 à 3,2 %), et est décalée vers des tailles plus petites, passant d'une population centrée sur 700 μm , à une population centrée sur 415 μm . Cela traduit la diminution de la taille des fragments de paille de grosse dimension. Les 2 populations de tailles inférieures restent centrées sur 100 μm et 30 μm , mais leur abondance augmente. Ces tailles sont de l'ordre de grandeur de certaines cellules et faisceaux vasculaire, l'augmentation de cette abondance traduit donc probablement l'effet de fibrillation qui déstructure les particules en fibres individuelles, ce que l'on observe déjà visuellement.

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

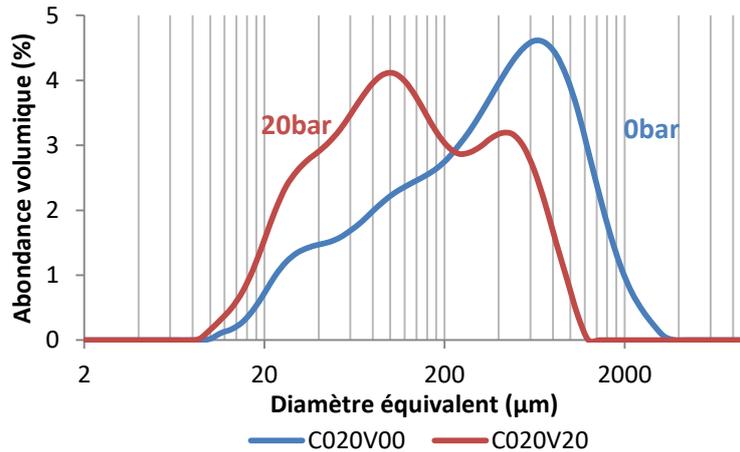


Figure 86 : Distributions granulométriques en abondance volumique des échantillons C020V00 et C020V20, traité à l'acide dilué à 140 °C pendant 20 min puis détendu à 0 et 20 bar

c. Evolutions morphologiques

Les évolutions de la morphologie des substrats provoquées par la détente explosive sont particulièrement visibles à l'œil. Les observations en MEB visent donc à témoigner au mieux de cette déstructuration. On montre en Figure 87 un cliché MEB par type de conditions opératoires de traitement à l'acide dilué et par pression de relâchement en détente explosive (0, 7, 14, et 20 bar). Cette figure illustre l'effet de destruction des tissus en fines fibres (défibrage, ou fibrillation), notamment à forte dépressurisation (20 bar) et sévérité faible (0 à 2,5). A plus forte sévérité, l'effet est moins visible, par le fait que le traitement à l'acide réalisé préalablement a déjà fortement altéré la structure de la matrice. L'action de fragmentation par fibrillation provoquée par la détente explosive, s'oppose à la fragmentation obtenue par le traitement à l'acide dilué.

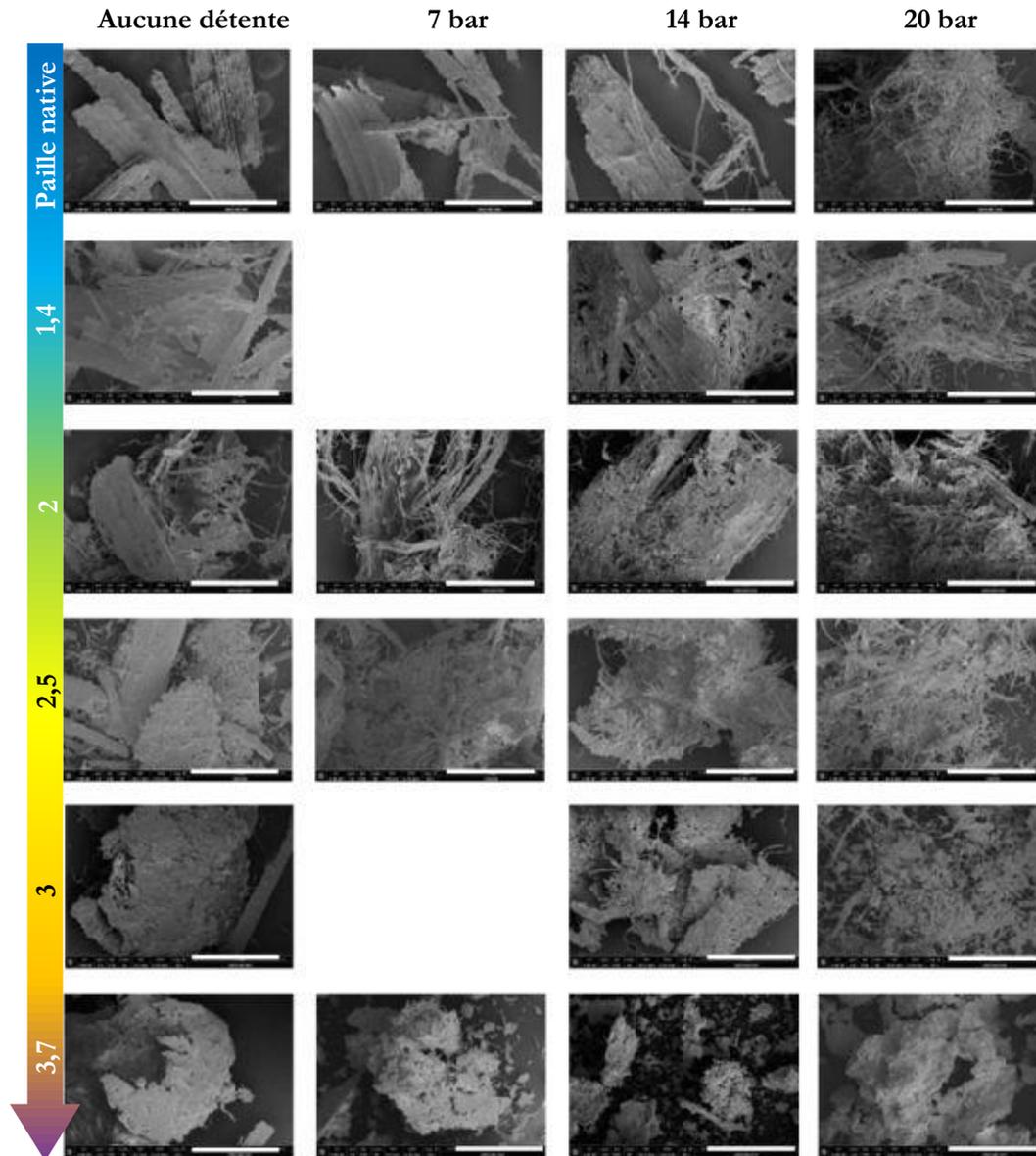


Figure 87 : Morphologie générale de la paille de blé dépendamment de la sévérité du prétraitement et de la pression de relâchement lors de la détente explosive. Barre d'échelle : 1 mm. Figure adaptée du manuscrit de Charlotte Loustau-Cazalet [241]

d. Etat de porosité

La Figure 88 trace la surface BET en fonction de la sévérité du prétraitement de la phase de cuisson et de la variation de pression lors de la détente explosive (a), et en fonction du taux d'hémicelluloses dans la matrice (b). On constate que lorsque la variation de pression augmente, la surface BET tend à augmenter.

Jusqu'à un facteur de sévérité de 2 (séries de paille native, A020, et B020), cette augmentation est due à la reprise d'hydrolyse qui est présente lors de la montée en température du réacteur. En effet la surface BET et le taux d'hémicelluloses sont corrélés comme vu précédemment dans l'étude du prétraitement à l'acide dilué. En revanche, pour les autres échantillons (à partir d'un facteur de sévérité de 3), l'augmentation observée de surface BET est directement attribuable à l'effet de la détente puisque la surface BET varie (chez la série C020 par exemple, elle passe de 3 sans explosion, à 5,3 m²/g à 20 bar) tandis que le taux d'hémicelluloses demeure constant. Cette augmentation de surface est d'autant plus importante que la variation de pression lors de la détente explosive l'est aussi. On peut également noter

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

que sur l'échantillon E020V20, l'augmentation de surface est particulièrement importante, passant de 9,3 m²/g sans explosion à 15,7 m²/g avec une détente de 20 bar.

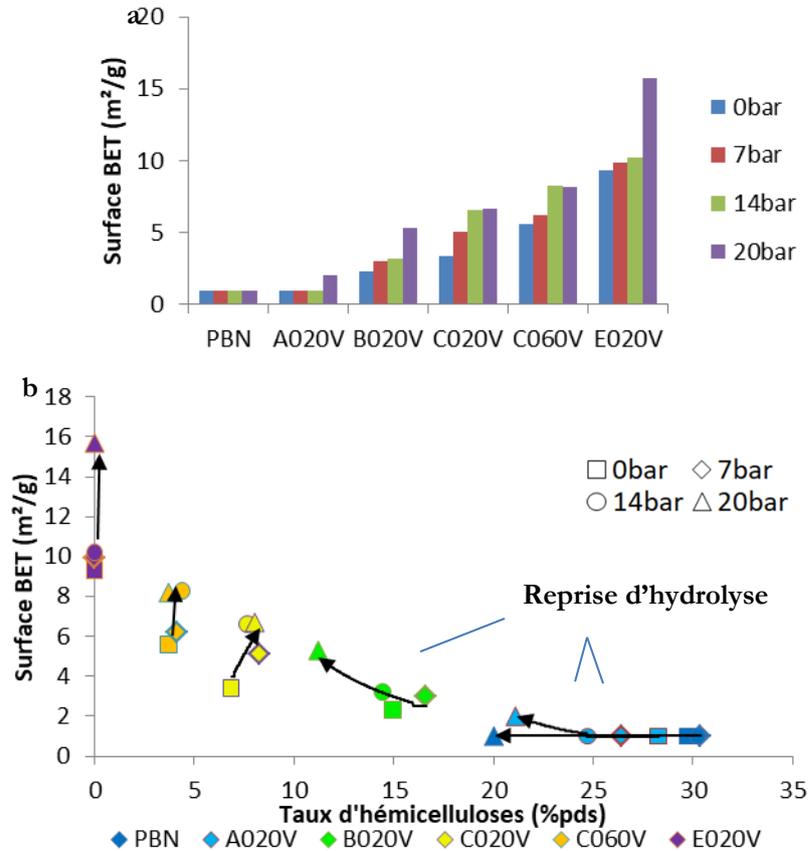


Figure 88 : Surface BET en fonction de la sévérité du prétraitement (a) et du taux d'hémicelluloses (b), pour différentes variations de pression lors de la détente explosive (0, 7, 14 et 20 bar)

Ces évolutions peuvent s'expliquer par le fait que l'explosion à la vapeur provoque majoritairement un défibrage des particules et dans une moindre mesure, une réduction de la taille des particules, ce qui expose vraisemblablement plus de matériel lignocellulosique à l'environnement extérieur.

e. Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique

La microscopie confocale a été utilisée sur l'échantillon C020V20, afin de compléter la caractérisation de l'effet de la détente explosive d'un point de vue morphologique mais surtout en termes de chimie de surface, exposée au milieu extérieur, et donc aussi aux enzymes. Pour cet échantillon, une augmentation de la surface BET a été observée grâce à l'effet de la détente explosive. L'enjeu est de déterminer si la surface créée est de nature cellulosique, et donc intéressant pour l'hydrolyse enzymatique, ou ligneuse. La Figure 89 montre une image réalisée sur cet échantillon après un marquage à la safranine. Sur cette image où la lignine apparaît en rouge, et la cellulose en vert, on constate que les tissus sont significativement explosés en particules de quelques dizaines de microns, ce qui est cohérent avec les caractérisations précédentes. Parfois, des tissus lignifiés plus gros semblent aussi préservés (haut d'image).

Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

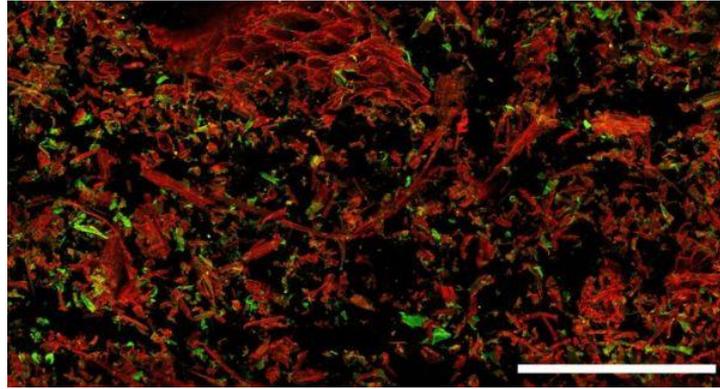


Figure 89 : Image en microscopie confocale de l'échantillon C020V20, avec marquage à la safranine. La couleur rouge revient à la lignine marquée, et la couleur verte revient à la cellulose marquée. Fluorescence de la lignine : 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm), Fluorescence de la cellulose : 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm). Barre d'échelle : 300 μm

Indépendamment de l'éclatement, il convient de s'intéresser à la quantité de cellulose exposée. La même approche quantitative que celle présentée précédemment lors de l'étude du prétraitement à l'acide dilué a été entreprise pour calculer le rapport surfacique cellulosique. Cette valeur peut alors être comparée aux précédentes données (voir Figure 90). L'échantillon C020V20 est l'équivalent (en termes de conditions opératoires de traitement à l'acide dilué) de l'échantillon C020C. On constate que la quantité relative de surface cellulosique mesurée sur l'échantillon C020V20 (explosé à 20 bar, barre jaune rayée) est légèrement plus faible que celui de l'échantillon C020 (barre jaune pleine). Le caractère significatif de cette baisse est critiquable par le fait que l'incertitude liée à la mesure n'est pas connue, mais on peut au moins conclure que l'effet de la détente explosive n'a pas d'effet positif sur l'accessibilité relative de la cellulose avec le milieu.

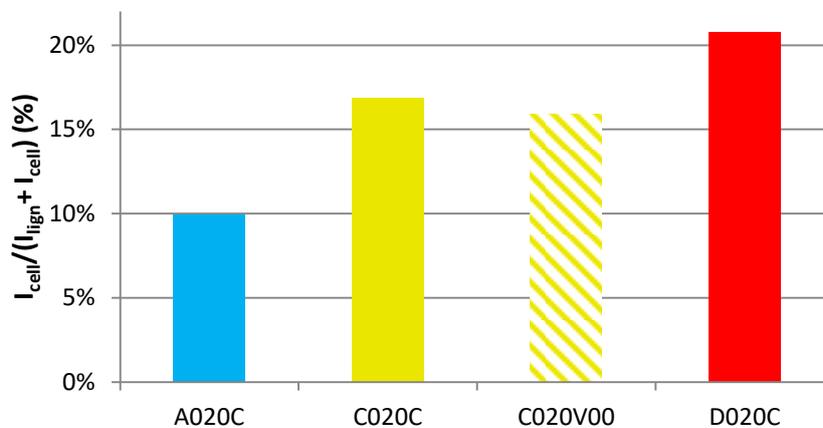


Figure 90 : Ratio de l'intensité moyenne de l'intensité de fluorescence de la cellulose et de la lignine, pour les 4 échantillons analysés

Ainsi, même si la détente explosive augmente la surface totale exposée par un phénomène de défibrage, ce phénomène n'amène pas à exposer plus de matière cellulosique, ce serait même le contraire, avec de la lignine qui semble encore recouvrir les fibres mises à nu.

f. Cristallinité de la cellulose

La détermination de l'indice de cristallinité à partir d'analyse RMN du carbone a été réalisée sur la série de conditions opératoires de traitement à l'acide dilué à 140 °C pendant 20 min (échantillons C020V) avec une détente explosive de 0 bar (aucune détente) et 20 bar. En l'absence de détente explosive, l'indice de cristallinité est de 32 % (+/-2,5 %), alors qu'il est de 35 % pour une détente explosive de 20 bar. L'effet de

la détente explosive sur la cristallinité de la cellulose n'est donc pas significatif dans les conditions de l'étude.

g. Conclusion sur l'effet de la détente explosive

Par le protocole choisi pour produire les échantillons détendus à différentes pression, il a été nécessaire de chauffer une deuxième fois ces échantillons. Pour ceux qui sont les moins stables (car traités à l'acide dilué en conditions douces), cela a eu pour conséquence de provoquer une reprise d'autohydrolyse des hémicelluloses, ce qui a limité l'exploitation des résultats obtenus pour décrire l'effet isolé de la détente explosive, indépendamment de l'effet d'hydrolyse acide en tant que tel. Pour les échantillons produits à sévérité intermédiaire (2,5 et 3), la reprise d'hydrolyse n'a pas lieu, ces échantillons sont plus stables thermiquement, rendant faisable l'évaluation des effets de cette dépressurisation. Pour ces échantillons, on constate une réduction de la granulométrie par défibrage puis fragmentation des grosses particules en particules plus petites et fibres individuelles. Le défibrage est d'autant plus flagrant que la variation de pression observée lors de la détente explosive, est grande. Cet éclatement mécanique engendre une augmentation de la surface BET, qui est d'autant plus grande que la dépressurisation est sévère. Toutefois cette surface exposée n'est pas de nature cellulosique et est probablement inutile d'un point de vue de l'hydrolyse enzymatique.

3. Conclusion

La biomasse lignocellulosique étant complexe, tant d'un point de vue chimique que d'un point de vue structural avec son organisation multi-échelle, nous avons mis en œuvre un grand nombre de techniques analytiques afin de décrire de manière assez exhaustive ces différents échantillons en termes de morphologie et de chimie. Grâce à cette approche multi-technique, nous avons pu montrer qu'à sévérité modérée de prétraitement, l'hydrolyse des hémicelluloses était majoritairement responsable de l'augmentation de la surface accessible, par les vides créés suite à cette hydrolyse. La lignine ramollie par la température est fortement liée aux hémicelluloses. Le retrait de ces dernières provoquerait donc une migration de la lignine qui se regrouperait notamment sous forme de gouttelettes, minimisant ainsi leur surface exposée à l'eau. A forte sévérité, la production d'humines issues de la polymérisation des produits de dégradation des polysaccharides provoque une augmentation de la surface accessible. La cellulose est aussi légèrement hydrolysée lors de prétraitements avec des sévérités modérées et de manière plus marquée à forte sévérité. Ces différentes modifications chimiques et structurales diminuent la résistance mécanique de la matrice qui se fragmente dans une certaine mesure (diminution de la taille des particules) lorsque les hémicelluloses sont retirées, et plus encore à forte sévérité lorsque la cellulose s'hydrolyse à son tour et que les humines se forment.

L'effet physique d'une détente explosive se manifeste avant tout par l'éclatement des échantillons à l'échelle macroscopique voire microscopique du substrat. Cet éclatement se traduit, non pas par une découpe ou déchirure des particules comme cela peut être observé lors d'un broyage, mais plutôt par un défibrage des faisceaux de fibres : la morphologie fibrillaire est ainsi conservée. Ce phénomène a pour effet d'augmenter très légèrement la surface accessible à partir d'une certaine détente (14 bar) mais ne semble pas augmenter la surface cellulosique.

Cette étude a permis une meilleure compréhension de l'impact d'un prétraitement à l'acide dilué ou par explosion vapeur sur les caractéristiques physicochimiques d'une biomasse. Le chapitre suivant sera consacré à la description et à la compréhension des liens existant entre les propriétés d'une paille prétraitée et sa digestibilité enzymatique.

VI. Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Dans ce chapitre l'objectif est de déterminer les paramètres dirigeant la digestibilité des substrats lignocellulosiques étudiés, en s'aidant des études conduites jusqu'à présent dans ce manuscrit. Il s'agira autant que possible de déterminer dans quelle mesure ces paramètres s'expriment, tant en termes d'amplitude que de plage de validité. L'intérêt de ce chapitre est multiple. Il s'agit de déterminer une partie des liens existants entre les paramètres physicochimiques étudiés. Il vise à lier des paramètres issus de différentes échelles d'observation avec la digestibilité enzymatique, et à prédire de manière relativement simple le rendement en glucose. Pour cela des paramètres sont choisis, non redondants pour expliquer au mieux la digestibilité mesurée. Ce chapitre a donc un double objectif de compréhension et d'application au système étudié. Sauf indication contraire dans une légende, le même code couleur dépendant de la sévérité du prétraitement est utilisé pour représenter les échantillons au fil des figures.

1. Evolution de la conversion en cellulose au cours du temps : modèle cinétique empirique

Comme nous l'avons vu précédemment, la conversion de la cellulose en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique est évaluée de la sorte : la biomasse est introduite à hauteur de 1 % ms de cellulose et est imbibée pendant la nuit. Les hydrolyses enzymatiques sont donc réalisées de façon à ce que la teneur en cellulose dans le milieu soit toujours identique. Les enzymes sont ensuite introduites à $t=0$ puis des prélèvements du surnageant sont réalisés à différents temps (1,5 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, et 144 h) puis analysés par un gluco-stat pour évaluer la teneur en glucose libéré et donc déterminer le rendement en glucose sur l'ensemble de la cinétique.

La conversion de la cellulose en fonction du temps d'hydrolyse $R(t)$ peut être modélisée de manière empirique de la façon suivante :

$$R(t) = R_m \cdot (1 - e^{-k \cdot t})^n \quad \text{Équation (4)}$$

Avec :

- k la constante de vitesse qui définit la rapidité de conversion de la cellulose pour une accessibilité donnée de la cellulose
- R_m le rendement maximal de glucose qu'il est possible d'atteindre lorsque $t \rightarrow +\infty$ (il correspond donc à la quantité totale de cellulose accessible à terme)
- n un coefficient strictement inférieur à 1 que l'on peut fixer de manière commune aux différents échantillons. Dans notre cas, il est posé égal à 0,46. Il est nécessaire à l'obtention du morphisme de la courbe, mais n'a pas de signification physique particulière

Les constantes k et R_m ont été ajustées pour chaque échantillon, afin de modéliser au mieux les courbes expérimentales. Un exemple de cinétique et son ajustement est présenté sur la Figure 91.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

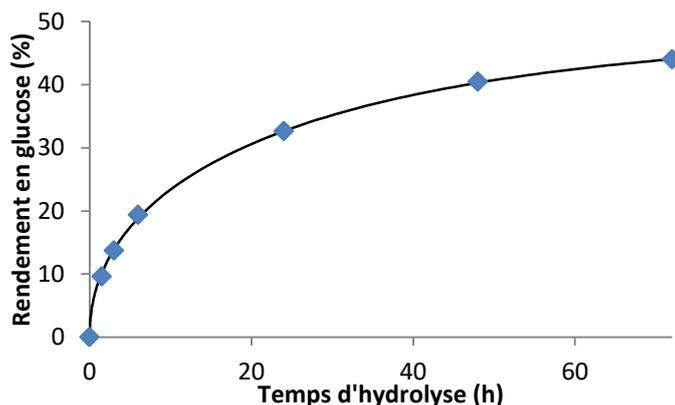


Figure 91. Exemple de courbe obtenue sur l'échantillon C020C qui traduit de la conversion de la cellulose en fonction du temps d'hydrolyse. Un exemple d'ajustement est présenté avec $k=2,27 \cdot 10^{-2} h^{-1}$ et $R_m=48,7$

Ce modèle cinétique ne se base pas sur une approche mécanistique de la dégradation enzymatique de la cellulose dans un substrat lignocellulosique. Il est inspiré d'un modèle de cinétique d'ordre 1 auquel on a rajouté une puissance non entière inférieure à 1 pour se rapprocher au mieux des données expérimentales. On trouve dans la littérature d'autres modèles d'ajustements empiriques possibles avec un morphisme en exponentiel, certains avec une tangente de pente finie au temps 0 [262].

Les valeurs de k et de R_m ont été évaluées pour chaque substrat sur la plage temporelle 0-72 h.

Le rendement en glucose à 72 h est le premier paramètre étudié pour rendre compte de l'évolution de la digestibilité des substrats en fonction des conditions opératoires (partie 12) et des paramètres physicochimiques (partie 13).

2. Effets du prétraitement sur la conversion de la cellulose

a. Le traitement à l'acide dilué

La Figure 92 et la Figure 93 illustrent l'évolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction des conditions opératoires. Deux représentations sont montrées :

- la première en fonction du temps de séjour pour différentes températures,
- la deuxième en fonction de la température pour les différents temps de séjour

Le point pour lequel le rendement en glucose est maximal correspond à un prétraitement à 160 °C pendant 20 min. Sur la Figure 92, il est possible de constater différents comportements en termes de digestibilité enzymatique pour la même paille de blé en fonction de la température de prétraitement :

- lorsque la température de cuisson est faible (égale à 100 °C) l'augmentation du temps de séjour provoque une légère augmentation du rendement de conversion de la cellulose : de 18,9 à 26,4 % pour un temps de séjour variant de 20 à 120 minutes
- pour des températures élevées (160 °C et 180 °C), le rendement maximal en glucose est atteint pour de courts temps de séjour (respectivement 20 et 10 minutes).
- pour une température intermédiaire (140 °C), le rendement maximal en glucose décrit un plateau (à environ 44 %) sur une large plage de temps de séjour (de 20 à 90 minutes).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

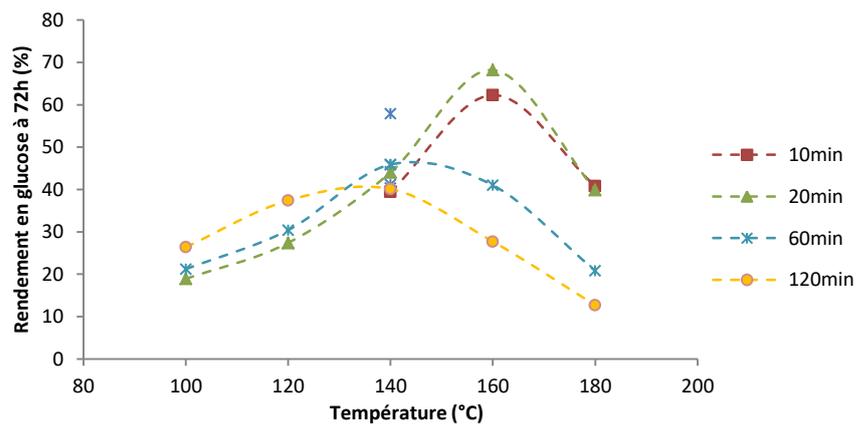


Figure 92 : Evolution du rendement en glucose en fonction de la température du prétraitement (°C)

Par ailleurs, sur la Figure 93, il apparaît que pour un temps de séjour donné, il existe une température pour laquelle la conversion en cellulose est optimale :

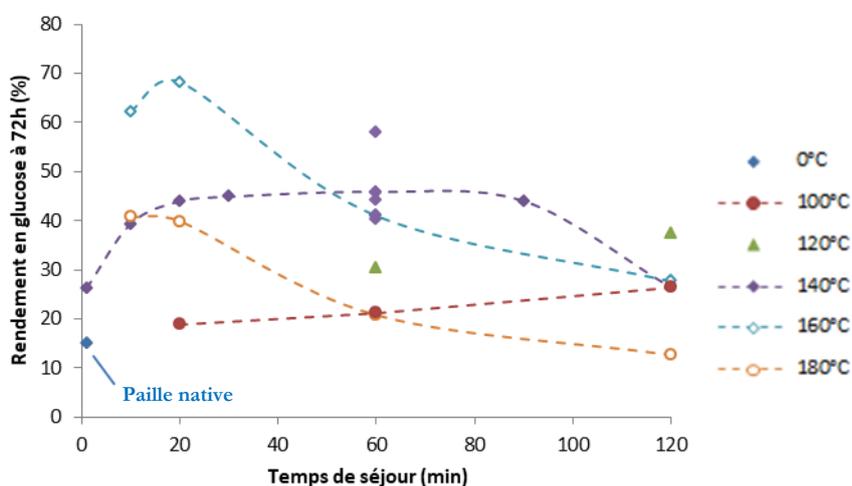


Figure 93 : Evolution du rendement en glucose à 72 h en fonction du temps de séjour (min)

Pour mieux visualiser la contribution de chacune des deux conditions opératoires du prétraitement sur le rendement en glucose obtenu, on peut aussi représenter le rendement en glucose comme fonction du temps de séjour et de la température (Figure 94).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

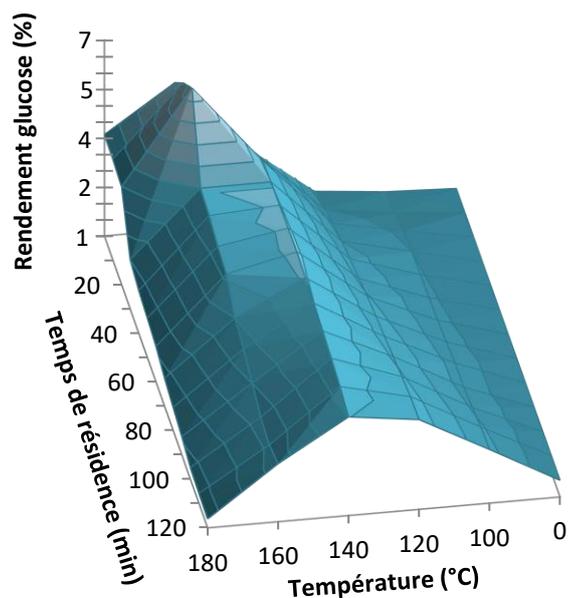


Figure 94 : Rendement en glucose en fonction du temps de résidence et de la température de prétraitement

Les constantes de vitesses k et les rendements maximaux R_m déterminés par ajustement, sont tracés sur la Figure 95. Le rendement maximal R_m suit la même tendance que le rendement à 72 h, puisque à ce grand temps d'avancement, le rendement en glucose est plus dépendant de la cellulose accessible (*via* R_m) que du taux de conversion qui diminue continuellement au cours de l'hydrolyse (*via* la constante de vitesse k).

Par ailleurs, R_m diminue à trop forte sévérité de prétraitement, alors que k diminue globalement quand le facteur de sévérité augmente. En augmentant la sévérité du prétraitement, la cellulose de plus en plus accessible, puis redevient moins accessible. D'autre part, la cellulose accessible est légèrement moins facilement convertie à mesure que la sévérité augmente. Les paramètres régissant le rendement maximal et la cinétique d'hydrolyse sont donc différents.

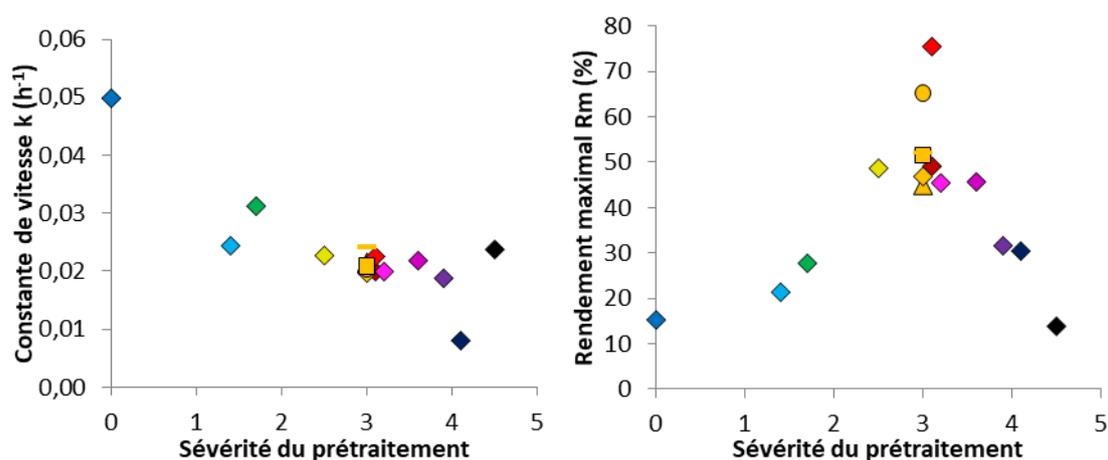


Figure 95 : Constante de vitesse k (à gauche) et rendement maximal R_m (à droite) en fonction de la sévérité du prétraitement à l'acide dilué

b. L'effet de la détente explosive

L'effet de la détente explosive sur la digestibilité des substrats a été investiguée. Pour cela, la paille de blé a été prétraitée à l'acide dilué à différentes conditions opératoires, puis le pH a été rehaussé (rendu neutre par ajout de soude) avant que la paille prétraitée ne soit à nouveau chauffée dans le réacteur

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

d'explosion vapeur et détendue en pression à 7, 14 ou 20 bar. Ces substrats ont été décrits dans le chapitre précédent.

La Figure 96 montre pour chaque échantillon l'effet de la détente explosive sur le rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse, pour différentes variations de pression. Plusieurs points sont à noter. Pour la paille non prétraitée et les échantillons produits à 100 et 120 °C, le rendement en glucose est maximal (ou similaire à celui obtenu en absence de détente) lorsque la variation de pression est la plus importante (20 bar). Au contraire, les pressions intermédiaires (7 et 14 bar) semblent avoir un effet néfaste sur la digestibilité des échantillons traités à 100, 120, et 140 °C. Pour les échantillons traités à l'acide dilué à 180 °C, la conversion en cellulose reste grossièrement inchangée quelle que soit la pression de la détente explosive. L'effet positif de la forte détente à faibles sévérités (jusqu'à 120 °C) provient directement de la reprise d'hydrolyse des hémicelluloses lors du chauffage nécessaire à la mise en pression avant détente explosive. Cet effet n'est donc pas une conséquence de la détente explosive. Pour des pressions intermédiaires et/ou à plus haute température, la détente explosive n'a au mieux pas d'effet sur la digestibilité.

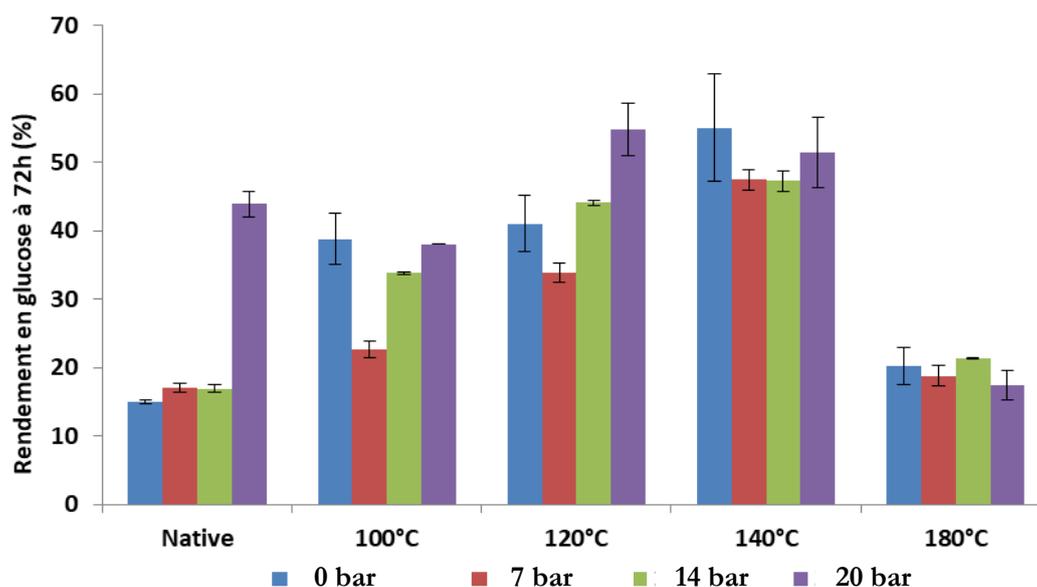


Figure 96 : Rendement en glucose en fonction de l'amplitude de la détente explosive, pour les différentes conditions opératoires de traitement à l'acide dilué réalisées en amont

3. La recherche de descripteurs

Dans cette partie on raisonne principalement sur un ensemble d'échantillons le plus exhaustif en termes d'analyse, de plage de sévérité de prétraitement testée, et de nombre d'échantillons produits, à savoir les échantillons produits par traitement à l'acide dilué. Lorsque possible, les échantillons servant à l'étude de la détente explosive seront également considérés.

a. Propriétés chimiques

i La teneur en hémicelluloses

Les hémicelluloses sont responsables de la limitation de l'accessibilité de la cellulose aux enzymes, par recouvrement physique. Ces hémicelluloses peuvent être hydrolysées de manière plus ou moins totale à la faveur d'un traitement à l'acide dilué. La Figure 97 trace la conversion en cellulose à 72h en fonction du taux d'hémicelluloses mesuré par IR sur les échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué pour des sévérités comprises entre 0 et 3,1 (sévérités faibles et intermédiaires des phases 1 et 2). Nous pouvons constater que la teneur en hémicelluloses est directement en lien avec la digestibilité du substrat. Comme décrit dans l'état de l'art, ce type d'évolution est complètement conforme à ce qui peut être trouvé dans la littérature [80].

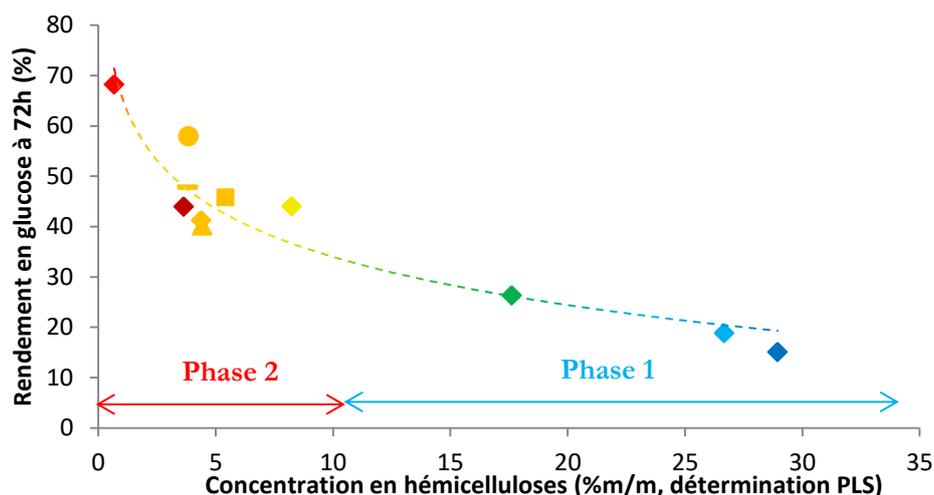


Figure 97 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique des échantillons traités à l'acide dilué, en fonction de la concentration en hémicelluloses déterminée par mesure IR et régression PLS des données IR

La tendance observée est globalement du même type pour les échantillons de l'étude de la détente explosive, comme l'illustre la Figure 98, avec cependant une dispersion plus importante des rendements en glucose par rapport à la droite de corrélation et une décroissance différente possiblement due à la dose doublée d'enzymes utilisée sur cette série d'échantillons.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

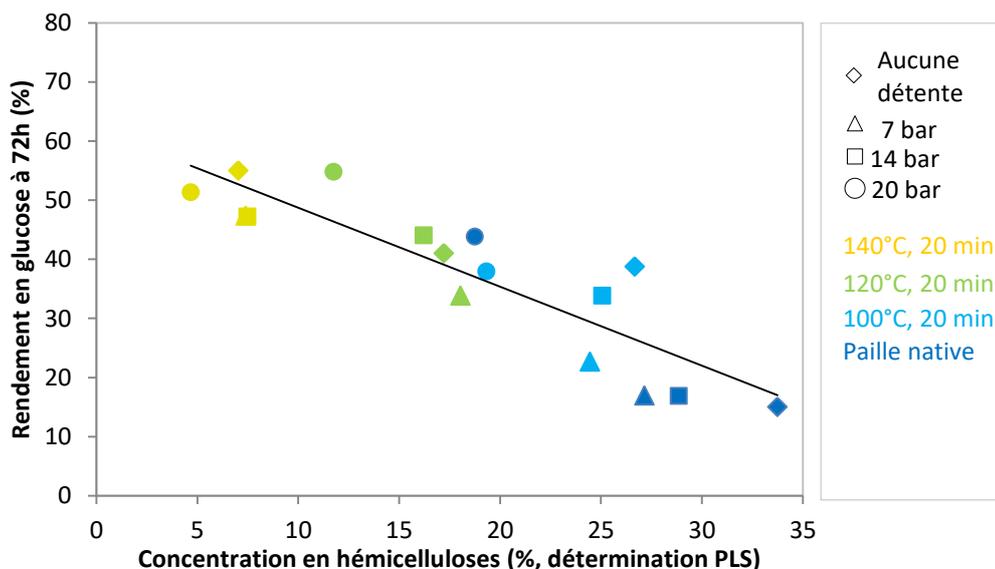


Figure 98 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique en fonction de la concentration en hémicelluloses déterminée par mesure IR et régression PLS des données IR

ii La teneur en lignine

Comme expliqué dans l'état de l'art, la lignine est une source de récalcitrance identifiée en hydrolyse enzymatique en intervenant à la fois en tant qu'obstacle physique pour bloquer l'accès des enzymes à la cellulose et en favorisant l'affinité que peuvent porter les enzymes envers certaines lignines (dépendamment de la biomasse, et du traitement utilisé). Elle est aussi réputée pour limiter le gonflement de la matrice (donc l'imprégnation d'acide sulfurique) et rendre cette matrice hydrophobe (ce qui ralentit là encore l'imprégnation).

La Figure 99 représente la conversion de la cellulose à 72h en fonction de la teneur en lignine déterminée par IR pour nos échantillons. Dans notre cas, **la teneur en lignine ne semble pas être en lien direct avec la conversion de la cellulose dans le cadre des substrats étudiés.**

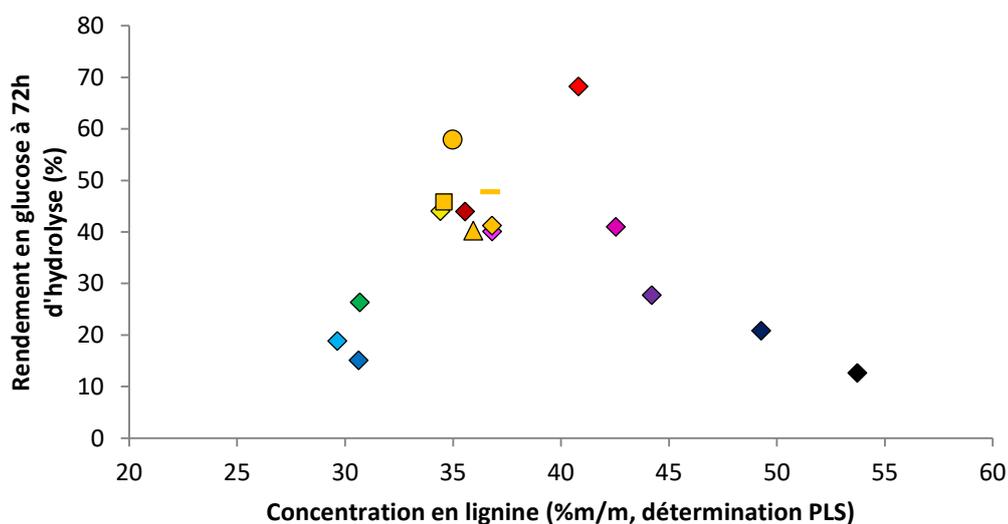


Figure 99 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en lignine déterminée régression PLS des données IR

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Ceci peut provenir de deux raisons :

- La première est le fait que le traitement à l'acide dilué n'a pas pour vocation de changer drastiquement le taux de lignine (par hydrolyse par exemple). La lignine étant très stable en milieu acide, elle n'est que peu hydrolysée dans le milieu réactionnel. L'évolution de la concentration relative en lignine dans le substrat solide après prétraitement est le fruit de l'hydrolyse des hémicelluloses (puis de la cellulose et de la formation d'humines à forte sévérité).
- Deuxièmement, **plus que la teneur en lignine, c'est la répartition spatiale de celle-ci qui se révèle critique quant à l'accessibilité de la cellulose**, de même que les liens covalents qu'elle réalise avec les polysaccharides présents, et éventuellement sa structure [181]. Dans notre cas, les observations en microscopie MEB ont montré qu'à partir de 140 °C, la lignine pouvait être sujette à des modifications au niveau de sa distribution dans la matrice lignocellulosique, à savoir sous forme de gouttelettes : on suppose que l'action combinée de la température qui ramollit la lignine et de l'hydrolyse des hémicelluloses (qui sont liées intimement à la lignine et entourent des microfibrilles de cellulose), provoque la migration et le regroupement d'une partie de la lignine sous une forme compacte sphérique, ce qui minimise par là même son énergie de surface. Pendant le refroidissement, la lignine se fige dans cet état-là. Des gouttelettes sont ainsi formées et sont visibles à la surface des parois cellulaires (Figure 100a). Pour les substrats traités à l'acide dilué entre 140 et 160 °C, cette réduction de surface de lignine participerait à une meilleure accessibilité de la cellulose aux enzymes. De plus dans l'hypothèse d'une adsorption non productive d'enzymes sur la lignine, le regroupement de la lignine sous une forme compacte est là-aussi providentiel. Des observations réalisées en microscopie confocale sur l'échantillon D020C produit par traitement à l'acide dilué à une sévérité optimale de 3,1 (température de 160 °C pendant 20 min), montre l'existence de particules qui ont perdu leur structure cellulaire à la faveur du prétraitement. Ces particules sont les plus présentes chez l'échantillon D020C. Un marquage préalable fixe la safranine sur le substrat et provoque une fluorescence de la lignine à 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm) représentée ici dans le canal rouge, et une fluorescence de la cellulose à 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm) représentée ici dans le canal vert. Les observations réalisées montrent que ces particules déstructurées présentent des zones cellulosesiques et des zones ligneuses qui sont spatialement disjointes, contrairement à ce que l'on peut trouver pour les tissus lignifiés non altérés, ce qui rend la cellulose de ces particules d'autant plus accessible.

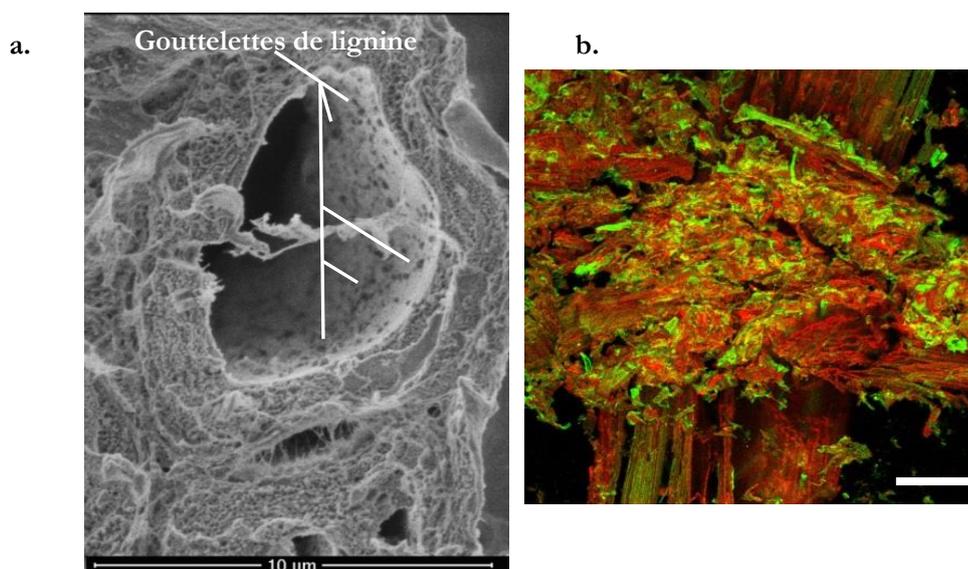


Figure 100 : a. Exemples de clichés mettant en évidence les gouttelettes de lignine dans le lumen d'une cellule lignifiée de l'échantillon D020C ; b. Image en microscopie confocale d'une coupe microscopique de l'échantillon D020C au niveau d'une zone déstructurée. Barre d'échelle, 100 µm

Pour toutes ces raisons, il est donc normal que ce ne soit pas la teneur en lignine en elle-même qui soit critique au niveau de la réactivité des échantillons.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

iii La teneur en humines

Les humines sont des composés dont la structure complexe et le mécanisme de formation à partir de différents sucres et autres précurseurs font l'objet de recherches [96,98,99,263–265]. Elles semblent largement responsables de la baisse de réactivité en phase 3. Ceci est illustré par la Figure 101 pour laquelle on remarque que le rendement en glucose à 72 heures diminue avec la formation des humines (dès les premiers pourcents). Cette évolution est, dans une certaine mesure, du même type que celle rencontrée pour les hémicelluloses.

Les humines limitent donc drastiquement la conversion de la cellulose au cours de l'hydrolyse, que ce soit à cause d'un masquage des fibrilles de cellulose ou par un phénomène d'adsorption non productive des enzymes sur ces humines.

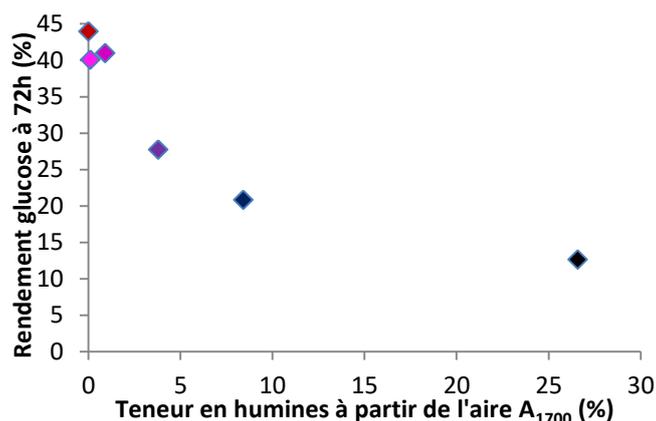


Figure 101 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en humines estimées à partir des régressions PLS, pour les échantillons produits par traitement à l'acide dilué

iv La teneur en cellulose

La teneur en cellulose des substrats de l'étude du traitement à l'acide dilué évolue de manière intéressante avec le rendement en glucose à 72 h avec le teneur en cellulose. La Figure 102 montre cette évolution. La tendance indiquée sur la figure est réalisée en sachant qu'à 0 % de cellulose la conversion est nulle, et que lorsque la concentration tend vers 100 %, la conversion à 72 h de la cellulose tend vers 100 % (tout du moins à la dose d'enzyme utilisée en hydrolyse standard), puisque la cellulose se retrouve seule et est donc complètement accessible.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

On retiendra donc que la teneur en cellulose n'est pas un descripteur majeur de la digestibilité, d'autant plus que ses variations témoignent à la fois de l'hydrolyse des hémicelluloses et de l'hydrolyse de la cellulose (et de la formation d'humines par déshydratation des polysaccharides), qui ont des répercussions potentiellement différentes sur l'accessibilité de la cellulose résiduelle.

v La cristallinité de la cellulose

La cellulose cristalline est connue pour avoir une digestibilité moindre notamment parce que la structure cristalline (allomorphes I_β et I_α dans notre cas) permet une adsorption des enzymes en moins grande abondance, et un clivage des liaisons $\beta(1,4)$ moins rapide [158]. Dans le cadre de notre étude, l'évolution du rendement en glucose à 72 h en fonction de l'indice de cristallinité IC_{cell} des échantillons de l'étude du traitement à l'acide dilué est montrée en Figure 104. On remarque ainsi qu'il n'y a pas de tendance qui s'en dégage. Comme expliqué au chapitre précédent, il est important de préciser qu'entre le début de la phase 1 et la fin de la phase 2, l'indice de cristallinité subit une augmentation de l'ordre de 10 points, qui est liée à l'hydrolyse partielle et préférentielle de la cellulose amorphe durant le prétraitement. Ainsi, la cellulose présente dans le substrat étant plus cristalline, celle-ci devrait être plus lentement dégradée. L'indice de cristallinité n'est donc pas un descripteur direct du rendement en glucose à 72 h.

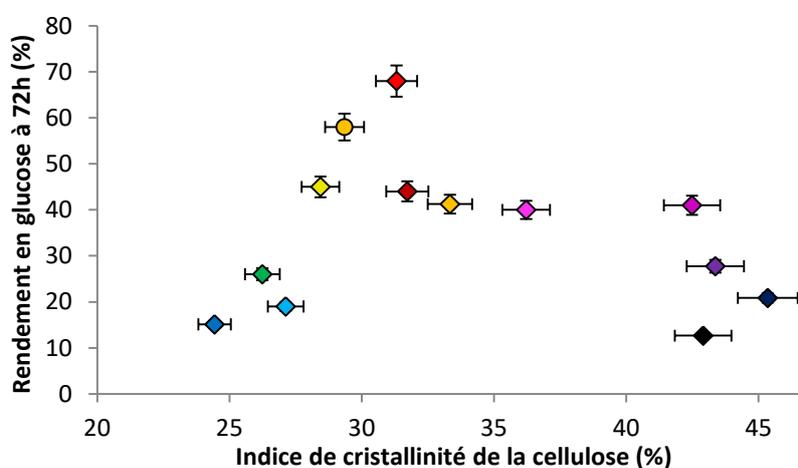


Figure 104 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de l'indice de cristallinité des échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué

La Figure 105 montre l'évolution de la constante de vitesse en fonction de l'indice de cristallinité de la cellulose. Il semble qu'il existe une certaine corrélation négative entre ces deux paramètres. Il est intéressant de noter que les échantillons présentant les taux de conversion et les indices de cristallinité les plus éloignés sont la paille native (en haut à gauche) et l'échantillon E060C (en bas à droite). Ce dernier a été obtenu dans des conditions opératoires très sévères de prétraitement (180 °C pendant 60 min). Ces deux échantillons ont cependant des rendements de conversion à 72 h assez proches (15 % pour la paille non traitée et 20 % pour l'échantillon E060C). On constate également que pour des conditions opératoires intermédiaires et optimales, et notamment telles qu'elles seraient pratiquées dans le cadre d'une production industrielle, autour d'une sévérité de 3 (échantillons en orange), l'indice de cristallinité ne semble pas être un paramètre déterminant de la vitesse de conversion en début d'hydrolyse.

L'indice de cristallinité conditionne donc une partie de la vitesse de conversion enzymatique de la cellulose pour une accessibilité donnée, à savoir lorsque le facteur de sévérité du prétraitement est inférieur à 3 ou supérieur à 3,5. A l'inverse, la valeur de cet indice n'est pas déterminante quant à l'accessibilité de la cellulose dans la matrice totale. Ainsi, l'effet de l'indice de cristallinité pourra être remarqué dans les premiers temps de l'hydrolyse enzymatique, pour des échantillons trop ou trop peu sévèrement prétraités.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

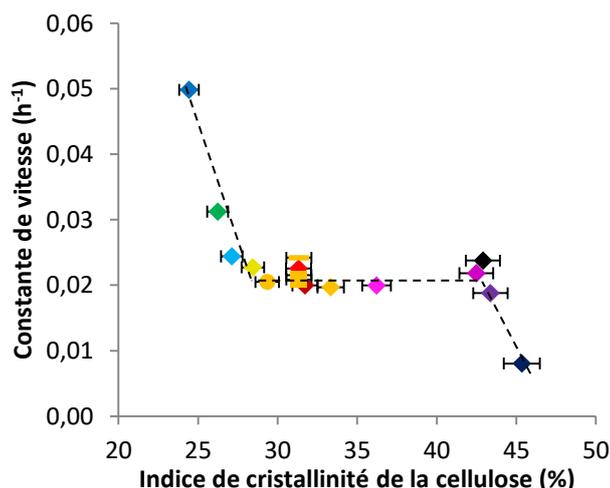


Figure 105 : Constante de vitesse de la cellulose en fonction de l'indice de cristallinité

vi Les propriétés d'autofluorescence

Plusieurs études de la littérature amènent à penser que les propriétés de fluorescence de matrices lignocellulosiques peuvent être mises en lien avec la digestibilité des substrats [123,172,183,266]. Les propriétés de fluorescence témoignent de la présence ou de l'état d'altération de certains composés chimiques, en l'occurrence les unités phénylpropanes de la lignine, et les acides hydroxycinnamiques situés à la fois sur certaines lignines (celles des parois secondaires, mais pas au niveau de la lamelle moyenne) et les hémicelluloses.

Dans notre cas, on s'intéresse d'une part à la fluorescence rouge émise par excitation bleue qui est censée être émise par les doubles liaisons conjuguées de carbone des unités de la lignine, et d'autre part à la fluorescence bleue émise par excitation ultraviolette (UV-B). Les autres canaux utilisés dans le chapitre précédent pour caractériser l'évolution de la fluorescence dépendamment du prétraitement ne sont pas rigoureusement redondants, mais donnent globalement le même type d'information. C'est pour cela que l'on utilise ici seulement 2 canaux, qui sont orthogonaux quant à l'information qu'ils fournissent. La Figure 106 indique l'évolution du rendement en glucose en fonction des intensités de fluorescence rouge (par excitation bleue), et bleue (par excitation UV-B). Pour les échantillons des phases 1 et 2, on retrouve grossièrement les tendances décrites dans la littérature, à savoir que la perte de fluorescence s'accompagne d'une augmentation du rendement en glucose. Mais à plus forte sévérité et lorsque le rendement en glucose diminue à cause de la formation des humines, la perte de fluorescence se poursuit et se termine. La relation entre la conversion de la cellulose et la fluorescence respective des acides hydroxycinnamiques et de la lignine, apparaîtrait comme simple témoin des modifications de la matrice, en regard des autres modifications chimiques majeures qui ont lieu. En effet, entre l'hydrolyse des hémicelluloses et la modification de la répartition de la lignine dans les parois, il est difficile de conclure si c'est directement la perte ou l'altération des espèces chimiques à l'origine de la fluorescence qui est responsable de la meilleure digestibilité du substrat.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

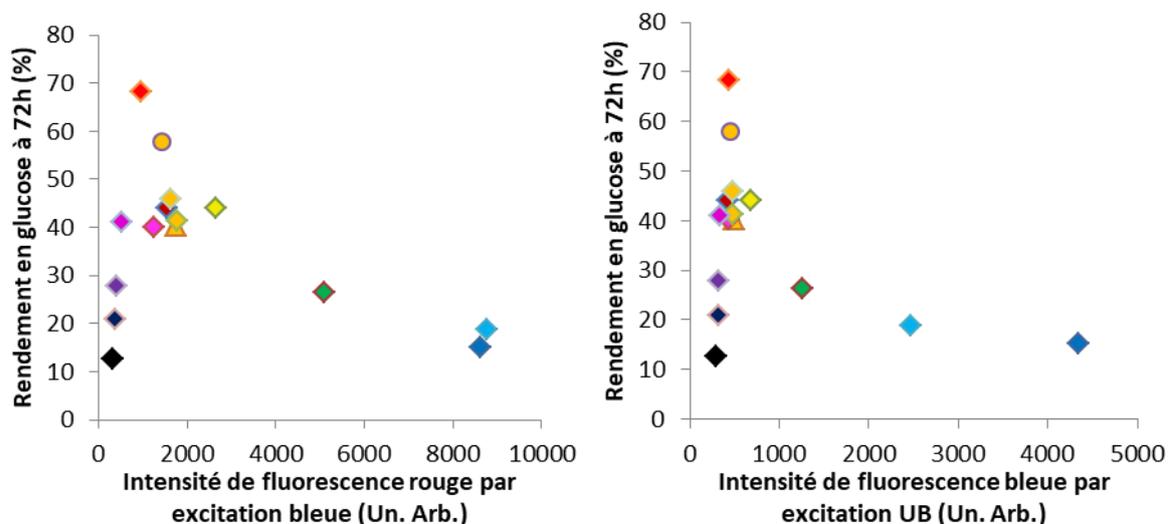


Figure 106 : Rendement en glucose en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence des images mosaïques multispectrales

vii Conclusion sur l'influence des paramètres chimiques

D'après les expérimentations réalisées sur les échantillons considérés, les hémicelluloses limitent par leur présence l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes. Cet effet est visible pour les échantillons de la première et de la deuxième phase (i.e. à sévérité douce et intermédiaire de prétraitement). De ce fait, leur concentration semble être un descripteur pertinent notamment en vue de la détermination de la conversion de la cellulose à partir de propriétés physicochimiques appropriées. La présence d'humines limite visiblement la quantité de cellulose accessible, avec une amplitude qui dépend de l'abondance celles-ci. L'indice de cristallinité de la cellulose semble déterminer la valeur de la constante de vitesse k de l'hydrolyse, notamment hors des plages de conditions opératoires optimales (à savoir à faibles et très fortes sévérités). En revanche, il ne semble pas avoir d'effet particulier sur la quantité de cellulose accessible. Ainsi, en fin d'hydrolyse, cet effet de la cristallinité n'est plus mesurable (contrairement au tout début de l'hydrolyse).

Par ailleurs, la teneur en lignine n'a pas été directement mise en lien avec la digestibilité des substrats, bien que la lignine soit réputée participer activement à la récalcitrance de la lignine. Par les observations microscopiques faites, il semble que la répartition de la lignine dans la matrice soit plus importante que son abondance. Les travaux en microscopie confocale exposés dans la partie suivante, confirmeront ce point en s'intéressant à la chimie de surface, accessible et exposée aux enzymes lors de la saccharification.

Cette notion d'accessibilité de la cellulose semble être cruciale et est conditionnée à la fois par la composition chimique et par la structure de la matrice, c'est pourquoi il est aussi intéressant d'étudier d'autres paramètres possiblement liés à cette notion d'accessibilité comme la taille des particules, la surface spécifique S_{BET} et chimie de surface, telle qu'exposée aux enzymes.

b. La taille des particules

La Figure 105 présente l'évolution du rendement en glucose à 72 h en fonction du diamètre médian équivalent des distributions granulométriques en abondance volumique. Aucun lien direct avec le rendement en glucose des différents échantillons traités à l'acide dilué (et de granulométrie initiale de 2 mm) n'est observé. La même observation est faite pour la constante de vitesse k .

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

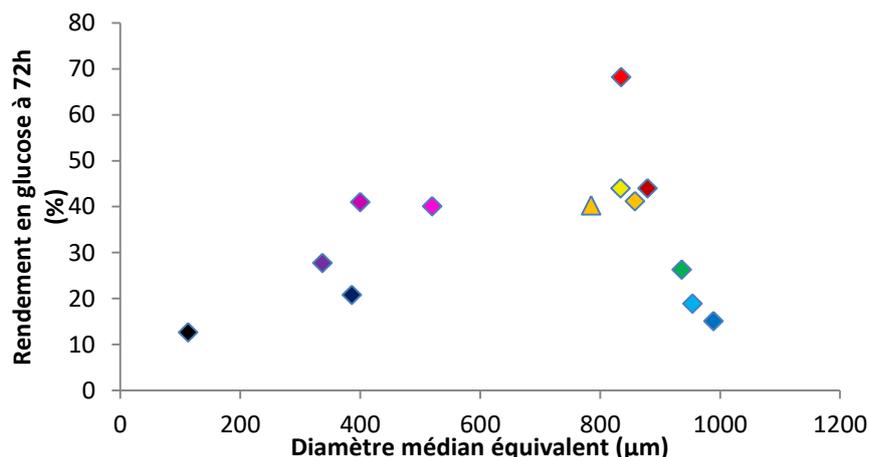


Figure 107 : Evolution du rendement en glucose en fonction du diamètre médian équivalent, pour les distributions en abondance volumique de pailles de blé prétraitées à l'acide dilué

Une autre confirmation de ce résultat provient de l'échantillon C060C5 qui est la seule répétition de ces conditions opératoires avec une granulométrie initiale (avant prétraitement) de 20 mm. Comme on peut le voir dans le Tableau 20, cet échantillon possède une composition chimique et une cinétique de saccharification identique à celle des autres répétitions (dont la granulométrie initiale était de 2 mm) de ces conditions opératoires de prétraitement (compte tenu des incertitudes expérimentales et instrumentales).

Tableau 20 : Teneur en polysaccharides (cellulose et hémicelluloses, détermination PLS) et rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique pour les échantillons C060C de granulométrie avant prétraitement de 20 et 2 mm

	Cellulose (%ms)	Hémicelluloses (%ms)	Rendement en glucose à 72h (%)
Moyenne des C060C (granulométrie 20 mm)	59,1	3,8	47,8
Moyenne des C060C (granulométrie 2 mm)	59,8	4,5	46,3

Ainsi, la réduction de granulométrie ne constitue pas un descripteur pertinent de la réactivité, tout du moins sur cette plage de granulométrie et pour nos substrats considérés, ce qui diffère légèrement de ce qui a été trouvé par Liu *et al.* [88] chez qui l'augmentation de la taille des particules (sur une plage de taille de 5 à 25 mm) était bénéfique pour la saccharification (c'est l'inverse pour des granulométries bien plus fines sans prétraitement [89,267]).

c. L'état de porosité et état de surface

Les liens pouvant exister entre la surface BET (et donc le volume poreux, qui lui est linéairement lié dans notre cas) ou les propriétés des distributions en taille de pores, avec la digestibilité des substrats lignocellulosiques sont ici étudiés.

i Le cas des échantillons traités à l'acide dilué

On s'intéresse dans un premier temps aux échantillons produits par cuisson à l'acide dilué. La Figure 108 montre l'évolution du rendement en glucose en fonction de la surface BET. Concernant la phase 1, le rendement est globalement en coévolution avec la surface BET. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la surface BET développée dans les échantillons de la phase 1 était induite par le retrait des hémicelluloses. Quant à la phase 3 (échantillons mauves à noirs), le rendement en glucose est en coévolution négative avec la surface BET. Pour rappel, cette surface BET très importante développée dans les échantillons de la phase 3 peut être reliée à la présence d'humines, dont la porosité peut également

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

être appréciée par les observations MEB qui dévoilent une structure friable et rugueuse (voir le chapitre précédent) caractéristiques de ces fortes sévérités.

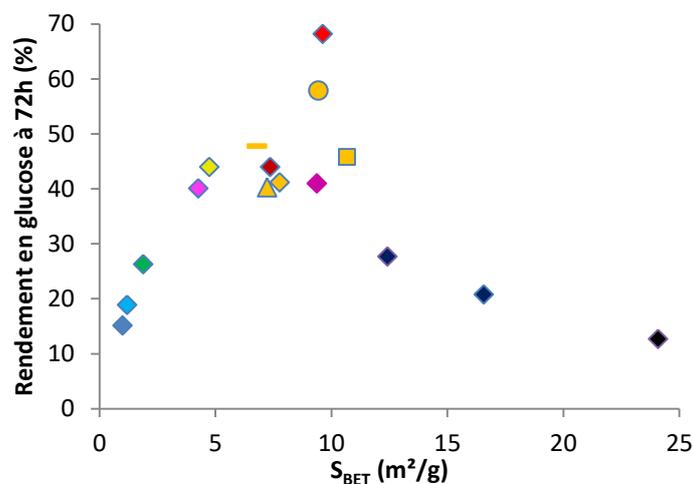


Figure 108 : Evolution du rendement en glucose en fonction de la surface BET

Ainsi, il est difficile d'établir à ce stade si la surface accessible contribue à la digestibilité, indépendamment des facteurs chimiques, car la surface accessible est fortement dépendante des hémicelluloses et humines. Les deux paragraphes qui suivent permettent de mieux comprendre les effets que peuvent avoir la surface accessible sur la digestibilité des substrats.

Concernant les distributions en taille de mésopores, la porosité étant du même type sauf à forte sévérité de prétraitement où les distributions sont légèrement décalées vers des tailles de pores plus grandes, on considère qu'il n'y a pas de lien entre les distributions calculées et la conversion de la cellulose. De plus, la microporosité semble être absente (tout du moins à l'état lyophilisé). De ce fait, **la surface BET mesurée est *a priori* directement représentative de la surface développée physiquement accessible aux enzymes.**

ii Une modification de surface à chimie égale

Afin de s'assurer que la surface accessible mesurée *via* la surface BET est un descripteur pertinent de la digestibilité des substrats de manière complètement indépendante de la composition des substrats, nous avons exploité le phénomène d'effondrement irréversible de la matrice lignocellulosique (phénomène d'hornification) qui se produit lorsque l'on sèche un substrat de manière traditionnelle (à l'air libre, ou en étuve). Dans un tel cas, la chimie est identique au même substrat non séché ou lyophilisé, et la surface accessible du substrat est largement réduite même après ré-imprégnation. De cette manière, la comparaison des cinétiques donne l'impact seul de la surface accessible sur la digestibilité des substrats.

Pour mener à bien cette étude, trois échantillons sont choisis, à savoir les échantillons A060C (phase 1, traitement à 100 °C pendant 60 min), C030C (phase 2, traitement à 140 °C pendant 30 min), et E010C (phase 3, traitement à 180 °C pendant 10 min).

Ces échantillons ont été caractérisés par physisorption d'azote afin de déterminer leur surface BET. Les valeurs sont indiquées dans le Tableau 21.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Tableau 21 : Surfaces BET par séchage en étuve ou par lyophilisation

	Etat	S _{BET} (m ² /g)
A060C	lyophilisé	2,7
	étuve	1
C030C	lyophilisé	6,0
	étuve	2,6
E010C	lyophilisé	8,8
	étuve	5,9

La Figure 109A montre les cinétiques obtenues pour ces trois échantillons, pour les spécimens laissés humides, et ceux séchés à l'étuve (50 °C pendant 24 h) puis ré-imprégnés. On constate qu'effectivement la réduction irréversible de surface occasionnée par l'hornification a bien un effet délétère sur la saccharification. La Figure 109B qui s'intéresse plus particulièrement aux faibles temps d'hydrolyse, montre qu'en plus d'une réduction de la conversion de la cellulose, l'hydrolyse semble commencer avec un retard (d'environ 1 h). Cela suggère que dans ce cas la diffusion des enzymes dans les tissus est un paramètre limitant la conversion de la cellulose au démarrage de l'hydrolyse.

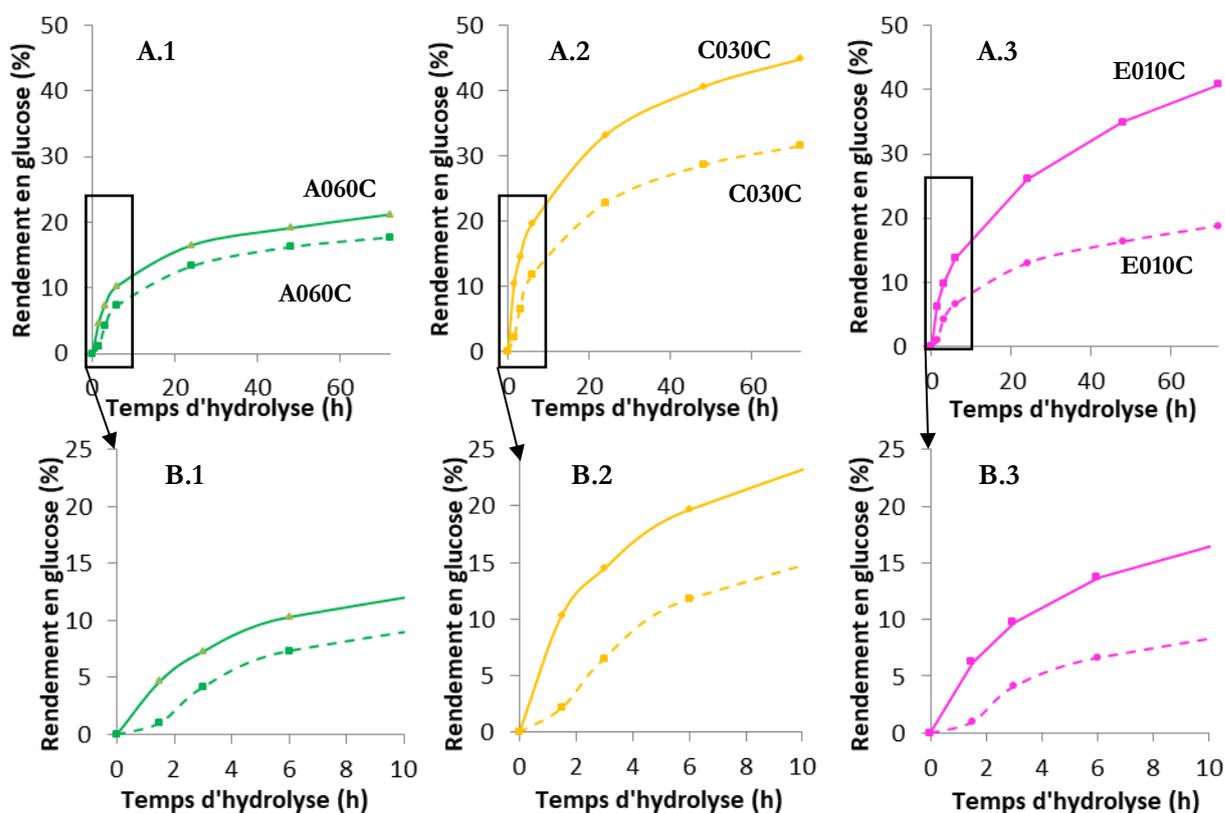


Figure 109 : Cinétiques de dégradation d'un échantillon de la première phase (A.1 et B.1), de la deuxième phase (A.2 et B.2) et de la troisième phase (A.3 et B.3), sans séchage (cas classique, en traits continus) et avec séchage à l'étuve (tirets). Les figures A et B représentent respectivement les longs et courts temps d'hydrolyse enzymatique

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Si l'on rapporte la baisse de rendement à 72 h d'hydrolyse au rendement de référence (sans séchage), on constate que la réactivité de l'échantillon de la phase 3 (E010C) est le plus sensible à l'effet du séchage et donc à la modification de surface.

On souhaite maintenant lier la perte relative de rendement avec la perte relative de surface entre l'échantillon lyophilisé (dont on suppose qu'elle est représentative de celle de l'échantillon non séché) et l'échantillon séché à l'étuve. La Figure 110 montre que plus la perte de surface est importante, moins la perte de rendement est importante. Ceci permet de montrer que l'effet de la surface sur la saccharification varie dépendamment de la sévérité de l'échantillon, **ce qui fait de la surface accessible un descripteur, mais dont l'expression varie dépendamment de la chimie du substrat.**

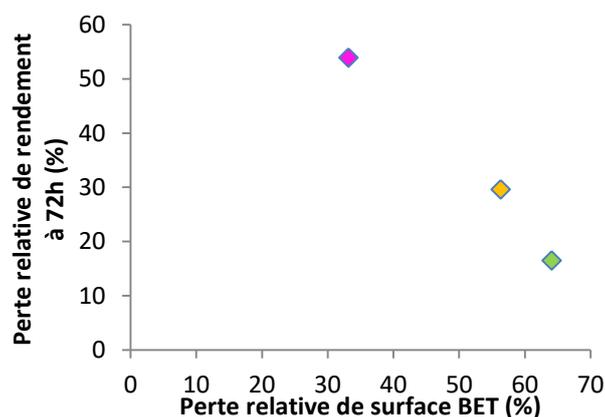


Figure 110 : Evolution de la perte relative de rendement en glucose à 72 h en fonction de la perte relative de surface BET

iii Et les échantillons explosés dans tout ça ?

On considère les échantillons prétraités à l'acide dilué puis soumis à une détente explosive sans qu'il y ait de reprise d'hydrolyse des polysaccharides lors de l'étape du chauffage avant détente. Il s'agit des séries C020V, C060, et E020 aux différentes pressions. Sur ces échantillons, l'augmentation de la surface accessible est directement attribuable à l'effet physique de la décompression. On constate que pour ces échantillons, le gain en surface ne se manifeste pas par un rendement de conversion plus élevé. Cela montre que l'effet de la surface sur la conversion de la cellulose est très dépendant de la chimie de surface du substrat, qui ici a pu changer dépendamment de la pression (par exemple lors de l'étape de réchauffage).

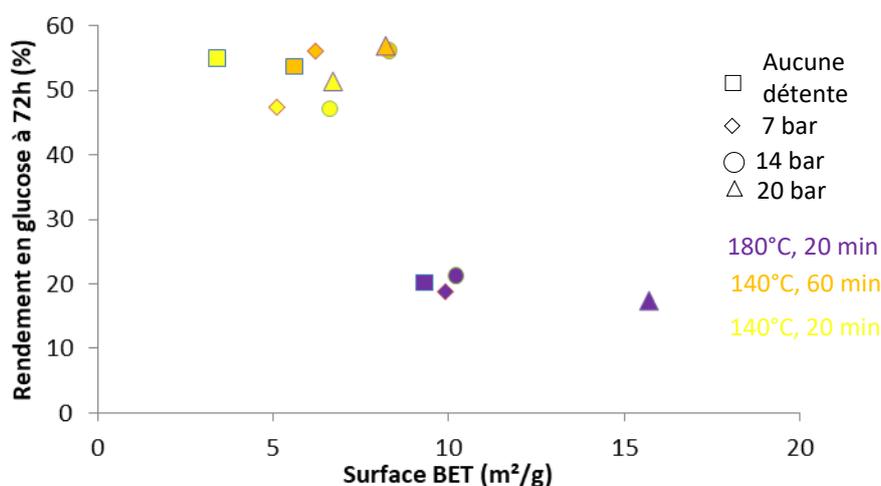


Figure 111 : Conversion de la cellulose en fonction de la S_{BET} pour échantillons explosés et sans reprise d'hydrolyse

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

iv Chimie de surface par microscopie confocale

Le suivi de la chimie de surface par moyen microscopique est particulièrement intéressant par le fait que les informations sont résolues spatialement et susceptible d'être plus représentatif de la chimie qui est réellement exposée aux enzymes, contrairement à la chimie globale. L'étude de la chimie de surface devrait rendre compte de cet effet de distribution surfacique de la lignine à faible sévérité de prétraitement, ou au contraire du regroupement plus compact de celle-ci à sévérité intermédiaire.

Par marquage à la safranine on distingue aisément la surface cellulosique de la surface ligneuse. La cellulose est représentée en couleur verte, la lignine en couleur rouge. La Figure 112 montre une cartographie des préparations microscopiques de 3 échantillons (parmi les 4) sélectionnés pour cette étude (ils feront par ailleurs l'objet de l'étude *in situ* du chapitre suivant), à savoir les échantillons A020C (phase 1, produit par traitement à 100 °C pendant 20 min), C020C (début de phase 2, 140 °C pendant 20 min), et D020C (optimum de phase 2, 160 °C pendant 20 min).

On remarque que la prédominance de la surface ligneuse ou au contraire cellulosique, est fortement dépendante du taux de retrait des hémicelluloses lors du prétraitement. Cet effet est visible sur l'ensemble des tissus lignifiés présents sur ces champs de vue.

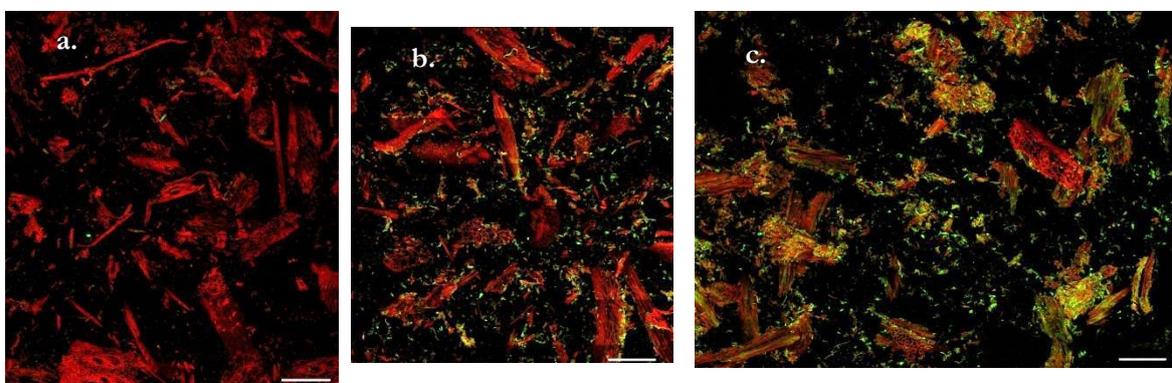


Figure 112 : Images mosaïques en microscopie confocale des échantillons A020C (a), C020C (b), et D020C (c). Le marquage (safranine) se fixe sur le substrat et provoque une fluorescence de la lignine à 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm) représentée ici dans le canal rouge, et une fluorescence de la cellulose à 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm) représentée ici dans le canal vert. Barre d'échelle : 300 μ m

Comme expliqué dans le chapitre précédent, les surfaces cellulosiques et ligneuses ont été calculées. En Figure 113, la conversion en glucose est tracée en fonction de la proportion relative du signal d'intensité de fluorescence de la cellulose marquée, pour les 4 échantillons. Pour autant que l'on puisse en juger par le faible nombre de points présents, le rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse semble suivre une relation affine avec cette proportion calculée. Il est maximal pour l'échantillon D020C, et minimal pour l'échantillon A020C, alors que c'est l'inverse pour ce qui est des teneurs en cellulose. En raisonnant sur les surfaces cellulosiques et ligneuses par seuillage, la même tendance est trouvée. Ceci indique qu'il est tout à fait possible d'avoir un substrat pauvre en lignine mais recouvert en surface de lignine, et inversement d'avoir un substrat riche en lignine mais dont la répartition est telle que la lignine ne recouvre que peu la fraction cellulosique. Le quatrième échantillon (cercle jaune), est l'échantillon C020V20, équivalent de l'échantillon C020C (losange jaune), mais ayant subi une détente explosive de 20 bar. On constate que la valeur de cette proportion de cellulose en termes de fluorescence est légèrement inférieure pour l'échantillon explosé que pour son homologue non explosé, pour autant que la différence ne soit significative (de plus nombreuses analyses auraient été nécessaires).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

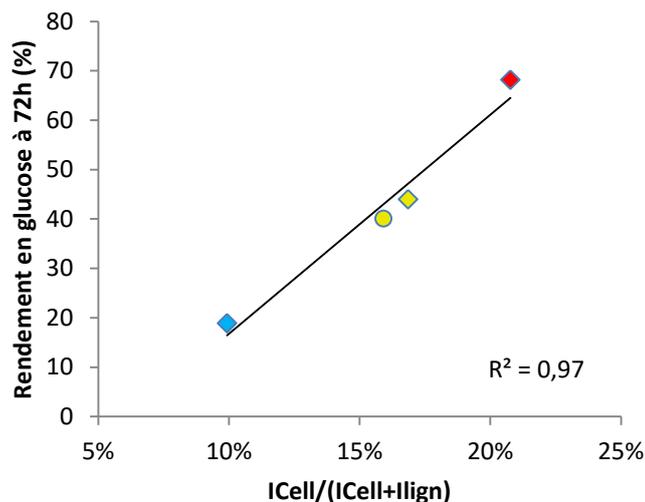


Figure 113 : Graphique représentant l'évolution du rendement en glucose en fonction de la proportion relative d'intensité de fluorescence émise par la cellulose marquée, $I_{cell}/(I_{cell}+I_{lign})$

Ainsi cette surface produite bien visible en MEB (chapitre précédent), et induite par l'hydrolyse des hémicelluloses, constitue une surface utile et bénéfique à la réactivité des substrats. De plus, il semble que la surface cellulosique mesurée par marquage à la safranine soit tout-à-fait représentative de l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes.

Enfin, le fait que l'échantillon explosé présente une proportion de cellulose accessible inférieure à celle de son échantillon équivalent non explosé, tend à confirmer l'hypothèse avancée selon laquelle le réchauffage effectué avant la détente explosive provoque une redistribution partielle et délétère de la lignine dans les tissus, diminuant de fait l'accessibilité de la cellulose et sa conversion en hydrolyse enzymatique en dépit d'une surface accessible plus importante.

Comme on l'a vu, la formation d'humines à plus forte sévérité résulte en une baisse assez brutale de la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique. Si sa cartographie n'a pas été réalisée en tant que telle comme pour les surfaces cellulosiques et ligneuses en microscopie confocale, la présence d'humines se remarque par un état de rugosité de surface assez typique dont l'apparition coïncide avec la formation des humines. Ce point se remarque particulièrement en MEB (voir pour cela le chapitre précédent) pour les échantillons produits à trop forte sévérité et sur lesquels on observe cette surface rugueuse caractéristique.

Ainsi la hausse significative de surface BET observée au chapitre précédent pour les échantillons de la phase 3, traduit le changement de structure de la matrice imposé par la formation des humines, d'où l'intérêt par la suite de dissocier l'effet de la surface accessible qui conditionne la quantité de matériel lignocellulosique accessible aux enzymes, de l'effet de la composition chimique qui conditionne la proportion de cellulose qui sera accessible aux enzymes, pour une porosité donnée. En effet, la structure poreuse/rugueuse est probablement propice à la conversion de la cellulose par une meilleure accessibilité de celle-ci. Cependant lorsque la matrice est indigeste chimiquement, cette rugosité/porosité ne compense pas la récalcitrance de la matrice, et est possiblement propice au blocage physique des enzymes par pure rugosité, indépendamment de l'adsorption non productive d'ordre chimique sur les humines ou la lignine.

L'évaluation de l'accessibilité de la cellulose par observation en microscopie confocale de biomasses marquées à la safranine est un bon descripteur de la réactivité des substrats, mais cette propriété est le fruit de l'expression de différents paramètres impliqués, comme la porosité des particules, leur composition chimique, ou encore la distribution de la lignine. **Ce paramètre traduit donc simplement la surface accessible de la cellulose à l'échelle microscopique, sans discriminer précisément les causes des changements de la digestibilité du substrat.**

d. Synthèse : proposition de descripteurs

Des différentes analyses réalisées, on a pu conclure que la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique est directement limitée par :

- **La teneur en hémicelluloses** dont la présence rend la cellulose physiquement inaccessible aux enzymes.
- **La distribution surfacique de la lignine** lorsque le prétraitement est trop doux, ce qui rend la cellulose inaccessible. La gêne occasionnée par la lignine est en lien avec la présence des hémicelluloses qui lui sont liées. Lorsque l'hydrolyse des hémicelluloses a lieu, la lignine se regroupe pour minimiser son énergie de surface, ce qui rend la cellulose d'autant plus accessible.
- **La teneur en humines**, dont la présence rend la cellulose physiquement inaccessible aux enzymes.
- **La surface accessible** qui permet une plus grande exposition de matière aux enzymes à chaque instant. En revanche, cette surface est aussi le reflet des modifications chimiques qui ont lieu, que ce soit lorsque les hémicelluloses sont hydrolysées ou lorsque les humines sont produites par exemple. A ce titre, l'évaluation de l'implication de la surface accessible seule dans la digestibilité des substrats est délicate à évaluer pour chaque échantillon.
- **L'indice de cristallinité de la cellulose**. Plus précisément, plus il existe des plages de sévérités (douces, ou au contraire très sévères), pour lesquelles la phase cristalline de la cellulose ralentit la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Cependant, cela ne change pas la quantité de cellulose qui peut être convertie en attendant suffisamment longtemps (à 72 h notamment, qui est le rendement en glucose le plus souvent observé, notamment dans la littérature). Compte tenu de la plage de valeur rencontrée pour les échantillons de l'étude, ce paramètre un effet délétère significatif seulement en début d'hydrolyse

On commence à distinguer le fait que le rendement en glucose à un temps donné est le résultat d'une contribution temporelle qui exprime en quelque sorte l'efficacité des enzymes à un moment donné. Cette efficacité tient compte de la quantité d'enzymes disponibles, de l'équilibre dynamique qui en résulte d'adsorption-désorption des enzymes au niveau de la cellulose, et d'une contribution fixe qui exprime la quantité totale de cellulose qui peut être convertie en attendant suffisamment (dans l'absolu, un temps infini).

4. Mise en équation

Dans ce chapitre, il sera tenté d'exprimer temporellement le rendement en glucose comme une fonction des descripteurs physicochimiques identifiés précédemment.

a. La méthodologie

Le rendement en glucose est défini au cours du temps grâce à l'Équation (4) par deux paramètres R_m et k qui désignent respectivement le rendement en glucose maximal qui peut être atteint et la constante de vitesse. On a vu que k dépendait de l'indice de cristallinité alors que le rendement maximal variait en fonction de la teneur en hémicelluloses, de la teneur en humines, et de la surface BET :

$$k = f(IC_{cell}) \quad \text{Équation (2)}$$

$$R_m = g(S_{BET}, [Hem], [Hum]) \quad \text{Équation (3)}$$

b. La détermination de l'expression du R_m

On met d'abord en équation le rendement maximal R_m . La surface a un rôle positif sur le rendement maximal de conversion. A l'inverse les hémicelluloses et les humines limitent l'accessibilité de la cellulose. De plus, l'accessibilité de la cellulose rendue possible par le retrait des hémicelluloses (et respectivement, la faible présence d'humines) est conditionnée par la surface accessible. Pour cette raison, on cherche deux fonctions croissantes f et g , telles que f soit fonction du rapport $S_{BET}/[Hem]$, et g fonction du rapport $S_{BET}/[Hum]$. Ces deux fonctions sont telles que R_m est une fonction affine de f aux phases 1 et 2 (sévérités faibles et intermédiaires), et de g en phase 3 (forte sévérité).

Dans un premier temps on cherche une expression du type $K_1 \cdot \ln\left(\frac{S_{BET}^a}{[Hem]^b}\right)$ avec A , a et b des puissances à déterminer, pour lesquelles l'expression évolue de manière affine avec R_m lorsque des hémicelluloses sont présentes (phases 1 et 2 principalement). Les coefficients a et b représentent l'importance relative de l'effet de la surface et du taux d'hémicelluloses. Comme le montre la Figure 114, on a bien la relation suivante :

$$R_m = -2 \cdot \ln\left(\frac{[Hem]^{4,7}}{S_{BET}^{4,3}}\right) + 49 \quad \text{Équation (5)}$$

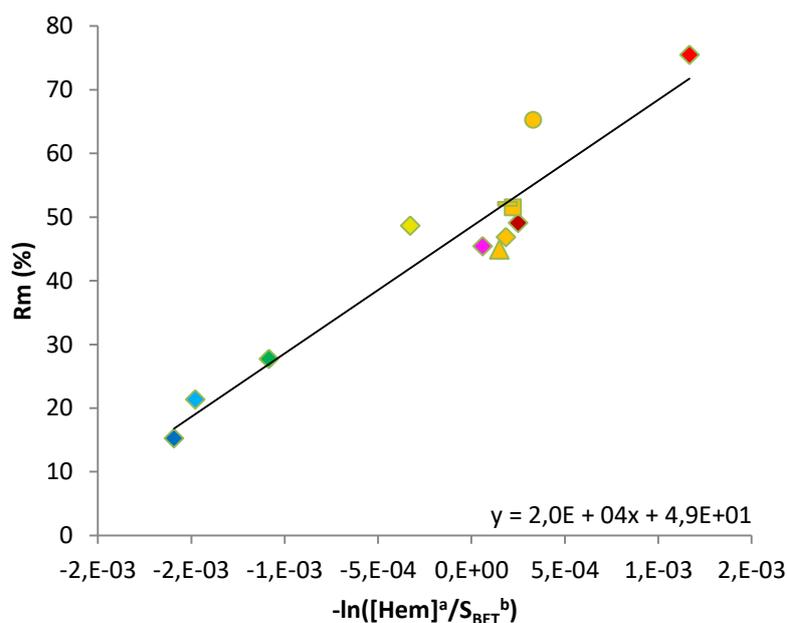


Figure 114 : Graphique représentant la relation affine entre le R_m et le ratio $-\ln([Hem]^a/S_{BET}^b)$

Relions maintenant le rendement maximal R_m en fonction de la teneur en humines déterminée à partir de l'aire de la bande IR à 1700cm^{-1} , en raisonnant de la même manière que pour les hémicelluloses. Ainsi, et comme le montre la Figure 115, on a la relation suivante pour les échantillons présentant des humines (phase 3) :

$$R_m = -4,3 \cdot 10^{-4} \cdot \ln\left(\frac{[Hum]^{14,6}}{S_{BET}^{8,5}}\right) + 31,4 \quad \text{Équation (6)}$$

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

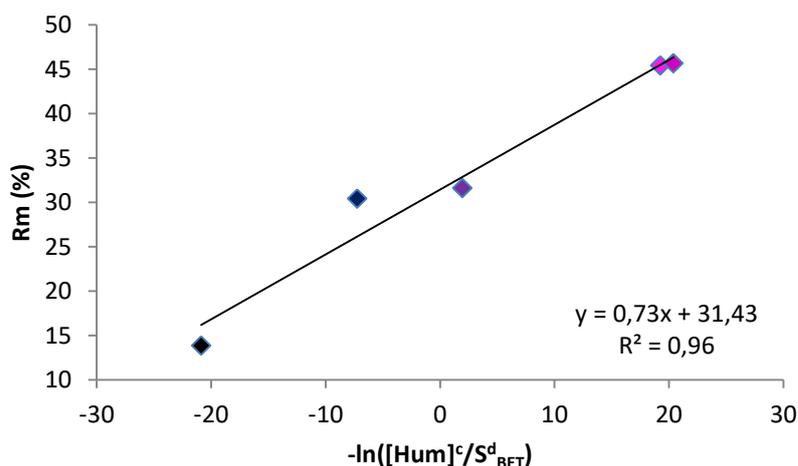


Figure 115 : Evolution du rendement maximal R_m en fonction de l'expression $-\ln([Hum]^c/S^d_{BET})$ pour les échantillons présentant des humines)

Deux domaines quasi disjoints existent pour lesquels les rendements maximaux sont définis par l'Équation (5) et l'Équation (6). Par la similarité des expressions et la présence de la surface BET dans les deux cas au dénominateur, le rendement maximal en glucose peut s'exprimer sous une forme regroupée des deux expressions, moyennant les ajustements idoines des paramètres, qui s'écrirait sous la forme suivante :

$$R_m(\%) = -K_8 \cdot \ln\left(\frac{[Hem]^a + K_b \cdot [Hum]^b}{S^c_{BET}}\right) + K_9 \quad \text{Équation (7)}$$

Après ajustements successifs, on trouve : $K_8=7,5$; $K_9=46,2$; $a=1,14$; $b=1,55$; $K_b=18,3$, et $c=1,20$.

La Figure 116 représente le rendement R_m prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement déterminé à partir du modèle cinétique ajusté sur les données expérimentales. Cette figure illustre bien la qualité de la prédiction et la pertinence des descripteurs choisis pour ce lot d'échantillons.

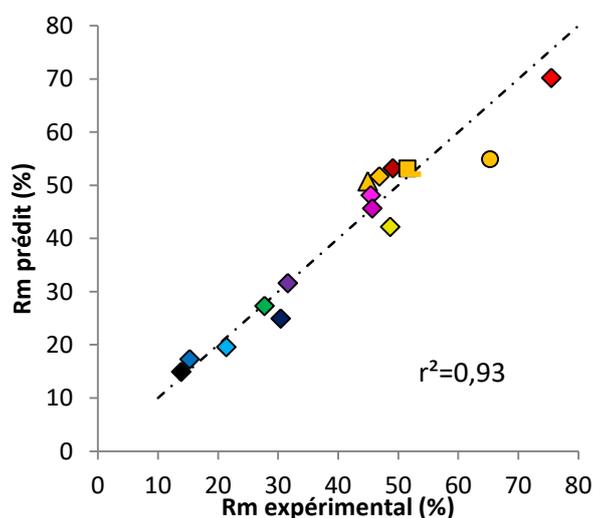


Figure 116 : Rendement maximal prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement maximal déterminé à partir des points expérimentaux et du modèle cinétique

Cependant il faut bien noter que cette expression n'est pas majorée, il existe donc des domaines sur lesquels cette équation ne peut pas fonctionner car la prédiction pourrait par exemple être supérieure à 100 %. Pour obtenir un rendement décrit qui soit R_m peut être exprimé sans logarithme et sous la forme :

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

$$R'_m (\%) = 100 \left(1 - \kappa \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^\gamma} \right)^\delta \right) \quad \text{Équation (8)}$$

Pour arriver à cette expression, la même méthodologie peut être menée en raisonnant sur les hémicelluloses pour les phases 1 et 2, et sur les humines pour la phase 3, mais on peut aussi directement considérer l'écriture de R_m de l'Équation (7) en écrivant le nouvel R'_m tel que $R'_m = 100 \cdot (1 - K_{10} e^{-R_m/\tau})$. Après simplification de l'expression et renommage des coefficients, on retombe bien sur l'Équation (8).

Sous cette forme, le rendement est certes borné, mais les rendements en glucose élevés sont aussi sous-estimés (graphe non montré). En se permettant une majoration trop élevée physiquement (supérieure à 100 %, donc pour des substrats extrêmement digestes tels des aérogels de cellulose ou de la cellulose bactérienne, cela poserait problème), la liberté accordée permet un ajustement plus satisfaisant pour les hauts rendements en glucose (Figure 117).

On a alors :

$$R_m (\%) = K_0 \left(1 - \kappa \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^\gamma} \right)^\delta \right) \quad \text{Équation (9)}$$

Cette expression sera considérée par la suite pour la prédiction des rendements en glucose au cours du temps. Les paramètres obtenus sont $K_0 = 197$; $\kappa = 0,76$; $\alpha = \gamma = 0,59$; $K_\beta = 4,6$; $\beta = 0,69$; et $\delta = 0,1$ (posé "arbitrairement" entre 0 et 1). La surface BET est exprimée en m^2/g , la teneur en hémicelluloses et en humines est exprimée en pourcentage relatif et massique.

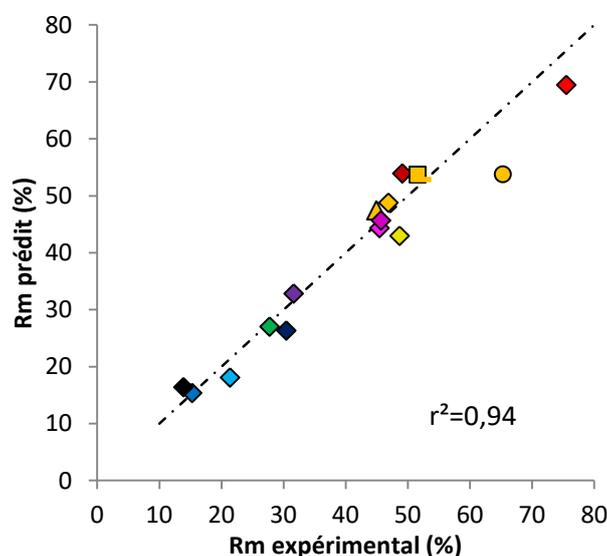


Figure 117 : Rendement maximal prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement maximal déterminé à partir des points expérimentaux et du modèle cinétique

Compte tenu des échantillons à disposition, cette équation est valable pour des teneurs en hémicelluloses comprises entre 0 et 30 % pds, des teneurs en humines comprises entre 0 et 25 % pds, et une surface BET comprise entre 1 et 24 m^2/g .

Le fait que la surface BET intervienne dans l'équation depuis l'échantillon de paille native jusqu'à l'échantillon le plus sévèrement prétraité indique que la surface accessible reste un descripteur clef de la réactivité des substrats quelle que soit la chimie de la matrice.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Par la structure de l'équation, on se rend compte que la surface BET joue un rôle important lorsque celle-ci est faible. A l'inverse, plus la surface augmente, moins son importance se fait sentir. Il en est de même pour l'effet des hémicelluloses ou des humines, pour lesquelles la baisse engendrée de rendement est plus conséquente lorsque les concentrations sont faibles. Quant aux coefficients α , β , et γ , ils représentent l'importance relative des hémicelluloses, des humines et de la surface accessible, dans l'accessibilité de la cellulose.

Ceci est plutôt cohérent physiquement si l'on suppose que les hémicelluloses les plus stables peuvent encore limiter l'accessibilité de la cellulose par leur distribution surfacique sur le pourtour des fibrilles de cellulose. Pour ce qui est des humines, leur présence est visiblement délétère pour l'accessibilité de la cellulose dès leur formation. Leur formation est d'origine exogène à la matrice car les précurseurs sont issus des produits de dégradation (solubles) des polysaccharides. On peut donc penser que ces humines recouvrent d'abord la surface de la matrice, avant de s'accumuler de manière conséquente. Dans un tel cas, une faible présence d'humines (de l'ordre du pourcent) semble suffire à masquer la cellulose des enzymes.

c. La détermination de l'expression de la constante de vitesse k

On a vu précédemment que la constante de vitesse k peut être reliée avec la cristallinité de la cellulose, à l'aide d'une fonction continue affine par morceau (voir plus haut la Figure 105). Trois domaines d'indice de cristallinité sont définis, sur lesquels on exprime la constante de vitesse k par :

$$\text{Pour } IC_{cell} \leq \frac{b_1 - k_0}{a_1} \quad \text{Équation 10.1}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} k = a_1 \cdot IC_{cell} + b_1 \\ k = k_0 = 2,1 \cdot 10^{-2} h^{-1} \\ k = a_2 \cdot IC_{cell} + b_2 \end{array} \right. \quad \text{Pour } \frac{b_1 - k_0}{a_1} \leq IC_{cell} \leq \frac{b_2 - k_0}{a_2} \quad \text{Équation 10.2}$$

$$\text{Pour } IC_{cell} \geq \frac{b_2 - k_0}{a_2} \quad \text{Équation 10.3}$$

Avec $a_1 = 7 \cdot 10^{-3} h^{-1}$; $b_1 = 0,21 h^{-1}$; $k_0 = 0,021 h^{-1}$; $a_2 = 5,3 \cdot 10^{-3} h^{-1}$; $b_2 = 0,25 h^{-1}$

La Figure 118 représente les valeurs calculées en fonction des valeurs déterminées à partir des rendements expérimentaux et de l'ajustement des paramètres cinétiques en conséquence.

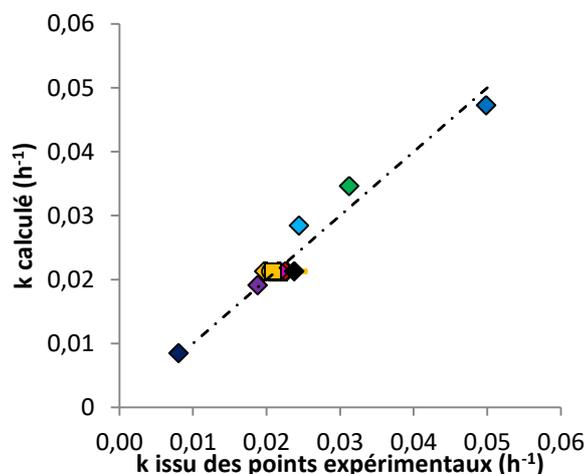


Figure 118 : Calcul des constantes de vitesse à partir de l'indice de cristallinité, en fonction de la constante de vitesse déterminée à partir des rendements en glucose expérimentaux et au cours du temps

d. Le rendement en glucose exprimé au cours du temps à partir des descripteurs

A partir des expressions du R_m et de la constante de vitesse k du paragraphe précédent, le rendement en glucose à un instant t s'exprime donc comme une fonction des propriétés physicochimiques clefs des échantillons (teneur en hémicelluloses, surface BET, teneur en humines, et indice de cristallinité de la cellulose), par l'expression suivante :

$$R(t) = \left(K_0 \cdot \left(1 - K \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^Y} \right)^\delta \right) \right) \times (1 - e^{-k.t})^n \quad \text{Équation (11)}$$

Avec la constante k définie par l'Équation 10 dépendamment du domaine de l'indice de cristallinité de la cellulose.

La Figure 119 montre les cinétiques prédites pour l'ensemble des échantillons produits par traitement à l'acide dilué, avec pour comparaison les points expérimentaux. Globalement, les rendements en glucose sont prédits de manière satisfaisante, à l'exception de l'échantillon C060Cc, qui était déjà singulier (voir la première partie de ce chapitre).

La même démarche pourrait être réalisée pour les échantillons produits par explosion vapeur, en réajustant à façon les paramètres de l'équation, par le fait que la dose d'enzyme n'était pas la même que dans le cas des échantillons produits exclusivement par traitement à l'acide dilué. Cependant la démarche n'a pas été conduite, notamment par le fait que les analyses RMN permettant d'obtenir les indices de cristallinité n'ont pas été réalisées de manière exhaustive pour ces échantillons.

Grâce à un tel modèle non linéaire, il est possible de traduire d'une certaine manière les relations reliant les paramètres clefs entre eux. En d'autres termes, à travers l'expression algébrique choisie, l'effet d'un descripteur sur la conversion de la cellulose sera directement dépendant de la valeur des autres descripteurs, contrairement à ce que donnerait une approche linéaire. De plus, dans notre cas, la situation a été facilitée par le fait que les effets des hémicelluloses et des humines sur les rendements en glucose s'expriment sur des domaines de conditions opératoires quasi disjoints. De ce fait, le seul paramètre non trivial dont l'effet s'exprime sur tous les domaines de conditions opératoires de prétraitement est la surface accessible.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

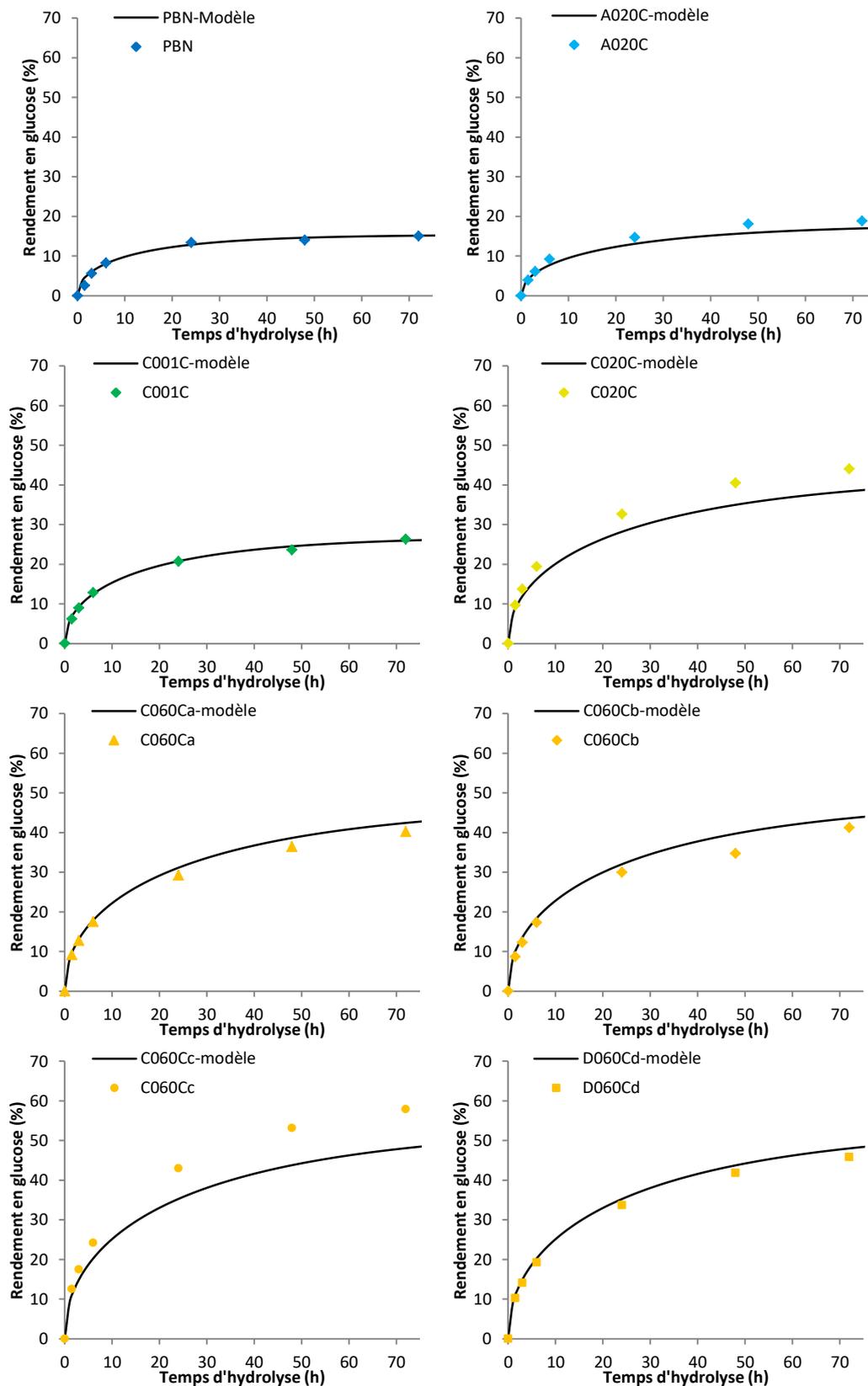


Figure 119 : Rendements en glucose mesurés (points) et prédiction des rendements sur la base du modèle cinétique dont les paramètres R_m et k sont reliés aux descripteurs déterminés

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

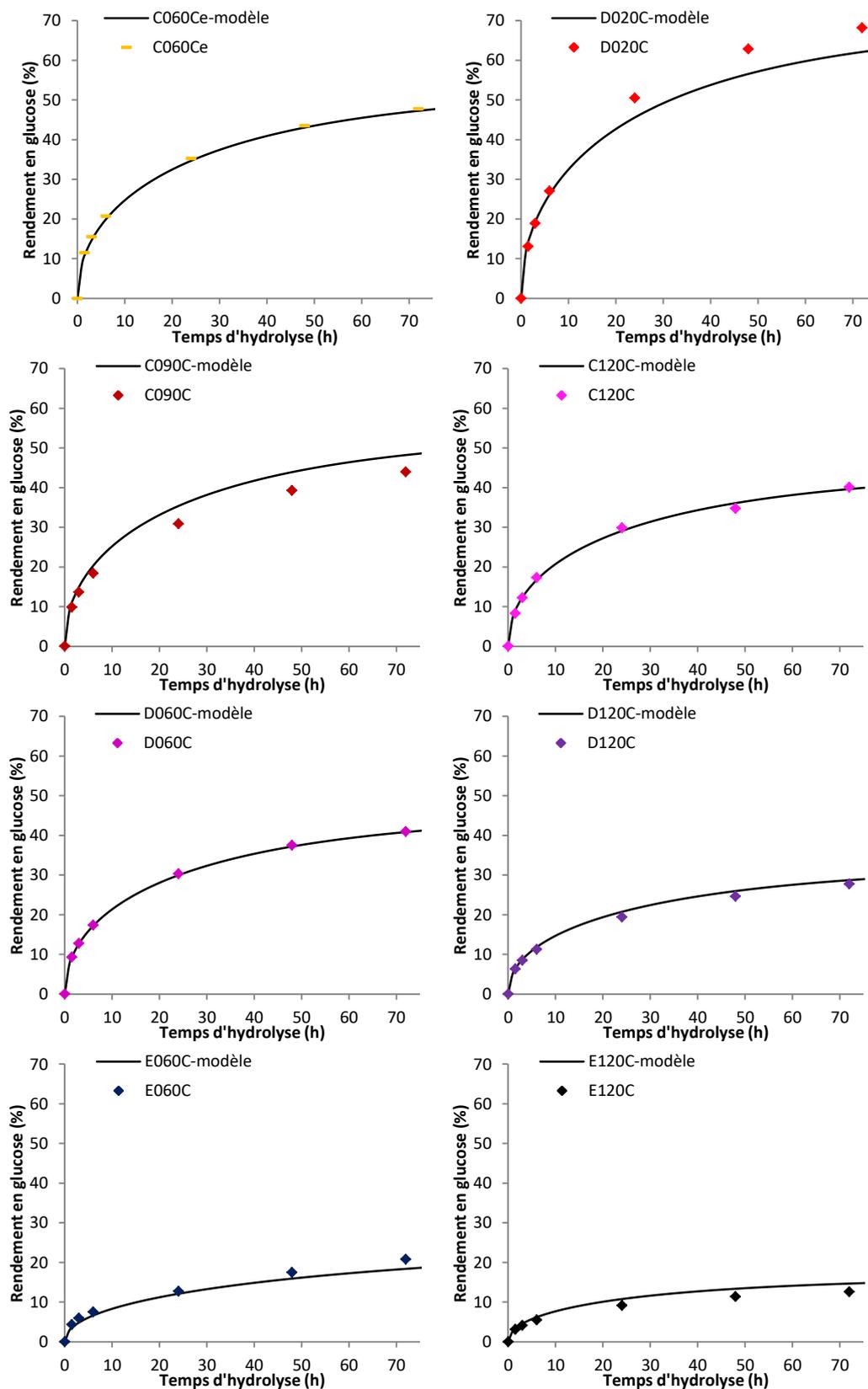


Figure 119 : Rendements en glucose mesurés (points) et prédiction des rendements sur la base du modèle cinétique dont les paramètres R_m et k_e sont reliés aux descripteurs déterminés (continuation)

e. Mise à l'épreuve du modèle de prédiction du Rm

On souhaite étudier la validité du modèle sur d'autres échantillons prétraités à l'acide dilué. Pour cela, on s'intéresse aux échantillons A060C (produit à 100 °C pendant 60 min, sévérité de 1,8), C030C (140 °C/30 °C, sévérité de 2,7), et E010C (180 °C/10 min, sévérité de 3,5) qui ont été utilisés pour l'étude de la modification de la surface accessible à chimie identique sur la réactivité des substrats (voir le paragraphe VI.c.ii). On calcule pour ces trois échantillons sous leur forme séchée en étuve et sous leur forme non séchée, les rendements Rm à partir de l'Équation (9). Le graphique de parité est présenté sur la Figure 120, avec pour comparaison le positionnement des autres points de l'étude, en noir. Les 3 échantillons non séchés sont représentés par des triangles, et les 3 échantillons séchés en étuve sont représentés par des cercles.

La prédiction de ces 6 nouveaux points est satisfaisante, ce qui montre que l'équilibrage des descripteurs est correct, et que les descripteurs choisis suffisent encore à caractériser la digestibilité des substrats. Seul l'échantillon E010C de la phase 3, est prédit avec une erreur significative de 16 % pour la préparation séchée, et de 14 % pour la préparation classique (laissée humide). Vu les différents positionnements de ces différents échantillons, il est possible que l'effet de la surface soit légèrement surestimée en phase 1, correctement pris en compte en phase 2, et probablement sous-estimée en phase 3.

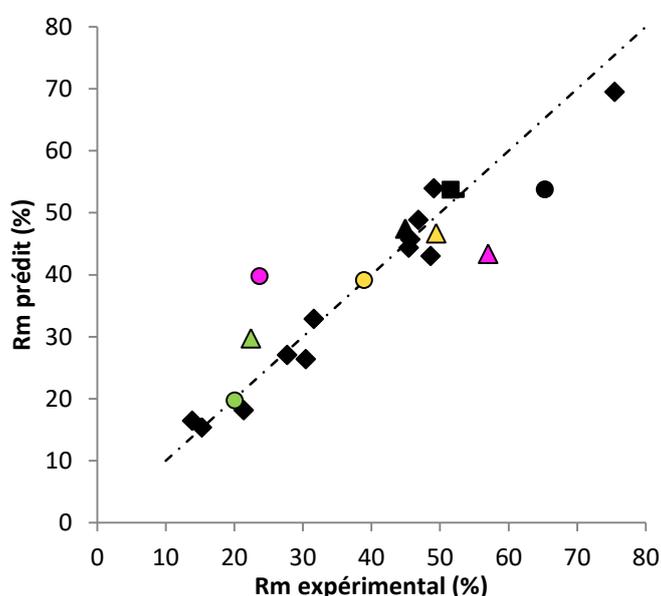


Figure 120 : Rendement Rm prédit en fonction du rendement Rm par ajustement du modèle cinétique empirique aux points expérimentaux, des échantillons A060C (vert clair), C030C (jaune pâle), et E010C (mauve). Les cercles représentent les échantillons séchés en étuve, les triangles représentent les échantillons classiques (non séchés)

f. Discussions sur le modèle

Le modèle empirique et son élaboration sont satisfaisants sur le lot d'échantillons considéré. En effet, sa construction a permis d'affiner la compréhension sur les descripteurs de la réactivité, et notamment sur leurs rôles respectifs "indépendamment" les uns des autres. Ensuite, ce modèle est simple d'utilisation, et la méthodologie est facilement transposable à d'autres procédés, au cas par cas.

En supposant que l'on souhaite garder la forme de ce modèle qui est particulièrement pratique d'utilisation et facile à conceptualiser, une perspective pourrait être de prendre en compte les évolutions des descripteurs au cours de l'hydrolyse enzymatique. En effet, on se sert de ces paramètres de manière figée, comme une "photographie au temps 0", sans considérer qu'ils évoluent au cours de l'hydrolyse enzymatique et donc qu'ils sont susceptibles de rétroagir sur la cinétique de la dégradation (en jouant à la fois sur la constante de vitesse k et de la cellulose accessible à travers la grandeur Rm). En conséquence, la

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

mesure des paramètres clefs au cours de l'hydrolyse pourrait permettre à la fois d'affiner la prédiction des rendements en glucose pour les longs temps d'hydrolyse, et d'améliorer la robustesse du modèle. De ce fait, on aurait $k = k(t)$ et $R_m = R_m(t)$. Ces aspects seront étudiés dans le chapitre suivant. Par la perte de linéarité observée entre les rendements de conversion aux faibles avancements par rapport à ceux aux longs temps d'hydrolyse, considérer des paramètres k et R_m constants ne sauraient être satisfaisant pour les longs temps d'hydrolyse (144 h par exemple). La Figure 121 illustre cela en montrant les rendements en glucose à 48 h (a) et à 144 h (b) en fonction des rendements en glucose à 1,5 h. Pour le premier graphe, la relation liant les 2 rendements en glucose présente une faible dispersion, contrairement au graphe de droite.

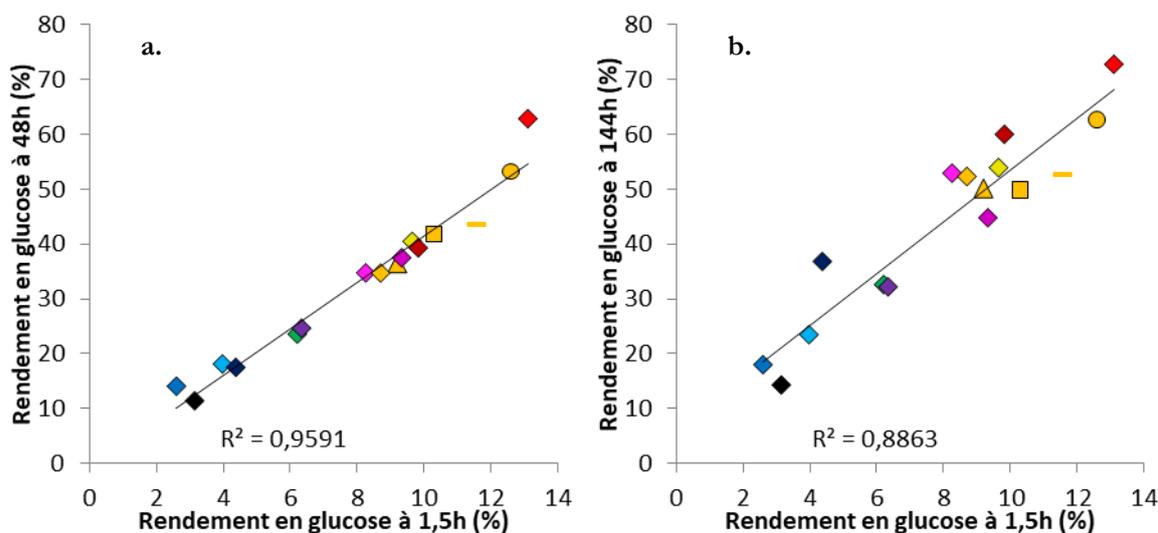


Figure 121 : Rendements en glucose à 48 h (a) et à 144 h (b) en fonction du rendement en glucose à 1,5 h

L'amélioration (en termes de robustesse et d'identification de nouveaux descripteurs) du modèle passera aussi par la considération de nouvelles biomasses voire de nouveaux procédés de prétraitement. Par exemple, il est probable que le paramètre d'ajustement α (et possiblement les autres) soit spécifique du type de biomasse, car la nature des hémicelluloses (et donc son comportement durant le prétraitement) varie grandement d'une essence à une autre.

Enfin, il serait intéressant d'exprimer des coefficients de digestibilité intrinsèque (indépendants de la dose d'enzyme ou des conditions opératoires), à partir des descripteurs physicochimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique. Les rendements en glucose expérimentaux seraient alors ensuite calculés compte tenu des conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique, du cocktail enzymatique utilisé, de la concentration en enzymes choisie, etc...

D'autres méthodologies, telles que la régression multilinéaire, PLS, ou encore l'analyse multiblock sur plusieurs jeux de données issus de caractérisations non homogènes pourraient être envisagées, dans un premier temps pour confirmer ce qui a été établi, ou prédire une nouvelle. Cependant, si ces analyses présentent un potentiel certain, elles sont rapidement limitées :

- Ces méthodes qui manipulent des objets linéaires, ne peuvent par définition pas rendre compte correctement de phénomènes non linéaires.
- Dans le cas de régressions (PLS par exemple) réussies, l'interprétation des résultats peut être délicate.
- Les données qui diffèrent par des décalages (de temps, nombre d'onde, longueur d'onde, diamètre, etc), ne se prêtent pas directement à l'analyse chimiométrique.
- Pour les jeux de données qui sont obtenus sur des pas (temporels, spatiaux, etc.) non constants et distincts d'une acquisition à une autre (typiquement, les distributions en taille de pores), le traitement est tout de suite plus complexe (utilisation d'une fonction d'interpolation continue).

g. Synthèse

Les descripteurs de la biomasse lignocellulosique ont été étudiés en première partie de ce chapitre, et leurs effets ont été quantifiés dans une certaine mesure, en deuxième partie de chapitre.

Les principales conclusions retenues sont les suivantes :

- La surface accessible conditionne l'accessibilité de la cellulose aux enzymes dépendamment de la teneur en hémicelluloses et en humines, et réciproquement. Ces trois paramètres interdépendants sont les trois descripteurs pour lesquels les contributions relatives vis-à-vis de l'accessibilité de la cellulose ont été déterminées
- La grandeur k qui représente le taux instantané de conversion de la cellulose rapporté à la quantité totale de cellulose accessible est, au stade de notre compréhension, uniquement liée à la cristallinité de la cellulose. Plus le temps d'hydrolyse est grand, moins ce paramètre s'exprime (au profit de la quantité de cellulose directement accessible). Pour la paille de blé et dans des conditions opératoires crédibles de prétraitement pour une industrialisation (donc dans la phase 2), cette constante k est commune aux différents échantillons.
- La répartition de la lignine dans la matrice est très probablement un paramètre qui manque pour prédire complètement les rendements en glucose pour des substrats produits par des prétraitements de type traitement à l'acide dilué, explosion à la vapeur, ou encore prétraitement hydrothermal. La difficulté de prise en compte de ce descripteur vient du fait qu'il est difficile de lui associer une valeur numérique, et qu'il est largement dépendant de l'hydrolyse des hémicelluloses, du temps de séjour et du refroidissement (dans le cas d'un traitement à l'acide dilué), et du type de détente explosive effectué. Ce paramètre pourrait expliquer pourquoi le modèle établi sur les échantillons produits par traitement à l'acide dilué, est sensible sur la plage de sévérité de 3 à 3,3.
- Les descripteurs considérés sont susceptibles d'évoluer au cours du temps. Pour prédire de manière précise et pour tout temps les rendements en glucose, il serait donc nécessaire de connaître l'évolution temporelle desdits descripteurs, ce qui constitue un défi majeur car leur évolution est conditionnée par la physicochimie (et donc aussi par ces mêmes descripteurs) des substrats. Il y a donc rétroaction des descripteurs sur eux-mêmes, ce qui pourrait se traduire par un système d'équations différentielles non linéaires à plusieurs variables.

En outre, les coefficients du modèle établis seront probablement dépendants de la biomasse considérée

A ce stade de la compréhension, un prétraitement à l'acide dilué optimisé (avec ou sans détente explosive) doit présenter des caractéristiques particulières. En effet, il doit être suffisamment sévère (par la température et/ou le temps de séjour) pour retirer toutes les hémicelluloses, et être suffisamment chaud pour ramollir significativement la lignine qui va alors se délocaliser. Par ailleurs, il doit présenter un temps de séjour suffisamment court pour ne pas créer d'humines ni réaliser une relocalisation dans les tissus de la lignine qui s'était délocalisée sous forme compacte.

Des substrats de pailles prétraitées à l'acide dilué puis soumis à une détente explosive à différentes pressions ont été également caractérisés. Dans les cas où la reprise d'hydrolyse des hémicelluloses (lors du réchauffage avant détente explosive) n'a pas lieu (soit parce que l'échantillon ne présente plus assez d'hémicelluloses instables, soit parce que le réchauffage n'a pas été assez intense : 7 et 14 bar), la détente a un effet néfaste sur la digestibilité des substrats (ou aucun effet, dans le meilleur des cas). Pour autant, la surface accessible a été légèrement augmentée suite à l'explosion. La perte de digestibilité occasionnée par la détente explosive en dépit d'une surface augmentée n'est pas totalement comprise. A l'heure actuelle, on privilégie l'hypothèse d'une évolution de la chimie de surface dépendamment de la température de réchauffage avant détente explosive, qui serait néfaste pour l'accessibilité de la cellulose et compenserait la création de surface occasionnée par la détente explosive. Le protocole de production des échantillons étant lui-même critiquable par la dissociation de l'étape de cuisson en milieu acide et de l'étape d'explosion à la vapeur qui a nécessité un réchauffage de la matière, il est difficile de se prononcer sur ce phénomène dont l'origine vient possiblement d'un biais expérimental.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Le modèle de prédiction du rendement en glucose établi empiriquement sur la base des échantillons issus d'un prétraitement à l'acide dilué ne peut pas être employé tel quel sur les échantillons prétraités par explosion vapeur car la dose d'enzymes utilisée pour les hydrolyses enzymatiques diffère significativement entre les deux lots d'échantillons.

Ce modèle repose sur des considérations macroscopiques. Cependant il ne donne pas vraiment d'indices concernant les mécanismes précis impliqués lors de la conversion de la cellulose, que ce soit au niveau de l'affinité des enzymes pour chaque tissu, la présence d'adsorption non productive sur la lignine ou les humines, ou encore sur le blocage progressif des enzymes dans la matrice. Voilà pourquoi le suivi des échantillons au cours de l'hydrolyse et notamment par approche microscopique sera très intéressante à développer dans le prochain chapitre.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

VII. Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

On a pu observer dans le chapitre précédent que le suivi des paramètres physicochimiques est essentiel si l'on souhaite prédire de manière plus juste les rendements en glucose au cours du temps, ceux-ci évoluant au cours du temps. L'objectif de cette étude est de regarder l'évolution de certains de ces paramètres au cours de l'hydrolyse enzymatique pour décrypter les différents phénomènes impliqués lors de cette saccharification. Cette approche complémentaire peut servir à identifier les mécanismes les plus importants dans la dégradation de la matrice lignocellulosique et obtenir de nouveaux éléments de réflexion quant aux descripteurs en eux-mêmes.

Deux approches ont été mises en place de manière cohérente afin d'apporter des réponses complémentaires pour une même série de substrats prétraités. La première consiste en l'analyse de substrats prélevés à différents temps d'hydrolyse enzymatique (deux échantillons ont été utilisés), et la deuxième passe par l'analyse dynamique en microscopie, de substrats pendant la dégradation. Pour ce faire, on a sélectionné des échantillons communs sinon directement comparables. Pour l'étude *ex situ*, les échantillons A020V00 et C020V00 ont été choisis (granulométrie avant prétraitement de 20 mm), alors que pour l'approche *in situ*, ce sont les échantillons A020C, C020C et D020C qui ont été retenus. A020C, C020C ne diffèrent des échantillons retenus pour l'analyse *ex situ* que par leur granulométrie avant prétraitement qui est de 2 mm, et de l'unité de prétraitement. Les compositions chimiques des échantillons concernés sont également similaires deux à deux.

1. Les prélèvements au cours de l'hydrolyse

a. Les échantillons de l'étude

Deux échantillons produits à Gembloux par prétraitement à l'acide dilué de la paille broyée 20 mm ont été sélectionnés pour réaliser cette étude consistant en le suivi des paramètres physico-chimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique (prélèvement). Il s'agit des échantillons A020V00 et C020V00 produits à des températures de 100 °C et 140 °C, et un temps de résidence de 20 min.

Du fait des quantités disponibles assez limitées, les compositions de chacun des prélèvements n'ont pas été déterminées par analyse chimique mais par analyses spectroscopiques IR (voir les chapitres concernés).

La composition des échantillons de l'étude avant hydrolyse est indiquée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Composition chimique des échantillons de l'étude, avant hydrolyse

Echantillon	Cellulose (% ms)	Hémicelluloses (% ms)	Fraction non polysaccharidique (% ms)
A020V00	43,2	28,3	28,5
C020V00	59,1	6,8	34,1

Pour cette étude, nous souhaitons suivre l'échantillon à 3 h (T1), 6 h (T2), 24 h (T3) et 48 h (T4) d'hydrolyse (Tableau 23). Comme nous souhaitons pouvoir disposer de l'échantillon total à chaque prélèvement, une hydrolyse a été réalisée pour chaque prélèvement en duplicata pour s'assurer de la fiabilité de la conduite de l'hydrolyse.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tous ces prélèvements ont été étuvés à 80 °C pour dénaturer les enzymes et stopper définitivement la dégradation enzymatique, puis lavés (extracteur Soxhlet), filtrés (filtre de maillage 11 µm), et enfin lyophilisés pour pouvoir être caractérisés.

A chacun de ces temps, un prélèvement du mélange réactionnel a également été réalisé (pour les prélèvements en cours de dégradation), afin de s'assurer de la conformité du déroulement de la saccharification (reproductibilité, et résultats proches des cinétiques classiques de saccharification de ces échantillons, issus de l'étude sur les substrats traités par explosion à la vapeur). De ce fait, la **dose d'enzymes a été également doublée** pour cette étude, par cohérence avec l'étude précédente.

Tableau 23 : Nomenclature des échantillons et leurs prélèvements, pour le suivi de substrats lignocellulosiques au cours de l'hydrolyse

Echantillon	Sévérité de prétraitement	Temps d'hydrolyse (h)
A020V00T0	1,4	0
A020V00T1		3
A020V00T2		6
A020V00T3		24
A020V00T4		48
C020V00T0	2,5	0
C020V00T1		3
C020V00T2		6
C020V00T3		24
C020V00T4		48

b. Les paramètres suivis

Plusieurs caractéristiques ont été étudiées au cours de l'hydrolyse, par l'analyse des différents prélèvements : le suivi de l'avancement de la conversion par prélèvement du milieu réactionnel et mesure de la concentration en glucose, la granulométrie par diffraction laser, la morphologie (en MEB), l'état de porosité (en physisorption de diazote), la cristallinité de la cellulose restante (en ¹³C-RMN en CP-MAS), afin de les mettre en relation les unes par rapport aux autres et d'identifier des événements clés survenant lors de la dégradation enzymatique de ces substrats lignocellulosiques. La discussion des résultats de cette partie fait l'objet d'un paragraphe dédié, après la présentation des différents résultats.

c. La cinétique de dégradation

La Figure 122 montre la cinétique de saccharification des échantillons A020V00 et C020V00, pour chacun des échantillons dont l'hydrolyse a été stoppée à différents temps (3, 6, 24 et 48 h). Les rendements en glucose à 48 h d'hydrolyse enzymatique sont de 36 % pour l'échantillon A020V00, et de 44 % pour l'échantillon C020V00.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

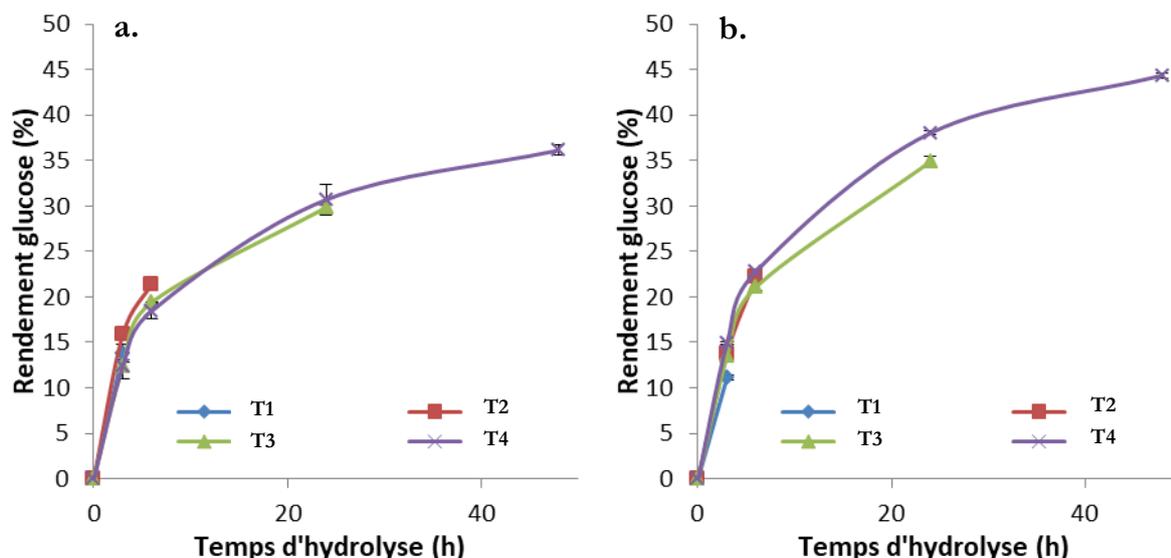


Figure 122 : Evolution du rendement en glucose en fonction du temps d'hydrolyse des échantillons A020V00 (a) et C020V00 (b), pour les différents prélèvements (3, 6, 24, et 48 h)

Les temps de prélèvement ont été choisis afin d'avoir une vue correcte de la cinétique tout en limitant le nombre de prélèvements qui demandent autant d'hydrolyses enzymatiques des deux substrats (dont la quantité disponible reste limitée) que de caractérisations en aval.

d. Le suivi de la taille des particules

Les résultats ci-dessous montrent l'évolution de la distribution en taille de particules mesurées par granulométrie laser au cours de la dégradation en hydrolyse enzymatique pour l'échantillon C020V00 (prétraitement à 140 °C pendant 20 min). Pour information, les particules les plus grosses (>2 mm) ne peuvent pas être caractérisées proprement par cet outil. Pour autant, ces particules peuvent représenter une fraction non négligeable de l'échantillon, en particulier pour l'échantillon A020V00 (voir la partie Figure 123). C'est pour cette raison que l'échantillon A020V00 qui possède une granulométrie globale trop grande, n'a pas été analysé en granulométrie laser, car il aurait fallu réaliser un tamisage à 2 mm pour retirer la fraction grossière, créant de fait un biais de représentativité de l'échantillon.

L'échantillon à T0 est constitué de trois populations de particules de diamètres équivalents autour de 700 μm , 90 μm et 30 μm avec une abondance plus importante de la population présentant un diamètre moyen de 700 μm (Figure 123). Au cours de l'hydrolyse, l'abondance relative des 3 populations évolue mais les trois populations sont conservées jusqu'à la fin de l'hydrolyse. Plus précisément, la population des particules grossières (>250 μm) tend à diminuer au profit des populations des particules plus fines (<250 μm).

Ensuite, on constate que le diamètre de chaque population n'évolue pas de manière conséquente (auquel cas, on observerait un décalage progressif des populations), ce qui témoigne du fait que la taille des particules évolue peu. En revanche, on observe clairement une évolution des proportions relatives des différentes populations.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

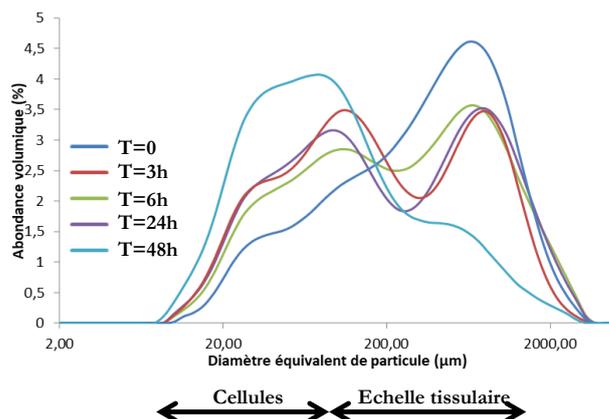


Figure 123 : Distributions granulométriques des différents prélèvements au cours de l'hydrolyse (0, 3, 6, 24 et 48 h) de l'échantillon C020V00

Pour exploiter les variations observées à l'œil sur ces distributions granulométriques, deux approches sont menées. La première consiste à suivre le diamètre à abondance volumique médiane, $d(0,5)$, c'est-à-dire le diamètre pour lequel la moitié des objets mesurés ont un diamètre inférieur à ce diamètre (et donc pour lequel l'autre moitié possède un diamètre mesuré supérieur). L'autre approche consiste à suivre l'abondance volumique de la contribution des particules les plus fines et des plus grandes, en se basant sur l'abondance volumique relative, à trois diamètres fixés $35 \mu\text{m}$ (I_{35}), $100 \mu\text{m}$ (I_{100}) et $630 \mu\text{m}$ (I_{630}), diamètres pour lesquels la population ciblée semble maximale. Cette méthode est critiquable sur le fait que la distribution est tributaire de la modification de forme des contributions (élargissement des contributions notamment, ce que l'on peut imaginer dans un système où l'entropie augmente comme c'est le cas ici) et qui impacte alors les intensités relatives considérées. Malgré cela, cette donnée reste intéressante car plus riche d'information que la simple considération du diamètre médian. La Figure 124 indique que les particules présentes sont de plus en plus petites, avec un effet plus marqué entre 0 et 3 h d'hydrolyse.

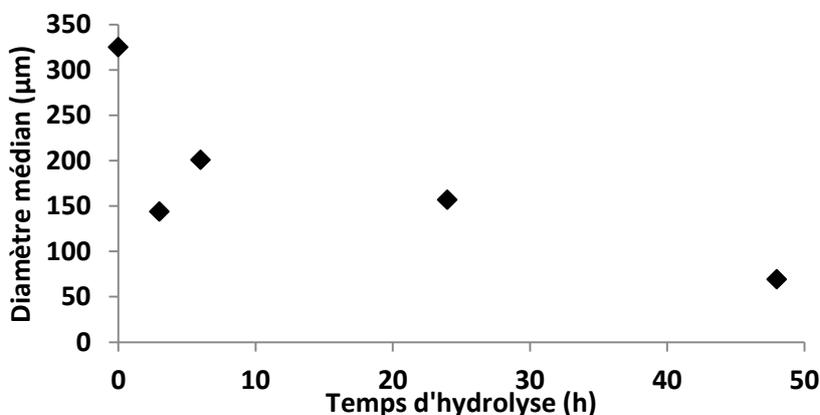


Figure 124 : Evolution du diamètre médian en fonction de la durée de l'hydrolyse enzymatique

La Figure 125 trace l'évolution des valeurs de I_{35} , I_{100} et I_{630} en fonction du temps de l'hydrolyse. On remarque ainsi que la fraction grossière diminue au profit de la fraction fine (et intermédiaire), d'abord en début d'hydrolyse (3 h), puis en toute fin d'hydrolyse (48 h). Ceci témoigne bien de la fragmentation qui se déroule à cette échelle, et non pas d'une réduction en taille de chacune des populations. La fraction intermédiaire se comporte globalement comme la fraction fine et est également plus présente au fur et à mesure de la réaction. Il est intéressant de noter que la population de particules ayant un diamètre avoisinant $35 \mu\text{m}$ ne fait pas l'objet d'une fragmentation ultérieure, ce qui suppose que ces particules (dont l'échelle correspond à celle du diamètre des petites cellules lignifiées type sclérenchyme) sont très stables. Par ailleurs, on constate la présence d'un plateau entre 3 et 24 h d'hydrolyse, signe que la matrice est plutôt stable à ce stade de la dégradation.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

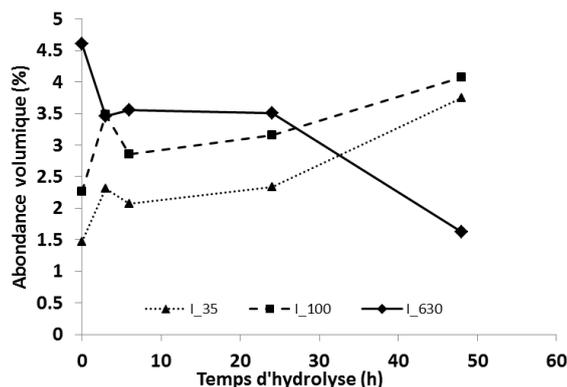


Figure 125 : Evolution des intensités des distributions, mesurées aux maximums locaux (ou aux épaulements, le cas échéant) des contributions à 630, 100, et 35 μm

e. La morphologie à différentes échelle par MEB

i Paille faiblement prétraitée (A020V00)

Les observations de l'échantillon de paille ayant subi le traitement de paille le plus doux (100 °C pendant 20 min) ne montrent pas de différences significatives à faible grandissement au cours du temps en première partie d'hydrolyse (de 0 à 24 h d'hydrolyse). En revanche on remarque tout de même un état de fragmentation plus avancé entre l'échantillon non hydrolysé et le prélèvement hydrolysé pendant 48 h. En effet, une partie des brins de paille sont décomposés en fibres comme on le voit sur le cliché de la Figure 126a, bien que de gros brins restent encore présents sur d'autres clichés non présentés ici. Les tissus sont donc désassemblés en fibres plus ou moins individuelles vu les diamètres de ces fibres. Des faisceaux vasculaires sont aussi probablement présents. La présence de ces fibres relâchées du reste des brins de paille montre qu'elles sont non digérées. On note aussi que les cellules ne sont pas particulièrement fragmentées transversalement, d'où l'aspect particulièrement filiforme des fibres après hydrolyse. Enfin, comme on peut le voir sur l'épiderme hydrolysé en bas à droite (tissu perforé de manière régulière), les stomates sont des zones de fragilité en hydrolyse et susceptibles d'être dégradées, contrairement au reste de l'épiderme qui semble rester intact, d'où la présence de ces trous régulièrement répartis. Ces observations ont été retrouvées sur d'autres clichés (non présentés).

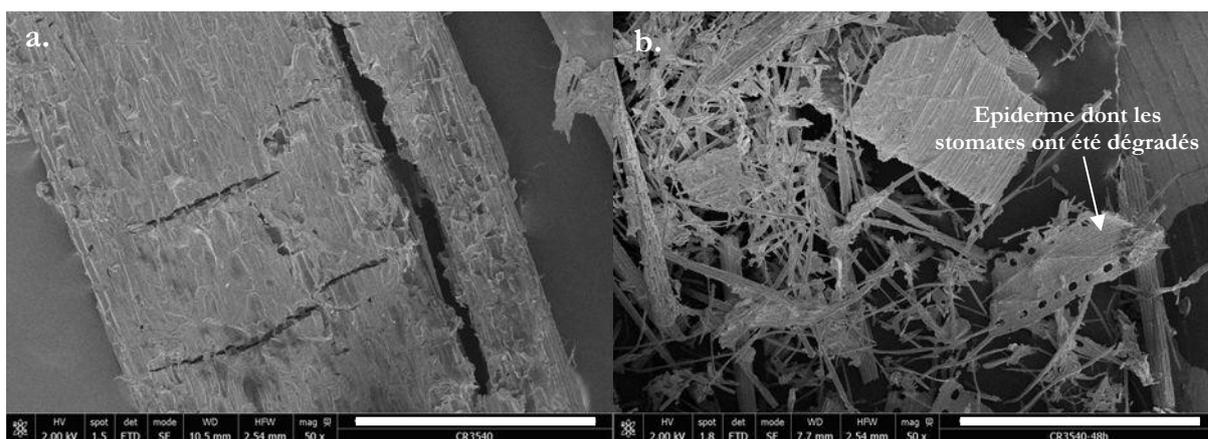


Figure 126 : Observation à l'échelle macroscopique de l'échantillon A020V00 avant hydrolyse (a) et après 48 h d'hydrolyse enzymatique (b). Barre d'échelle de 1 mm

A une échelle plus résolue, il semble que les ponctuations visibles soient plus nombreuses à 48 h d'hydrolyse (Figure 127, flèches rouges), ce qui est plutôt logique si on considère que leur ouverture est en réalité à l'état natif, comblée par de la paroi primaire plutôt cellulosique (et donc assez digeste) des deux cellules adjacentes, appelée dans ce cas précis, torus.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

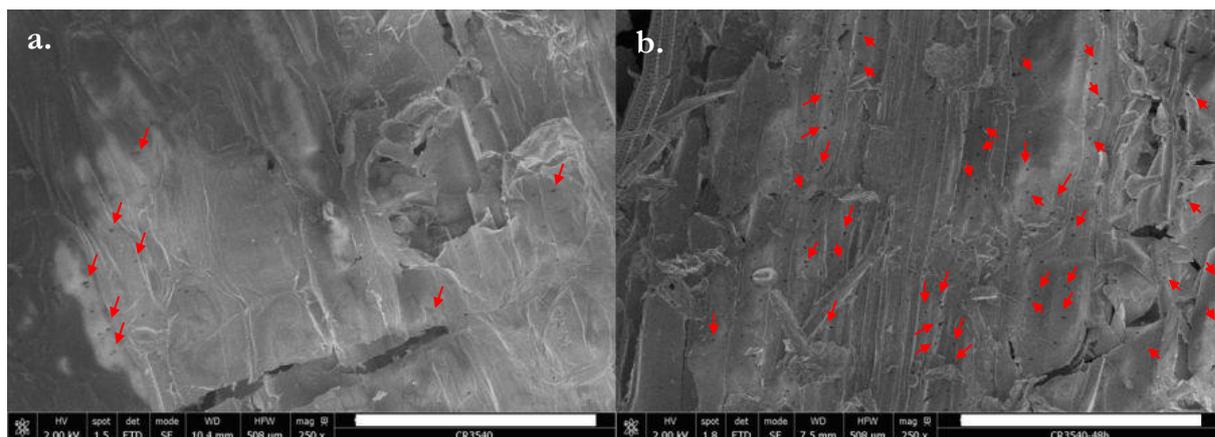


Figure 127 : Cliché microscopique de l'échantillon A020V00, montrant les tissus ponctués (parenchymes principalement) avant hydrolyse enzymatique (a.), 48 h d'hydrolyse (b.). Les flèches rouges indiquent à titre d'exemple quelques ponctuations apparentes. Barres d'échelle : 200 µm (a et b)

Une étude parallèle (présentée en Annexe 3.1) portant sur l'observation au MEB de la dégradation enzymatique de l'échantillon A020C (équivalent de l'échantillon A020V00) en zones repérées confirme cette hypothèse par la mise en évidence de la mise à nu de ponctuations, initialement masquées par du matériel lignocellulosique.

ii Paille prétraitée à sévérité intermédiaire (C020V00)

Concernant l'échantillon C020V00 traité à conditions opératoires plus sévères (140 °C pendant 20 min), l'échantillon présente initialement des fragments de paille peu altérés, et des cellules filiformes enchevêtrées n'appartenant plus à un tissu cohérent, sous la forme d'un agglomérat de particules fines (inférieures à la centaine de micron, voir Figure 128). Au cours de l'hydrolyse, un effet de fragmentation des grosses particules et un désassemblage des agglomérats de particules fines sont observés, mais leur manifestation est principalement observée en fin d'hydrolyse (48 h). Les gros fragments de paille semblent moins présents, ce qui est logique si l'on suppose qu'ils ont été en partie désintégrés en particules fines. Toutefois, certains gros fragments peuvent subsister à l'hydrolyse (non montrés ici). Les particules hydrolysées conservent un caractère fibrillaire, ce qui précise que la fragmentation opérée durant l'hydrolyse se fait principalement entre les fibres et, de manière moins prononcée, de manière transverse à la fibre. Par ailleurs, une très forte hétérogénéité des particules demeure, tant en termes de dimensions, que d'allongements ou même de formes.

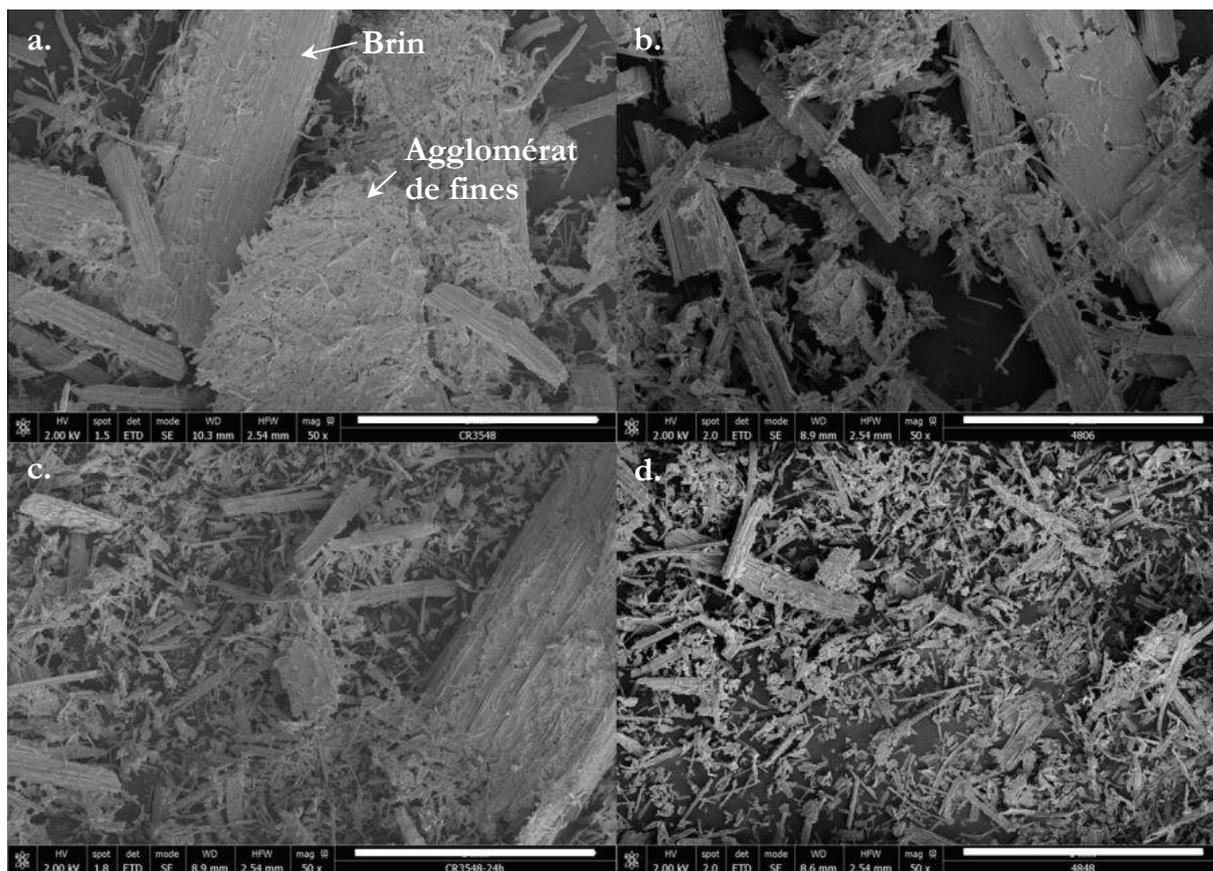


Figure 128 : Cliché MEB à l'échelle macroscopique de l'échantillon C020V00 à 0 h (a), 6 h (b), 24 h (c) et 48 h (d) d'hydrolyse enzymatique. Barre d'échelle : 1 mm

A une échelle un peu plus fine, on constate que les ponctuations visibles sont bien plus nombreuses après hydrolyse (Figure 129a et b), de manière analogue à l'échantillon A020V00. Par ailleurs, sur l'échantillon hydrolysé pendant 48 h, on distingue régulièrement des plis sur certains tissus lisses non hydrolysés. On montre en Figure 129 un exemple de telles commissures (image d, quelques exemples montrés en pointillés verts), qui témoignent d'une fragilité mécanique accrue de certains tissus (parenchyme lignifié semble-t-il ici, vu la taille de la cellule, l'observation de ponctuations, et l'absence de stomate) occasionnée par l'hydrolyse partielle dudit tissu. Ces observations ont été retrouvées sur d'autres clichés (non présentés).

Enfin, au grandissement le plus élevé utilisé ici, on constate qu'entre le temps initial et le temps maximal d'hydrolyse, les surfaces rugueuses sont plus abondantes (Figure 129b et e), et présentent une rugosité de surface distincte de celle observée au temps initial (Figure 129b, c, e et f), dont l'échelle du grammage (la dimension des grains formant la rugosité) dépend des zones observées, variant de l'ordre du micron (Figure 129e, microrugosité) à la cinquantaine de nanomètres (Figure 129f, nanorugosité).

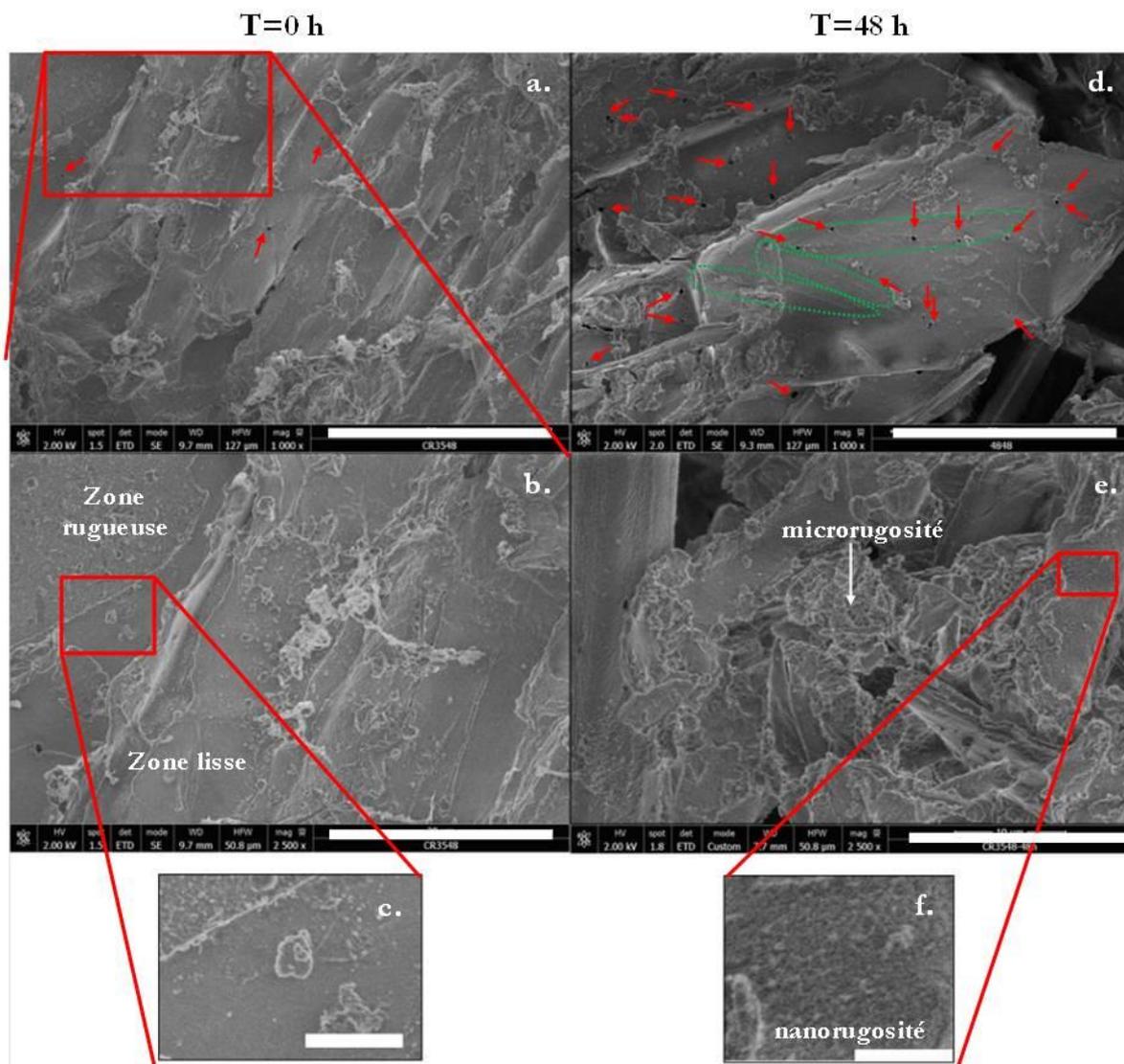


Figure 129 : Clichés MEB de l'échantillon C020V00 montrant l'état de surface avant hydrolyse (a, b et c) et à 48 h d'hydrolyse enzymatique (d, e, et f). Les flèches rouges indiquent les ponctuations visibles, et les pointillés verts des plissures observées en fin d'hydrolyse enzymatique. Les deux dernières images illustrent les différences d'état de surface observées entre l'échantillon intact et l'échantillon hydrolysé. Barres d'échelle : 50 μm (a et d), 20 μm (b, et e), et 2,5 μm (c et f)

On peut terminer sur le fait que grâce à une étude connexe évoquée préalablement et présentée en Annexe 3, l'hydrolyse enzymatique permet dans les premiers temps de la saccharification, de réaliser un lissage des surfaces présentant des aspérités et donc autant de sites accessibles (avant de laisser place à la création de la rugosité citée avant, lorsque la cellulose laisse place à la matrice ligneuse rémanente). Cet effet a notamment été mis en évidence sur l'échantillon C020C (équivalent de l'échantillon C020V00 considéré ici).

Compte tenu du grandissement utilisé et de la faible quantité d'échantillon analysée, il est plus difficile de s'assurer du caractère significatif des observations faites à partir de ces observations microscopiques. C'est aussi pour cela que la démarche multi-échelle est pertinente, pour confronter ces observations avec des analyses complémentaires.

f. Le suivi de la composition chimique

i La concentration en cellulose, hémicelluloses, et lignine

Pour quantifier l'évolution de la composition chimique du substrat au cours de l'hydrolyse enzymatique, on s'appuie sur le rendement en glucose, mais également sur les analyses infrarouges effectuées pour les différents prélèvements.

L'évolution de la concentration en cellulose du substrat est donc calculée à partir du rendement en glucose déterminé plus haut et de la teneur initiale en cellulose du substrat, selon l'équation :

$$C_{cell}(t) = C_{cell}(0) \cdot (1 - R_{gluc}(t)) \quad \text{Équation (12)}$$

où $C_{cell}(t)$ est la concentration en cellulose du substrat au temps t , $C_{cell}(0)$ la concentration en cellulose du substrat au temps initial, et $R_{gluc}(t)$ le rendement en glucose au temps t . On néglige ici la conversion possible des hémicelluloses en oligosaccharides et monomères de sucres.

La Figure 130 représente l'évolution de la concentration en cellulose du substrat au cours du temps. Cette évolution suit évidemment le profil du rendement en glucose. Cela permet aussi d'illustrer que les teneurs en cellulose des deux échantillons sont de plus en plus proches.

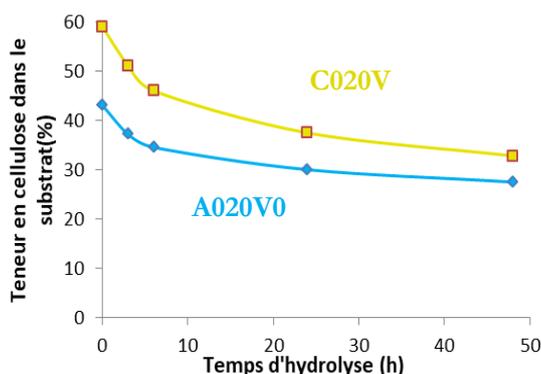


Figure 130 : Evolution de la teneur en cellulose en fonction du temps

Le suivi de la teneur en hémicelluloses, en cellulose et en lignine n'a en revanche pas pu être réalisé à partir des spectres IR et du modèle PLS décrit et utilisé précédemment. Le modèle PLS sous-estime en effet l'avancement de l'hydrolyse enzymatique, au point de prédire une concentration en cellulose quasi constante au cours du temps (Figure 131).

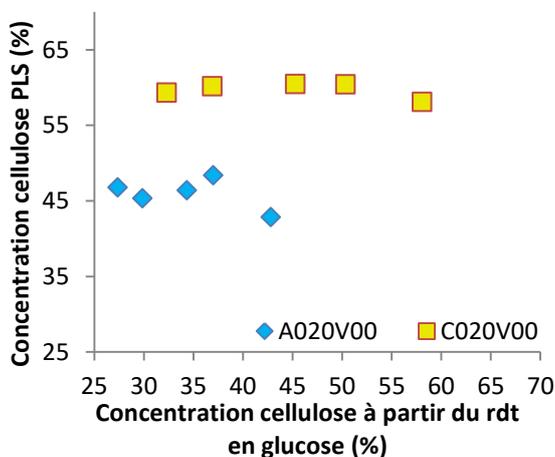


Figure 131 : Graphe de parité montrant l'évolution la teneur en cellulose prédites par PLS en fonction de la teneur en cellulose calculée à partir du rendement en glucose (mesuré par la méthode servant de référence, ici au glucostat)

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

ii L'évolution de la cristallinité de la cellulose

L'indice de cristallinité de la cellulose a été évalué sur les échantillons A020V00 et C020V00, aux temps d'hydrolyse 0 h, 6 h, et 48 h par la mesure de l'indice de cristallinité de la cellulose en RMN du carbone 13. Les valeurs de cristallinité (Figure 132) montrent une stabilité du taux de cristallinité au cours de l'hydrolyse.

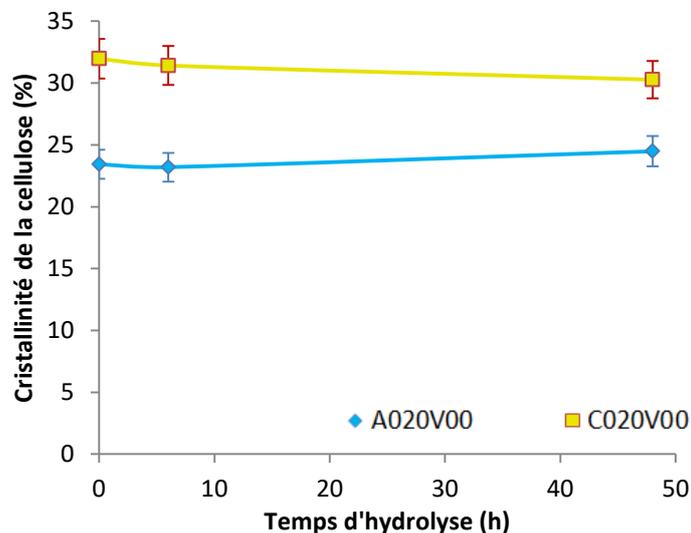


Figure 132 : Evolution au cours de l'hydrolyse enzymatique de l'indice de cristallinité de la cellulose, mesuré par CPMAS ^{13}C -RMN

g. Le suivi de l'état de porosité par physisorption d'azote

Le suivi de l'état de porosité s'est fait par la détermination de la surface BET, du volume poreux, et de la distribution en taille de pores (modèle BJH en désorption) lorsque l'isotherme d'adsorption-désorption était suffisamment exploitable. Dans cette étude, de même que lors des autres études, l'évolution du volume poreux évolue de manière parfaitement linéaire avec la surface BET. Ainsi les observations discutées sur l'évolution de la surface BET pourront être transposées de manière équivalente en termes de volume poreux. Les surfaces BET sont tracées sur la Figure 133 en fonction du temps d'hydrolyse.

Pour ce qui est de l'échantillon A020V00, les surfaces développées sont si faibles que la significativité de la valeur mesurée pose question (généralement on estime que la limite d'estimation de la surface BET se situe vers $1\text{m}^2/\text{g}$, représentée en Figure 133). En première approche on peut dire que la surface accessible, très faible, est constante au cours de l'hydrolyse. En supposant significatives les variations mesurées sur de si faibles surfaces (on notera par exemple que Chai *et al.*, [268] utilisent des valeurs de surface jusqu'à $0,6\text{m}^2/\text{g}$ pour des substrats non traités, et analysés par un équipement similaire), on s'aperçoit que la surface passe par un minimum à 6 h d'hydrolyse, puis remonte à sa valeur initiale à 48h d'hydrolyse enzymatique.

Concernant l'échantillon C020V00 (traité à $140\text{ }^\circ\text{C}$), la surface BET augmente globalement tout au long de l'hydrolyse enzymatique, marquée par une légère pause entre 3 et 24 h d'hydrolyse.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

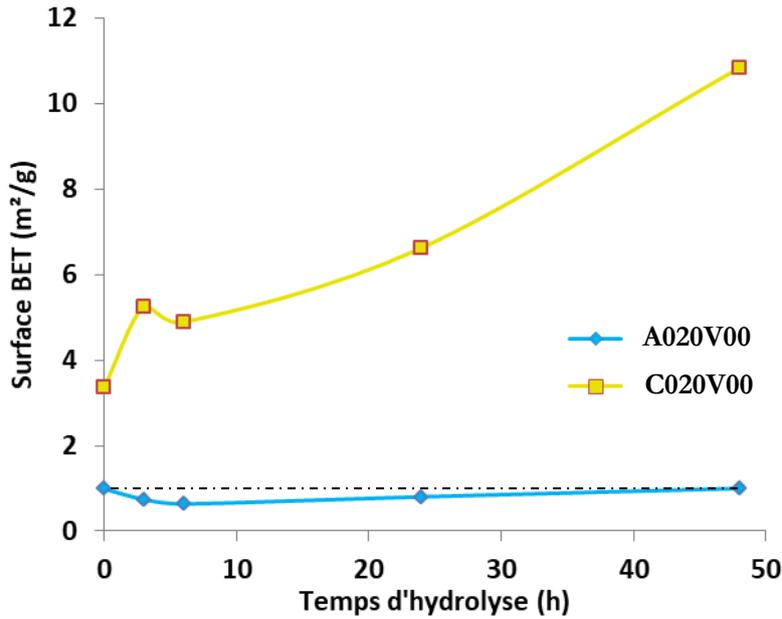


Figure 133 : Evolution de la surface BET au cours de l'hydrolyse enzymatique. Le segment en pointillés montre à titre indicatif la valeur minimale ($1 \text{ m}^2/\text{g}$) en deçà de laquelle, la valeur est considérée incertaine

On s'intéresse maintenant à l'évolution des distributions en taille de pores, par l'intermédiaire des diamètres médian et moyen, ainsi que du diamètre au $\max_{d \in [2;250 \text{ nm}]} \left(\frac{dV}{dP} \right)$ de la distribution poreuse (modèle BJH en désorption). La porosité de l'échantillon A020V00 étant trop faible pour pouvoir obtenir un isotherme de désorption probante, seule les distributions des prélèvements de l'échantillon C020V00 sont ici discutées. La Figure 134 trace à la fois l'évolution de ces trois diamètres caractéristiques en fonction du temps (a) et de la teneur en cellulose (b). La même observation est faite sur ces trois paramètres suivis à savoir qu'au cours de l'hydrolyse enzymatique, la taille des pores augmente très légèrement (de 1,6 à 4,5 nm suivant le paramètre considéré).

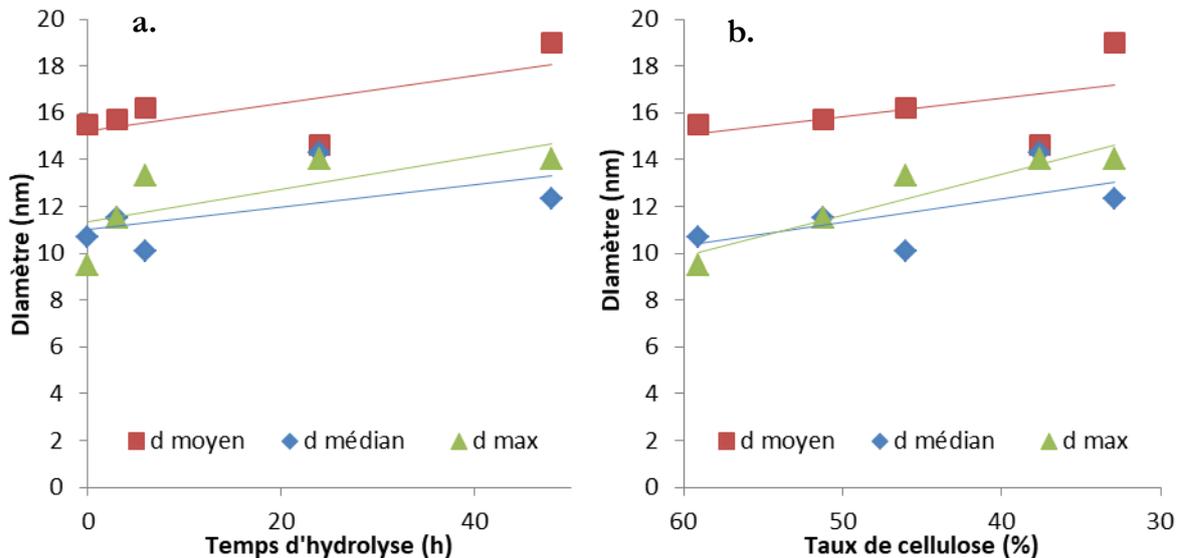


Figure 134 : Evolution de trois diamètres caractéristiques en fonction du temps d'hydrolyse (a) et du taux de cellulose (b) des prélèvements de l'échantillon C020V00

h. Discussions sur le suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

i La taille des particules

La fragmentation dépend majoritairement de la fragilisation de la matrice lignocellulosique par la disparition partielle de la fraction polysaccharidique, à savoir des hémicelluloses par le prétraitement, et de la cellulose lors de l'hydrolyse. Ainsi, l'échantillon C020V00 étant déjà fragilisé structurellement par le prétraitement et le retrait d'une portion significative d'hémicelluloses (Tableau 22), cette fragmentation est d'autant plus aisée en début d'hydrolyse, où le taux de conversion de la cellulose (la pente de la courbe représentative de la conversion de la cellulose) est la plus élevée (les tissus cellulosiques comme les parenchymes peuvent se détacher des autres tissus), et en fin d'hydrolyse, lorsque le substrat présente son taux de cellulose minimal. Cette fragmentation semble toucher principalement l'échelle des tissus qui, suite à leur séparation, libèrent dans le milieu des cellules individuelles (dans la Figure 123 les distributions ainsi que les échelles associées). Durant le plateau observé entre 3 et 24 h, la taille des particules évolue peu montrant une structure assez stable alors que le glucose libéré continue d'augmenter. Cela suggère que les cellules et tissus sont digérés au niveau de la cellulose moyennement accessible, à savoir les parois secondaires. Ce n'est qu'en fin d'hydrolyse ($t > 24$ h), lorsque les parois sont suffisamment digérées et désolidarisées les unes des autres, que la fragmentation se poursuit au niveau des tissus résiduels qui se délitent en cellules individuelles. De manière minoritaire, l'immersion sous agitation de biomasse lignocellulosique prétraitée contribue à accélérer cette fragmentation, contrairement à la paille native, beaucoup plus stable mécaniquement. Une étude présentée en Annexe 4 confirme la stabilité de la paille native à l'inverse des substrats traités (deux pailles sont introduites dans un réacteur enzymatique, l'une non traitée, l'autre prétraitée, mises sous agitation dans le réacteur, en l'absence d'enzymes). On y montre que la paille traitée présente une évolution visible des particules en suspension, contrairement à la paille non traitée.

ii La morphologie et surface des particules

La fragmentation confirmée en MEB de l'échantillon C020V00 et notamment en fin d'hydrolyse est conforme aux interprétations faites ci-dessous. Le lissage observé sur les aspérités initiales des particules montrent que ces aspérités rendent possibles une plus grande adsorption d'enzyme par la surface développée plus importante. Aux forts avancements, une rugosité de surface semble se former, ce qui peut être dû à la matrice poreuse laissée par l'hydrolyse de la cellulose. Pour l'échantillon A020V00, les phénomènes observés sont beaucoup plus ténus, mais vont globalement dans le même sens que ce qui vient d'être dit.

iii La mise en défaut de la régression PLS-FTIR sur les échantillons partiellement hydrolysés

Le fait que la régression PLS ne fonctionne plus lorsque les échantillons sont partiellement hydrolysés peut s'expliquer par le fait que l'épaisseur sondée est de l'ordre de $1 \mu\text{m}$, ce qui n'est pas forcément représentatif de la matrice lignocellulosique totale, notamment lorsque l'hydrolyse enzymatique a lieu. Ainsi, cela suggère que la cellulose digérée au cours de l'hydrolyse n'est pas sondée et est présente à une profondeur de plus de $1-2 \mu\text{m}$. Ceci est cohérent avec la structure de la biomasse : les parois du sclérenchyme par exemple (tissu très abondant dans la paille de blé) possèdent une paroi cellulaire pouvant avoisiner les $5 \mu\text{m}$, et les parois les plus à même d'être vues en infrarouge sont les parois donnant vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, la lamelle moyenne (et la paroi primaire) ainsi que la paroi secondaire S3 (donnant sur le lumen), qui sont reconnues pour être peu digestes par leur teneur en lignine, sont majoritairement analysées. Dans une moindre mesure cela reste valable pour le parenchyme lignifié (également très abondant dans la paille de blé) qui bien qu'ayant des parois plus fines, possède aussi cette structure. A l'inverse, la majeure partie de la cellulose susceptible d'être dégradée est située dans la paroi secondaire S2, c'est-à-dire complètement au cœur de la paroi cellulaire. Et ce phénomène est également valable à l'échelle du brin de paille lorsque la paille est moins fragmentée : lorsque le faisceau IR rencontre un brin de paille, l'épiderme est préférentiellement analysé, bien que minoritairement présent. La concentration "vue" en cellulose sera probablement la même aux différents avancements de l'hydrolyse enzymatique car la fraction cellulosique de ce tissu, est très peu accessible par la présence de cutines et de

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

cellules constituées en grande partie de silice (qui forment des phytolithes). Cette situation est décrite en Figure 135, où l'on schématise de manière simplifiée les tissus et parois cellulaires lors de l'hydrolyse enzymatique, en regard des épaisseurs sondées en spectroscopie infrarouge (entre 0,95 et 2 μm sur la plage de longueurs d'onde utilisée).

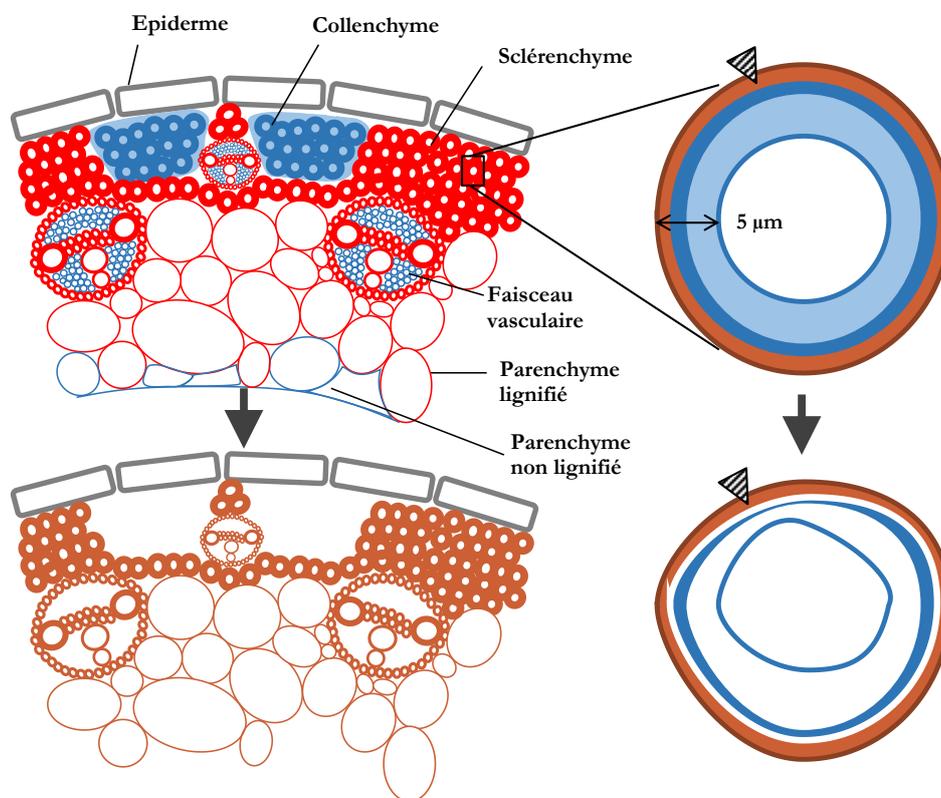


Figure 135 : Représentation schématique de la digestion enzymatique opérant à l'échelle des tissus et des parois cellulaires, en regard de la profondeur sondée par spectroscopie IR (triangle noir rayé). Les tissus et parois cellulaires très majoritairement cellulosiques sont indiqués en bleu, les zones lignocellulosiques sont indiquées en rouge, et les zones majoritairement ligneuses sont indiquées en brun

Ainsi, seule l'analyse de fractions digérées et abondantes, pourraient rendre correctement compte de l'avancement de la saccharification. Cependant, les tissus purement cellulosiques sont relativement peu présents (collenchyme, parenchyme xylémien, phloème et parenchyme non lignifié de moelle), et souvent cachés par d'autres tissus (collenchyme au milieu du sclérenchyme, phloème et parenchyme xylémien encagés dans le faisceau vasculaire). Quant aux parois secondaires S2 des tissus lignifiés, elles sont elles aussi majoritairement invisibles en spectroscopie IR, étant au cœur de parois très épaisses.

Dans le cas d'un broyage extrêmement fin (granulométrie de l'ordre du micron), l'analyse des échantillons hydrolysés auraient probablement donné des résultats cohérents avec les étalonnages effectués sur les échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué également broyés de manière très fine.

Ces observations n'invalident cependant pas vraiment la régression par PLS présentée précédemment, puisque la calibration des différentes teneurs en macromolécules a pu être faite en analysant sur une profondeur de 1 μm , des substrats traités (et non sur la base du matériau complet), mais non hydrolysés. Un broyage fin n'a pas été réalisé sur les différents substrats analysés dans les études précédentes par le fait qu'un broyage fin peut provoquer des modifications physicochimiques non négligeables : dé cristallisation de la cellulose [89,267], échauffements locaux qui peuvent dégrader les polysaccharides les moins stables, modification de la lignine [269,270], et augmentation de la surface accessible [185].

iv L'indice de cristallinité de la cellulose

Dans la littérature, on retrouve également la stabilité de cet indice de cristallinité [158,160], bien que la digestibilité supérieure de la cellulose amorphe soit attestée par certains travaux (pour des substrats cellulosiques [158,161,262]). Elle est également moins stable thermodynamiquement [29], et se présente sous une forme moins compacte avec plus de sites potentiels d'adsorption pour les endoglucanases. La constance de l'indice s'explique simplement par le fait que les zones cristallines et amorphes se succèdent à l'échelle des microfibrilles (de diamètres nanométriques), et sont liées de manière covalente par une liaison β -(1,4) comme dans le reste des chaînes cellulosiques. De ce fait, pour que les endoglucanases puissent accéder à une zone amorphe il est d'abord nécessaire d'hydrolyser les chaînes cellulosiques qui entourent cette zone, que ces chaînes fassent partie d'une zone cristalline ou amorphe. Pour les cellobiohydrolases, l'idée est la même : par leur action processive le long des chaînes cellulosiques sur lesquelles elles sont adsorbées, une cellobiohydrolase adsorbée en extrémité de chaîne clivera les liaisons glycosidiques quel que soit le niveau de cristallinité

v La surface BET

De la même manière que l'hydrolyse des hémicelluloses durant le prétraitement laisse dans la matrice des pores, on peut penser qu'il en va de même pour la cellulose. Ainsi on trace la surface BET des différents prélèvements en fonction du rendement en glucose, caractéristique de la perte de cellulose (Figure 136).

Le lien entre la surface spécifique et la perte de cellulose est clair pour l'échantillon C020V00, malgré la pause observée vers 6 h d'hydrolyse. Dans cet échantillon qui ne présente plus beaucoup de tissus purement cellulosiques (voir l'étude *in situ* qui suit), la cellulose digérée provient principalement des parois secondaires (paroi majoritaire en termes de masse, et riche en cellulose), moyennement digestes car en présence de lignine et d'hémicelluloses (mais prétraitées correctement). Dans cette paroi déjà poreuse par le retrait d'une fraction significative des hémicelluloses lors du prétraitement, le retrait progressif de la cellulose contribue à augmenter la surface. Par ailleurs l'observation en MEB de l'échantillon C020C (échantillon équivalent, à granulométrie initiale de 2 mm) avant et après une hydrolyse, en des zones repérées, indique un lissage des parois cellulaires en début d'hydrolyse (voir étude Annexe 3), ce qui peut contribuer à expliquer la légère baisse de surface observée à 6 h d'hydrolyse, même si le caractère significatif de la mesure pose question pour de si faibles valeurs.

Pour l'échantillon A020V00, et toujours en supposant que l'évolution mesurée de surface est réelle, on peut l'expliquer de la façon suivante : dans un premier temps la surface diminue avec la consommation de la cellulose, ce qui traduit la digestion des quelques tissus cellulosiques (parenchymes non lignifiés, phloème, parenchyme xylémien, et collenchyme), de même que du lissage des surfaces par attaque préférentielle des aspérités. Dans un second temps, cette surface augmente avec la consommation de la cellulose. Cette cellulose est probablement moins accessible et provient des parois lignifiées, dont le retrait d'une fraction cellulosique laisse quelques pores dans la matrice (on se rapproche du cas de figure de l'échantillon C020V00 (traité à 140 °C), mais avec une amplitude bien moindre). Cet échantillon étant quasi non poreux, il est possible que l'état de fragmentation joue également un rôle mineur dans la surface développée du prélèvement en fin d'hydrolyse.

Ces propositions de schémas de dégradation mettent notamment en évidence :

- La digestion rapide des tissus cellulosiques et uniquement de ces tissus, à faible sévérité.
- L'adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules digestes, qui présentent des aspérités et déchirures rendant une plus grande quantité de substrat immédiatement accessible (vu également en MEB à travers le lissage des aspérités de surface) au cours de l'hydrolyse.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

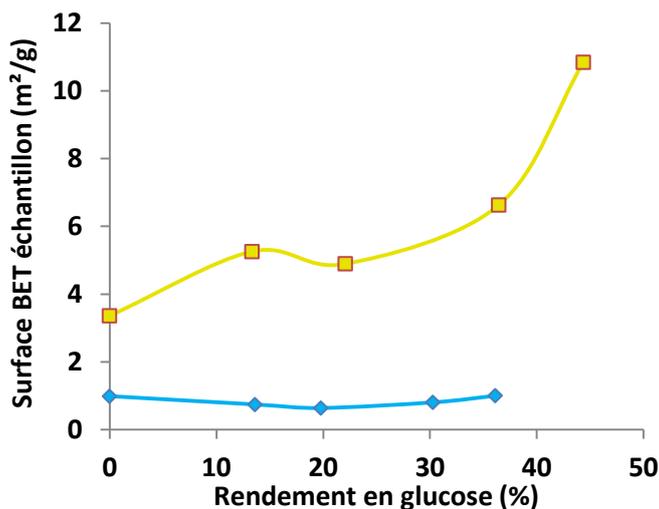


Figure 136 : Evolution de la surface accessible en fonction du rendement en glucose pour les prélèvements des échantillons A020V00 (bleu) et C020V00 (jaune)

vi La taille des pores

L'augmentation de ces diamètres avec l'avancement de la réaction permet de dire que durant l'hydrolyse enzymatique, la dimension des pores présents augmente légèrement, par le retrait de la cellulose qui les entoure, ce qui est conforme à ce qui a été dit jusqu'à présent.

i. Conclusion sur le suivi *ex situ* de la matrice lignocellulosique

L'approche consistant à caractériser différents prélèvements au cours de l'hydrolyse enzymatique des échantillons C020V00 et A020V00, a permis de suivre les modifications physicochimiques en œuvre lors de cette étape du procédé. À l'issue de cette étude, il est possible de décrire le phénomène de dégradation enzymatique sur la base des propriétés étudiées, d'ordre chimique, physique, morphologique et topologique. Ces scénarios dépendent des conditions opératoires de prétraitement à l'acide dilué (très douces et intermédiaires dans notre cas).

i Mécanismes observés

À faible sévérité (échantillon A020V00), la paille prétraitée est assez peu digeste et conserve relativement bien son intégrité. En début d'hydrolyse, seuls les tissus purement cellulosiques et certaines aspérités de surface sont digérées rapidement. En fin d'hydrolyse, une fragmentation significative est tout de même observée avec une séparation des tissus en longues fibres individuelles. Les zones de fragilité sont ici situées entre les cellules. L'échantillon étant globalement non poreux, sa digestion se fait principalement depuis la surface extérieure vers l'intérieur de chaque tissu accessible, cellule, ou encore paroi. De ce fait, sa surface accessible évolue peu (la surface reste globalement lisse, même à échelle fine). L'hydrolyse de la cellulose se fait de manière non spécifique sur les zones cristalline (allomorphes I_α et I_β) ou amorphe, malgré la différence avérée de digestibilité de ces phases. Cela se traduit par un indice de cristallinité constant au cours de l'hydrolyse. Ceci s'explique par le fait que les zones cristallines sont entrecoupées de régions moins denses sur la longueur des microfibrilles. De ce fait l'hydrolyse d'une zone amorphe dépend directement de l'hydrolyse des structures cristallines qui l'entourent. Ceci est d'autant plus vrai pour les cellobiohydrolases qui ont une action processive le long des chaînes cellulosiques sur lesquelles elles sont adsorbées. Ce point est encore valable pour l'échantillon C020V00.

À sévérité intermédiaire de prétraitement, l'altération portée sur la matrice de l'échantillon C020V00 par le prétraitement change légèrement la trame. En début d'hydrolyse, seuls les tissus cellulosiques sont digérés (Figure 137 à 0 et 3 h d'hydrolyse). Par ailleurs, les tissus sont déjà fragilisés par le retrait des

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

hémicelluloses, et leur hydrolyse au niveau de zones de fragilité provoque une première fragmentation en début d'hydrolyse, qui se manifeste par une dislocation partielle des tissus en cellules individuelles et petits groupes de cellules. Pour autant, la structure fibrillaire est maintenue. Entre 3 h et 24 h d'hydrolyse, la matrice est suffisamment stable pour que l'on ne puisse pas observer d'évolutions significatives au niveau de la fragmentation. La paroi secondaire (S2 notamment) étant plus digeste que pour l'échantillon A020V00 par le retrait des hémicelluloses, son hydrolyse est réalisée tout au long de la saccharification. Ceci entraîne progressivement la formation de mésopores à l'intérieur des parois, dont le diamètre augmente légèrement au cours de l'hydrolyse. Ces deux aspects contribuant ainsi à l'augmentation quasi uniforme de la surface accessible et du volume poreux au cours de l'hydrolyse. Comme pour l'échantillon A020V00, la cellulose est indifféremment dégradée au niveau des zones amorphes et cristallines, par l'intrication des domaines cristallins et amorphes.

En termes d'état de surface, les aspérités sont dans un premier temps lissées et cette analyse est confirmée par les observations microscopiques *in situ*, montrant une adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules digestes. Ceci pourrait expliquer la légère diminution de porosité à 6 h d'hydrolyse. En fin d'hydrolyse, le substrat consiste en un complexe lignocellulosique lâche, très poreux (par le retrait significatif et successif des hémicelluloses lors du prétraitement et de la cellulose lors de l'hydrolyse enzymatique). Cela s'exprime au niveau de la surface externe des particules, par une rugosité plus ou moins fine suivant les endroits (aspérités de l'ordre du micromètre à la cinquantaine de nanomètre). Toujours en fin d'hydrolyse, les parois significativement digérées ne permettent plus d'assurer le maintien des cellules entre elles, ce qui provoque une reprise de fragmentation à 48 h d'hydrolyse. Cependant, les fibres individuelles (cellules de sclérenchyme par exemple) semblent garder leur intégrité, aussi ne retrouve-t-on pas de fragmentation ultérieure des cellules en fragments (d'un point de vue abondance volumique tout du moins). La Figure 137 retrace les principales évolutions observées et interprétations, au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

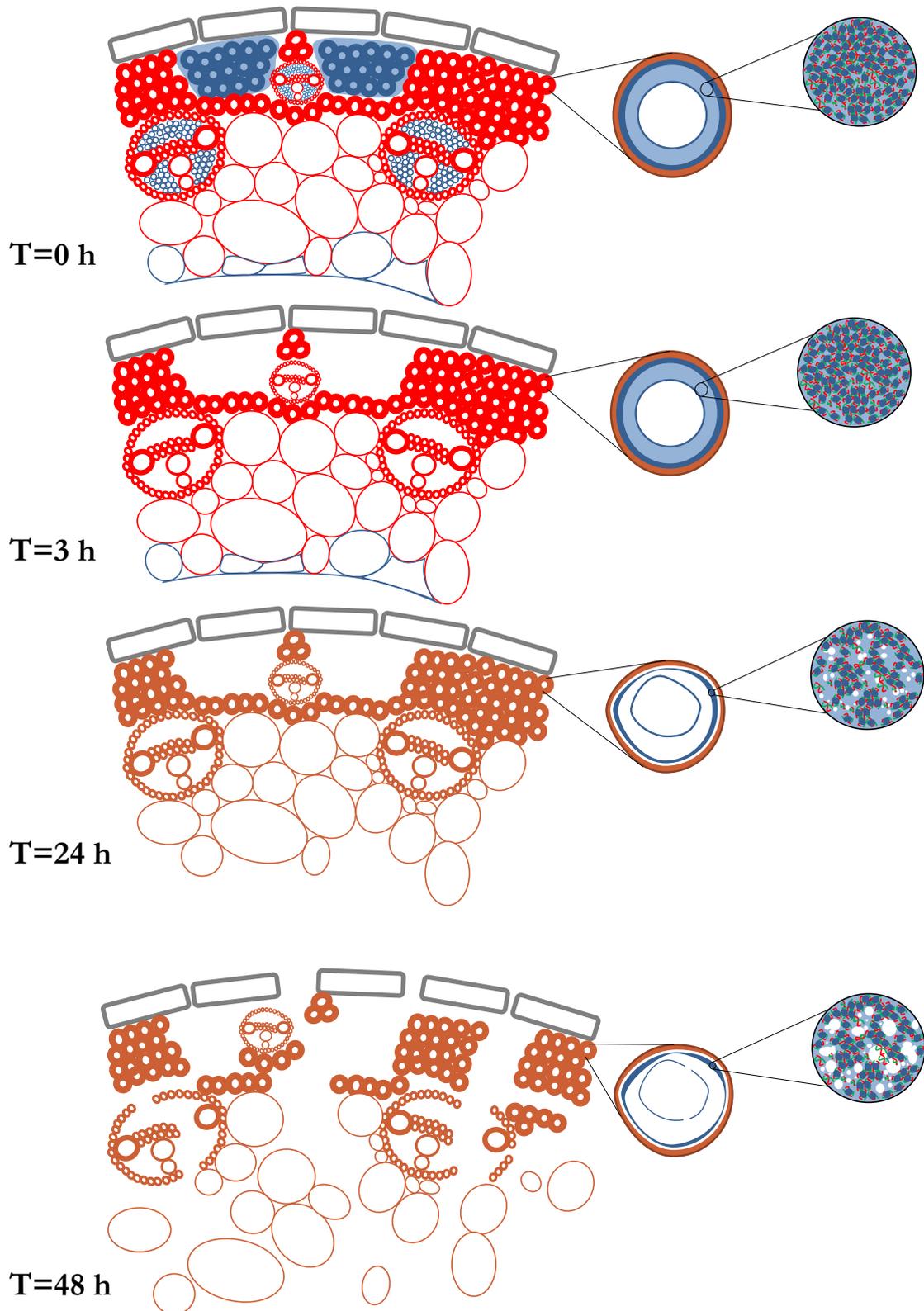


Figure 137 : Représentation schématique des principales modifications observées au cours de l'hydrolyse enzymatique, au travers des différentes caractérisations, et à l'échelle des tissus (gauche), de la cellule (milieu), et de la structure de la paroi secondaire S2 (droite). La cellulose est indiquée en bleu, la lignine ou zones fortement ligneuses en brun, et les hémicelluloses en vert. Les zones lignocellulosiques sont indiquées en rouge

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

ii Influence du prétraitement sur la digestibilité d'un substrat lignocellulosique

Avec l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant, on peut établir qu'un prétraitement plus intense facilite la fragmentation du substrat au cours de l'hydrolyse en le rendant plus sensible à une digestion enzymatique. Il est également possible de corrélérer une amélioration de la digestibilité avec une augmentation de la porosité du substrat qui semble fortement liée à la teneur en cellulose.

iii Questions en suspens

Une analyse exhaustive des principaux paramètres physico-chimiques a permis d'établir une première série de paramètres pouvant influencer l'hydrolyse enzymatique. Mais cette analyse a soulevé plusieurs interrogations :

- Comment se fait l'adsorption des enzymes sur le matériel lignocellulosique en termes d'amplitude du phénomène, profil temporel, et localisation spatiale, dépendamment de la morphologie/taille de particule, type de substrat ?
- Y a-t-il une adsorption non productive significative des enzymes sur les surfaces ligneuses ?
- Les différences de digestibilités entre les tissus prétraités sont-elles du même acabit que celles décrites dans la littérature sur des biomasses natives et mises en évidence notamment par des approches *in situ* en microscopie ou microspectroscopie ?
- Comment les comportements d'adsorption et de dégradation évoluent lorsque les conditions opératoires de prétraitement sont modifiées ?

Pour y répondre, des expérimentations *in situ* en microscopie d'imagerie multispectrale ont été menées. Le but est de visualiser durant l'hydrolyse enzymatique à la fois la dégradation des parois cellulaires, et l'adsorption des enzymes sur les particules. Ce n'est pas tant l'aspect multispectral qui a été utilisé, aucune analyse multivariée n'ayant été réalisée, que l'utilité de chaque canal pour visualiser spécifiquement les parois du substrat et les enzymes.

2. Les analyses *in situ* en fluorescence dans l'UV profond au synchrotron SOLEIL

Les expérimentations réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL avaient pour but d'en apprendre davantage sur la saccharification de matériel lignocellulosique à l'échelle microscopique. Cette approche permet en effet de suivre l'adsorption des enzymes productive/non productive, la digestibilité des tissus de biomasse prétraitée dépendamment des conditions opératoires du prétraitement, ou encore la dégradation des particules (fragmentation, désagrégation etc...). Cette analyse permet aussi de compléter les observations et constats faits sur les analyses *ex situ* de prélèvements de substrats à différents temps d'hydrolyse, pour confirmer ou infirmer certains descripteurs pressentis de l'hydrolyse enzymatique.

Pour ce faire, la démarche consiste à étudier pour un ensemble de tissus caractéristiques, l'évolution au cours du temps de la fluorescence des enzymes, des parois (lorsque présente) ainsi que l'intensité visible en transmission, d'un ensemble de tissus caractéristiques. L'objectif est de comparer la dégradation des différents tissus et l'effet du prétraitement sur la dégradation enzymatique.

a. Les matériaux de l'étude

Le choix des échantillons s'est fait sur la volonté d'avoir une plage de réactivité en hydrolyse enzymatique étendue, et des conditions opératoires de prétraitement variées et comparables, avec la contrainte de ne sélectionner que trois à quatre échantillons, du fait de la lourdeur des expérimentations synchrotron et du temps de faisceau accordé limité. Pour ce qui est de la campagne des prétraitements à l'acide dilué, les échantillons choisis sont les échantillons A020C, C020C, et D020C, produits par un prétraitement pendant 20 minutes, et respectivement à 100 °C, 140 °C, et 160 °C (voir en Figure 138 leur positionnement quant à leur sévérité de prétraitement associée, ainsi que leur rendement de conversion de la cellulose en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique).

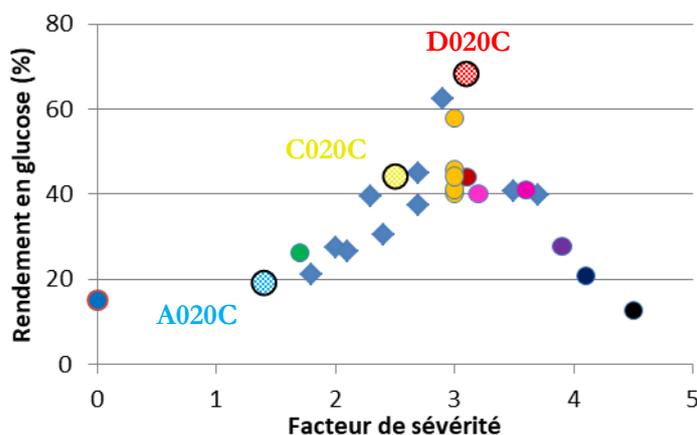


Figure 138 : Rendement en glucose des échantillons traités à l'acide dilué en fonction du facteur de sévérité du prétraitement à l'acide dilué. Les échantillons colorés constituent la sélection utilisée pour cette thèse, et les échantillons texturés sont les échantillons sélectionnés pour cette étude plus particulièrement

Le Tableau 24 résume les caractéristiques compositionnelles et de rendement en glucose en hydrolyse enzymatique des trois échantillons sélectionnés.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 24 : Composition et rendement en glucose des échantillons sélectionnés pour l'étude *in situ*

Spécimen	Traitement	Cellulose (%pds)	Hémicelluloses (%pds)	Fraction non polysaccharidique (%pds)	Rendement glucose (%)
A020C	100°C/20min	44	26	30	26,3
C020C	140°C/20min	58	8	34,5	44,0
D020C	160°C/20min	58,8	1,1	40,1	68,2

b. Les études préliminaires

i La détermination de la préparation d'échantillon adaptée

La recherche d'une préparation d'échantillon qui soit à la fois de qualité en termes d'observation, facile à mettre en œuvre, et visiblement représentative des particules constituantes de l'échantillon, a été une tâche assez délicate. Différentes préparations ont été testées (enrobages en résine, avec agar-agar, cryo-microtomie, sans résine), et observées grâce à plusieurs outils (macroscope en autofluorescence, prototype BlueBox de macrovision, microscopie optique). La préparation retenue notamment pour des raisons de qualité de coupe et de simplicité de réalisation est la réalisation de cryo-coupe d'épaisseur 20 μm (ou coupes cryo-microtomes), dont le protocole de réalisation est décrit dans la partie Méthodes expérimentales du manuscrit.

ii La recherche de la concentration idoine en enzymes (DISCO)

Les premières expérimentations DISCO réalisées avec les concentrations maximales en enzymes (pour le cocktail GC220, 4,9 mg de protéine par mL de mélange réactionnel, et pour le cocktail N188, 13,9 mg de protéines par mL de mélange) visaient à observer la dégradation enzymatique et à visualiser l'adsorption des enzymes. Néanmoins elles se soldèrent par un échec. En effet, aucune adsorption des enzymes sur un quelconque tissu n'a été observée, de même que nous n'avons observé aucune dégradation de la matrice au cours du temps. Toutefois en diluant le cocktail (100, 50 et 25 fois), nous avons pu observer à la fois la dégradation de certains tissus, et l'adsorption des enzymes sur les tissus présentant une affinité, ce qui amène à penser que dans cet environnement confiné, il peut exister une désactivation des enzymes par les enzymes, que ce soit par blocage entre elles (encombrement stérique ou blocage physique au niveau de la surface de l'échantillon en milieu confiné) ou interactions entre les enzymes à forte concentration. Il est rapporté dans la littérature la possibilité d'une inhibition rétroactive de la saccharification causée par la dose d'enzyme [271].

La concentration retenue et utilisée pour toutes les expérimentations DISCO est de 0,2 mg de protéine de cocktail GC220 par mL de mélange réactionnel contre 0,5(5) mg de protéine par mL de mélange réactionnel pour le cocktail N188, ce qui est 3,2 fois plus concentré que dans une hydrolyse standard. Par contre, la dose d'enzymes rapportées à la quantité de substrat introduite est estimée (cette estimation est en revanche très imprécise) à 0,1 mg de protéines par mg de substrat pour le cocktail GC220 (contre 3.10^{-3} mg de protéine par mg de substrat en hydrolyse standard), et de 0,28 mg de protéine par mg de substrat pour le cocktail N188 (contre 9.10^{-3} mg de protéine par mg de substrat), ce qui est grossièrement 32 fois plus grand que pour une hydrolyse standard. Par conséquent, la question de la représentativité des expérimentations vis-à-vis d'une hydrolyse standard ou industrielle sera à discuter.

c. Rappel du protocole d'expérimentation

Pour rappel, et comme décrit dans la partie Méthodes expérimentales du manuscrit, les expérimentations se sont déroulées comme suit. La solution d'enzymes est déposée sur la cryo-coupe à l'instant t_0 puis la préparation est placée sur la platine chauffante dans le microscope. Une mosaïque de 6×6 images individuelles est réalisée afin de couvrir un large champ de vue. Trois signaux sont enregistrés pour chaque zone de la mosaïque imagée : la fluorescence d'enzyme entre 327-353 nm pendant 15 s, la fluorescence des parois pendant 2 s entre 420-480 nm et l'intensité transmise dans le visible pendant 100 ms (image en fond

clair). Au total, les cinétiques de dégradation enzymatique ont été observées pendant 2h35. Il est à noter qu'une durée incompressible d'environ 10 min est nécessaire pour réaliser les réglages du microscope, une fois que l'échantillon est placé sous l'objectif. Ainsi, la dégradation entre t_0 et t_1 (lancement de l'acquisition), ne peut être observée.

d. Observations en début d'hydrolyse

Des exemples d'images individuelles obtenues sur les 3 échantillons A020C, C020C et D020C sont présentés ci-dessous sur la Figure 139. Les particules observées sont très hétérogènes dans chacun des 3 canaux :

- Dans le canal de la fluorescence des enzymes (canal 1, à 327 nm), on distingue le fond correspondant à la solution et contenant les enzymes, des particules dont les parois sont blanches due à une concentration d'enzymes ce qui traduit l'affinité qu'elles ont avec les enzymes qui sont y sont adsorbées, des particules avec les parois non fluorescentes qui au contraire ne semblent pas attirer les enzymes.
- Dans le canal de la fluorescence des parois (canal 2, à 420 nm), certaines particules présentent une fluorescence de leur paroi alors que pour d'autres cette fluorescence est absente (seul l'échantillon A020C est concerné car pour les deux autres échantillons, le prétraitement a conduit à supprimer l'auto fluorescence des parois).
- Sur l'image en fond clair (canal 3, image en transmission dans le visible), les tissus présentent une forte disparité au niveau de leurs dimensions et de leur opacité.

Pour pouvoir avancer dans l'analyse du matériau lignocellulosique au cours de l'hydrolyse enzymatique, il devient alors nécessaire de définir un certain nombre d'objets à analyser. Ces objets sont soit des tissus, soit des particules lorsque la zone est suffisamment déstructurée pour que l'on ne distingue plus de structure cellulaire claire. Ces tissus ou particules déstructurées, seront désignées sur la base de caractéristiques morphologiques et de fluorescence.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

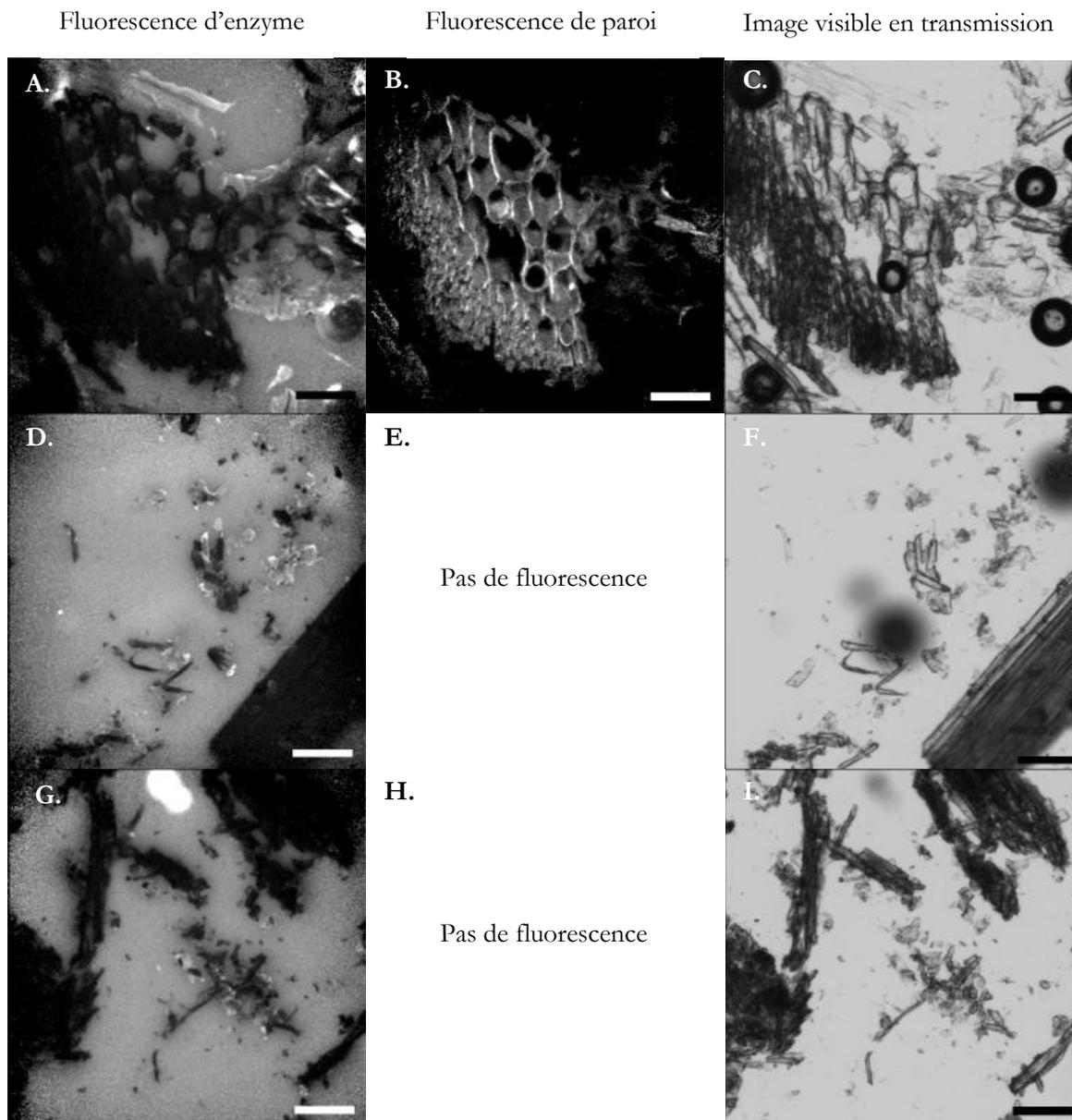


Figure 139 : Exemples d'images individuelles obtenues, pour des préparations microscopiques des échantillons A020C, C020C, et D020C, au commencement de l'hydrolyse enzymatique, et dans les trois canaux d'observation. Plage d'intensité des niveaux de gris utilisée pour visualiser les images : en fluorescence d'enzyme, de 0 (noir) à 600 (blanc) ; en fluorescence de paroi, de 0 (noir) à 170 (blanc) ; et de 0 à (noir) 65535 (blanc) pour l'imagerie visible en transmission. Barre d'échelle : 100 μm

e. Les tissus et particules observés

Au cours des observations microscopiques, plusieurs objets peuvent être identifiés, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement qu'a subies l'échantillon.

i Rappel des tissus présents dans une paille de blé

Classiquement, dans une coupe transversale de tige ou de feuille, différents tissus sont recensés : parenchymes non lignifiés (mésophylle pour la feuille et moelle pour l'intérieur de la tige), parenchyme lignifié, phloème, parenchyme xylémien, collenchyme, et épiderme.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

L'identification est possible par la localisation des tissus, la morphologie et l'agencement des cellules, et leur caractère plutôt cellulosique ou plutôt ligneux (révélé ici par la coloration, Figure 140).

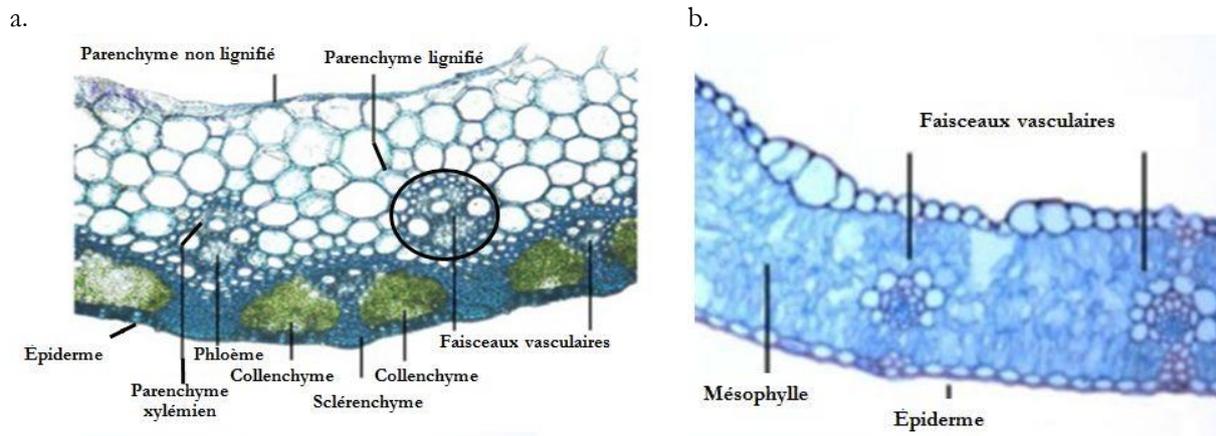


Figure 140 : Coupe transversale d'une paille de blé colorée et observée au microscope optique. Adapté de [24]

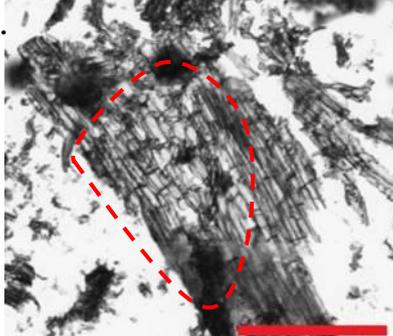
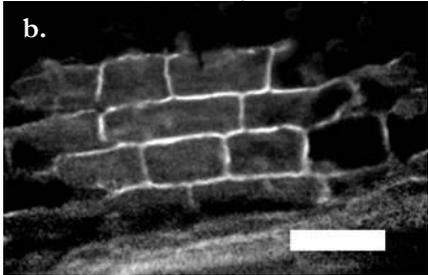
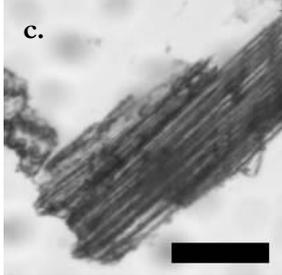
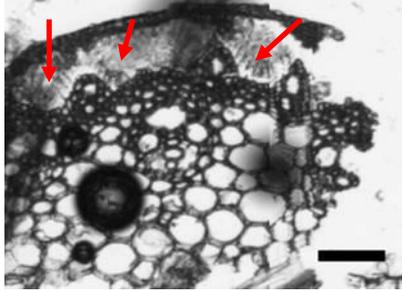
ii Les tissus observés dans les échantillons prétraités pulvérulents

Sur les échantillons de l'étude, la reconnaissance des tissus est moins immédiate, par la forme pulvérulente de l'échantillon, et l'altération physicochimique provoquée par le prétraitement. Bien souvent, l'identification n'est pas possible auquel cas les particules ne seront pas étudiées ou bien étudiées sous l'appellation "non identifiées".

Il reste possible d'identifier les tissus des particules dans un certain nombre de cas cependant. On se base pour cela sur les caractéristiques reconnues des différents tissus, qu'elles soient d'ordre morphologique ou de fluorescence des parois émise à 420 nm. Les propriétés des tissus permettant l'identification sont résumées dans le Tableau 25, et sont faites sur la base d'observations en microscopies optiques et MEB, issues de nos propres expérimentations et de la littérature. Des exemples sont présentés dans le Tableau 25.

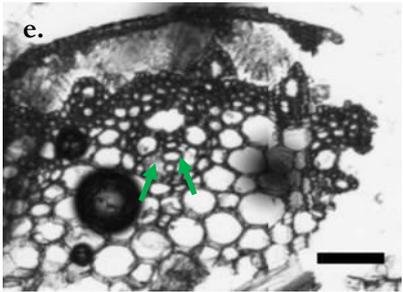
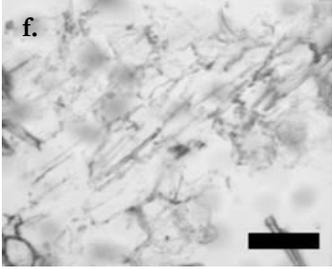
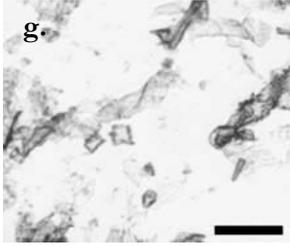
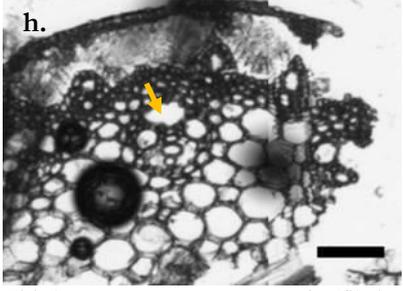
Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 25 : Caractéristiques des tissus

	Caractéristiques des tissus par type d'imagerie	Images
<p>Parenchyme lignifié</p> <p>Tissu abondant</p>	<p>Grandes cellules fines peu allongées, et ponctuées, opaques, situées entre l'enveloppe de sclérenchyme et la moelle de parenchyme non lignifié.</p> <p>En coupe longitudinale, elles sont rectangulaires et agencées comme des briques de maison.</p> <p>Fluorescence significative des parois à 420-480 nm à faible sévérité de prétraitement.</p>	<p>a.</p>  <p>Paille C020C, parenchyme lignifié en coupe longitudinale (zone délimitée par le contour fermé en tirets rouges), observé en mode fond clair (barre d'échelle 500 µm)</p> <p>b.</p>  <p>Parenchyme lignifié en coupe longitudinale (échantillon A020C) observé en autofluorescence des parois (barre d'échelle 100 µm)</p>
<p>Sclérenchyme</p> <p>Tissu abondant</p>	<p>Longues cellules de petit diamètre, aux parois épaisses, opaques. Ce tissu forme une couronne entourant la tige, et est situé sous l'épiderme. Il est aussi présent au niveau des faisceaux vasculaires.</p> <p>Fluorescence significative des parois à 420-480 nm à faible sévérité de prétraitement.</p>	<p>c.</p>  <p>Sclérenchyme en coupe longitudinale (échantillon A020C) observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 µm)</p>
<p>Collenchyme</p>	<p>Petites cellules épaisses, semi-transparentes, formant un tissu localisé, et situé dans la tige entre le sclérenchyme et le parenchyme lignifié.</p> <p>Peu de fluorescence au niveau des parois</p>	<p>d.</p>  <p>Collenchyme (flèches rouges, échantillon A020C) en coupe transversale, observation en transmission (barre d'échelle 100 µm)</p>

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 25 (continuation)

Parenchymes non lignifiés	Xylémien Tissu minoritaire	<p>Petites cellules fines transparentes du faisceau vasculaire (forme caractéristique, voir Figure 140a). Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Parenchyme xylémien (flèches vertes), échantillon A020C en coupe transversale, observation en transmission (barre d'échelle 100 μm)</p>
	Moelle Tissu minoritaire	<p>Grandes cellules fines et peu allongées, transparentes, et bordant le lumen. Ce tissu tend à disparaître aux niveaux des zones mûres de la tige (entrenœuds en bas de tige). En coupe longitudinale, elles sont rectangulaires et agencées comme des briques de maison. Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Parenchyme non lignifié de moelle. Echantillon A020C observé en coupe longitudinale et en mode fond clair (barre d'échelle 100 μm)</p>
	Mésophylle Tissu minoritaire	<p>Masses difformes fines et transparentes, situées au cœur de la feuille. Pas de fluorescence au niveau des parois. Le manque de structure rend son identification incertaine.</p>	 <p>Possibles fragments de mésophylles, échantillon A020C, observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 μm)</p>
Phloème Tissu minoritaire	<p>Petites cellules fines et transparentes. Pas de fluorescence au niveau des parois</p>	 <p>Phloème en coupe transversale (flèche orange, échantillon A020C), observé en mode fond clair</p>	

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 25 : continuation et fin

<p>Epidermes</p> <p>Tissu minoritaire</p>	<p>Petites cellules rectangulaires en coupe transversale, et opaques. Motifs spécifiques en surface : phytolithes et stomates, qui varient dépendamment de l'origine (tige, intérieur ou extérieur de feuille). Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Echantillon A020C, fragment d'épiderme de tige présentant des phytolithes, en coupe longitudinale (zone siliceuse) et observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 µm)</p>
--	---	---

iii Identification des tissus et particules en fonction du prétraitement subi par l'échantillon

L'identification des tissus est facilitée pour l'échantillon A020C car la température modérée de prétraitement ne déstructure que peu le substrat. De plus, la température de prétraitement n'est pas suffisante pour faire disparaître la fluorescence des parois, ce qui donne un indice de plus pour une identification. Sur les coupes des échantillons C020C (prétraitement à 140 °C) et D020C (160 °C), on ne peut plus identifier certains tissus, soit du fait de leur disparition, soit du fait du manque d'indices nécessaires à leur identification. Il s'agit des tissus celluloseux principalement, plus fragiles : parenchymes non lignifiés (xylémien, de moelle, ou mésophylle de feuille), phloème, et collenchyme.

Pour finir, à sévérité intermédiaire (C020C) et forte (D020C) de prétraitement, certaines particules ne possèdent plus de structures cellulaires identifiables. Elles font également partie du recensement des objets à analyser pour ne pas se priver de cette fraction du matériel lignocellulosique, qui peut être présent en grande quantité dans ces cas-là. L'analyse par microscopie confocale à balayage laser a permis de montrer que ces amas sont constitués de zones avec une surface cellulosique et d'autres avec une surface ligneuse (Figure 141b, voir à ce sujet le chapitre traitant de l'effet du traitement à l'acide dilué sur la matrice lignocellulosique). On montre en Figure 141 des clichés de l'échantillon D020C sur une zone complètement déstructurée, par différents outils d'observation : microscopie à fluorescence UV d'enzymes (a), microscopie confocale à balayage laser (b), fluorescence UV-VIS (c) et imagerie visible de type fond clair (en transmission).

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

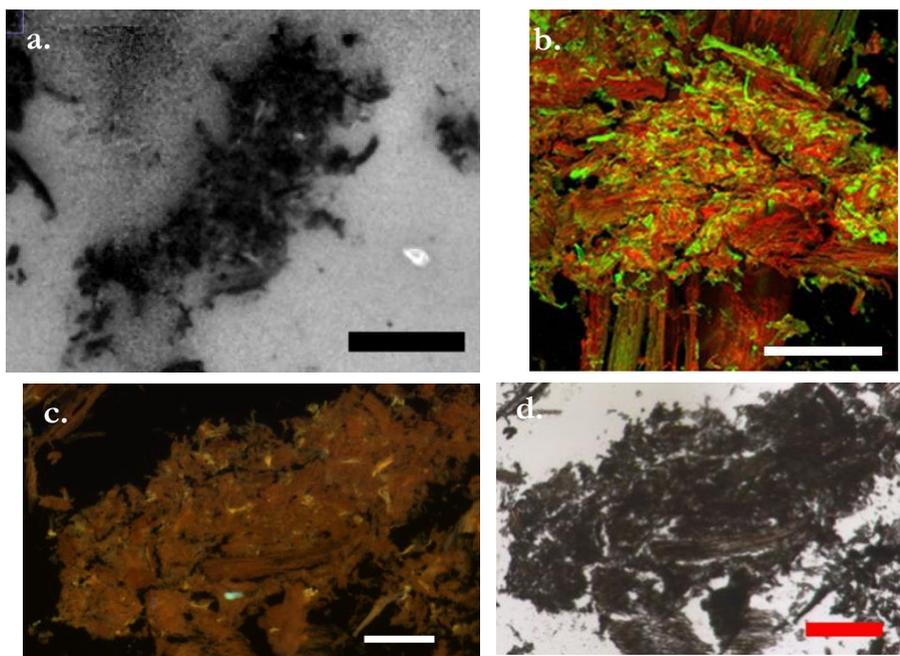


Figure 141 : Observations microscopiques de zones sans structure cellulaire distinguée et présente dans l'échantillon D020C (prétraitement à 160 °C). a : observation en microscopie UV, autofluorescence d'enzymes ; b : observation en microscopie confocale après marquage à la safranine, la cellulose apparaît ici en vert, et la lignine en rouge c : observation en autofluorescence (compilation des canaux obtenus pour les excitations UV-B et bleue) sur le macroscopie à fluorescence ; d : observation de la même zone qu'en (c), en imagerie de type fond clair. Barres d'échelle : 100 μm (a), 200 μm (b), et 300 μm (c et d)

iv Identification des tissus et particules en fonction du prétraitement subi par la paille

En conclusion, on définit dépendamment des conditions opératoires de prétraitement, les objets définis dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Objets considérés pour étudier la dégradation de la matrice lignocellulosique en hydrolyse enzymatique

	A020C	C020C	D020C
Parenchymes non lignifiés (feuille/tige)	✓	✓	✓
Parenchymes lignifiés (tige)	✓	✓	✓
Sclérenchymes (tige)	✓	✓	✓
Epidermes (feuilles/tige)	✓	✓	✓
Phloème (tige)	✓	∅	∅
Parenchyme xylémien	✓	∅	∅
Collenchyme (tige)	✓	∅	∅
Zones déstructurées/non identifiées	∅	✓	✓

Un objectif de 5 mesures de profils par objet ou sous-objet est visé, afin d'avoir une certaine confiance quant à la représentativité de la mesure. Suivant le contexte, des subdivisions de ces tissus et particules feront l'objet d'intérêt particulier, notamment lorsque l'objet considéré est hétérogène. De plus, dans certains cas, il sera possible d'étudier les objets selon le type de coupe : pour le parenchyme lignifié et le sclérenchyme, les coupes transversales seront distinguées des coupes longitudinales, et feront l'objet de mesures distinctes.

f. Exemple d'un suivi de dégradation enzymatique

i Description qualitative

Les mosaïques obtenues dans le canal de la fluorescence des enzymes au cours de l'hydrolyse enzymatique d'une coupe de l'échantillon A020C au premier temps (a), à 70 min (b), et à la fin de l'expérimentation (2h35, c) sont présentées sur la Figure 142. Sur cette mosaïque, on voit que quelques particules s'illuminent puis s'éteignent, signifiant que des enzymes s'adsorbent en leur surface, puis s'en désorbent (quelques exemples dans les zones délimitées en orange). A l'inverse, d'autres particules semblent ne pas présenter d'affinité particulière avec les enzymes. Globalement, la quantité de matière qui est visuellement digérée à cette échelle reste faible. Cette observation est également faite pour les deux échantillons prétraités à plus haute température (140 °C et 160 °C).

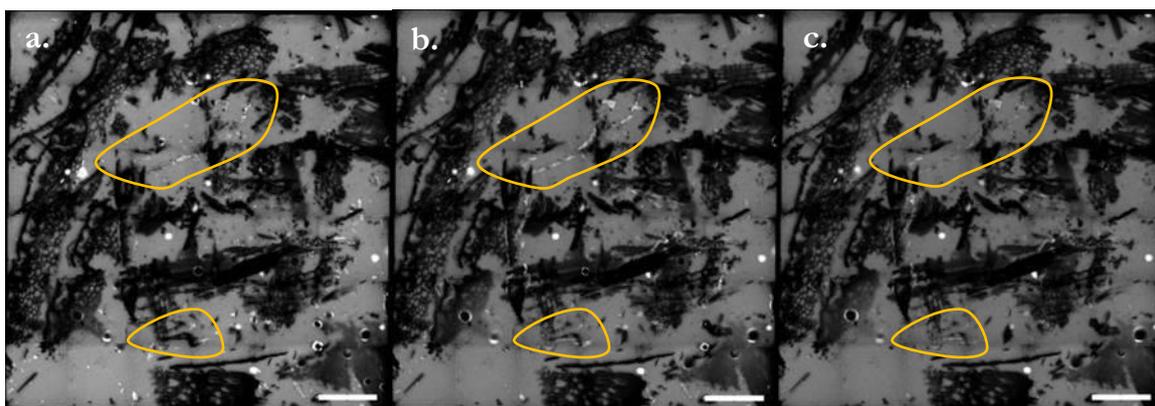


Figure 142 : Exemple d'image mosaïque en fluorescence d'enzyme de l'échantillon A020C, à $t=10$ min (a), $t=70$ min (b), et $t=2h35$ (c). Barre d'échelle : $500 \mu m$

ii Conversion de la cellulose attendue

Afin de tenter d'expliquer pourquoi la conversion visuellement observée de la matrice lignocellulosique est si faible, on cherche à estimer la conversion de la cellulose que l'on obtient après 2h15 d'hydrolyse enzymatique dans les conditions de ces expérimentations synchrotron.

On se place dans des conditions opératoires d'hydrolyse enzymatique différentes de celles avec lesquelles ont été réalisées les hydrolyses standards servant de référence. On essaye ici d'estimer très grossièrement la cinétique attendue pour les échantillons A020C et C020C, notamment compte tenu de l'augmentation de la dose d'enzyme.

Pour mener à bien cette estimation, on part du constat selon lequel lorsqu'on multiplie la dose d'enzyme introduite par un facteur k fixé, on augmente le rendement à un temps donné t_i , d'une quantité x qui dépend du temps choisi et du substrat considéré. Ceci est valable tant que l'on est suffisamment loin du rendement maximal théorique de 100 % de conversion de cellulose [76,134]. Mathématiquement cela se traduit donc localement par :

$$R(k \cdot [enz], t_i) = R([enz], t_i) + k \cdot x(t_i) + o([enz], t_i) \quad \text{Équation (13)}$$

Où $[enz]$ est la concentration en enzymes initialement choisie, R est la fonction rendement en glucose qui dépend de la dose d'enzyme et du temps d'hydrolyse, et $o([enz], t_i)$ une fonction négligeable par rapport aux autres termes, au voisinage de la concentration en enzymes choisie.

Dans notre cas, deux types d'échantillon (A020C et C020C) parmi les 3 de cette étude, ont été hydrolysés à la fois avec une dose simple et une dose double d'enzyme (comparativement à une hydrolyse standard), avant les expérimentations synchrotron. Le doublement de la dose d'enzymes fait augmenter les rendements de conversion des deux échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué, ce qui permet

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

de déterminer la valeur fixe d'augmentation de rendement à chaque fois que l'on double la dose. Les rendements en glucose à 1,5 et 3 heures obtenus à dose standard et doublement de la dose sont présentés dans le Tableau 27. La dose d'enzymes rapportée à la quantité de substrat pour les expérimentations synchrotron étant 32 fois supérieure à celle utilisée en hydrolyse standard, on multiplie par 5 ($32 = 2^5$) les gains de rendement obtenus pour prédire grossièrement les rendements en glucose recherchés (en ajoutant au gain de rendement, le rendement à dose simple d'enzymes). En faisant la moyenne entre les rendements prédits à 1,5 et 3 h de saccharification, on estime le rendement obtenu à 2h15, ce qui correspond, à 20 min près, à la durée d'observation de l'hydrolyse enzymatique. Le rendement à la fin des séries d'acquisition est estimé à 46 % pour l'échantillon A020C, et à 62 % pour l'échantillon C020C.

Vu l'imprécision de la détermination de la quantité d'enzymes rapportée à la quantité de substrat, il convient de considérer ces déterminations avec une certaine réserve.

Tableau 27 : Rendements de conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique, à 1,5 et 3 h de saccharification, et

	Rendement à 1,5 h, à dose simple (%)	Rendement à 1,5 h, à dose double (%)	Gain de rendement à 1,5 h
A020C et A020V00	4	11,2	7,2
C020C et C020V00	9,6	19,4	9,8
	Rendement à 3 h, à dose simple (%)	Rendement à 3 h, à dose double (%)	Gain de rendement à 3 h
A020C et A020V00	6,1	15,5	9,4
C020C et C020V00	13,7	24,1	10,4
A dose 32x supérieure	Rendement prédit à 1,5 h	Rendement prédit à 3 h	Rendement prédit à 2h15
A020C	40 %	53	46 %
C020C	59 %	66	62 %

De plus, l'absence d'agitation est largement susceptible de ralentir la conversion de la cellulose par les enzymes, notamment par l'accumulation locale de glucose au niveau des surfaces, ce qui diminue l'efficacité des enzymes. Pour illustrer ceci, les rendements de 2 hydrolyses enzymatiques identiques en termes de conditions opératoires et de substrat (échantillon C020V22, produit à 140 °C pendant 20 min, avec une détente explosive de 22 bar) ont été mesurés, à l'exception du fait que l'une des deux a été réalisée en l'absence d'agitation magnétique. Les rendements obtenus à 72 h d'hydrolyse enzymatique sont de 49 % pour l'échantillon agité, alors qu'il est de 39,5 % pour l'échantillon non agité, ce qui représente une perte relative de rendement de presque 20 % de rendement. Si on essaie de prendre en compte cette minoration, les rendements passeraient à 37 et 50 %, respectivement pour les échantillons A020C et D020C.

Compte tenu du fait que la teneur en cellulose est de 44 % pds pour l'échantillon A020C et de 58 % pds pour l'échantillon C020C, la perte de matériel lignocellulosique à la fin de l'observation microscopique serait de 16,3 % pds et 29 % pds pour ces deux échantillons, ce qui est finalement relativement faible.

Par ailleurs d'autres paramètres s'ajoutent à cela pour expliquer la faible dégradation des particules :

- la manifestation de l'hydrolyse, se fait beaucoup par la fragmentation des particules et des tissus (montrée dans la première partie de ce chapitre) plus que par leur disparition (sauf cas des tissus cellulosiques). Ici le milieu étant confiné, la fragmentation n'est pas observable ;
- la digestion des particules, tissus et cellules, se fait dans le sens de l'épaisseur des parois (amincissement des parois), et non par raccourcissement des particules dans le sens de la longueur. C'est pour cela que les coupes transversales, minoritaires avec notre protocole de préparation de coupes microscopiques, montrent des évolutions beaucoup plus nettes ;

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- l'imprégnation est possiblement facilitée dans le cas d'une coupe transversale, car chaque cellule est ouverte et en proie à une capillarité efficace ;
- seule la lignine est vraiment opaque, ce qui fait que la dégradation pourra être d'autant moins visible au niveau des zones lignifiées. Et ceci est totalement cohérent avec la dégradation tenue effectivement observée à travers les différentes cinétiques observées chez les différents échantillons.

iii Conclusion

La faible dégradation visuelle semble dans une certaine mesure cohérente compte tenu des considérations évoquées. L'intérêt sera maintenant d'analyser minutieusement les tissus et particules pour mieux se rendre compte des phénomènes d'adsorption et de désorption, mais aussi de la dégradation des tissus à une échelle d'observation plus adaptée. Pour cela, on a mis en place une méthodologie de traitement par profils qui est expliquée ci-dessous.

g. La méthodologie d'analyse des échantillons

i Mesures d'intensités

Pour chaque échantillon, des profils de dégradation des différents objets observés (tissu ou particule) sont extraits des images. Le but final est de mieux comprendre les modes de dégradations de la matrice lignocellulosique à cette échelle d'observation, dépendamment de chaque objet et de la température de prétraitement (le temps de séjour, lui, est de 20 min dans les 3 cas). Cela consiste à sélectionner et délimiter l'objet souhaité puis de mesurer pour chaque temps d'hydrolyse l'intensité de fluorescence des enzymes dans le canal 1 (entre 327-353 nm) nommée I_{FE} , l'intensité de fluorescence des parois dans le canal 2 (entre 420-480 nm) nommée I_{FP} , et l'intensité transmise dans le canal 3 (imagerie de type fond clair en transmission) nommée I_T . Les intensités mesurées sont en réalité des intensités corrigées (voir la méthodologie de correction des images dans la partie Méthodes expérimentales) et les unités correspondantes sont notées UAIE, UAIP et UAIT.

Dans la mesure du possible, on souhaite réaliser *a minima* 5 mesures de profils (plus, en cas de fortes hétérogénéités) pour chaque type d'objet observé. Dans le cas de tissus peu présents, sur les coupes, ou présentant des artefacts instrumentaux, ce nombre sera parfois réduit. Le Tableau 28 indique pour chaque échantillon, les objets observés, et le nombre de mesures de profils effectuées.

Tableau 28 : Recensement des profils temporels acquis à partir des séries d'images mosaïques temporelles et multicanaux. Les zones grisées sont les combinaisons tissu-type de coupe qui n'ont pas fait l'objet de mesures, par absence de ces tissus sur les coupes considérées, ou sans intérêt

	A020C		C020C		D020C	
	Coupe		Coupe		Coupe	
	Longit	Transv	Longit	Transv	Longit	Transv
Parenchyme lignifié	3	4	9	1	9	0
Parenchymes non lignifiés	13		12		7	
Phloème		1				
Parenchyme xylémien		2				
Collenchyme		1				
Sclérenchyme	1	5	5	0	10	0
Epiderme	5	1	7	0	4	0
Zones déstructurées/ non identifiées			12		6	
Fond d'enzymes sans particule	>>5		>>5		>>5	

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

ii Précautions concernant les mesures des profils d'intensité

Lors de la définition des zones de mesure de profils, il est nécessaire de s'assurer qu'il n'y ait aucun artefact au niveau de la zone, pour tous les canaux : pas de bulle, pas de contamination de signal par quelconque artefact, pas de dérive spatiale au cours du temps de la zone visée (dans le plan xy, mais également dans le sens de l'épaisseur), ni même d'effet d'ombrage en transmission.

iii L'étude de l'intensité dans la solution

On s'intéresse ici à la cohérence interne des acquisitions considérées, pour pouvoir réaliser des comparaisons entre échantillons, tissus, etc. Le niveau d'intensité de fluorescence des enzymes I_{FE} , de fluorescence dans l'image paroi I_{FP} , et de l'intensité en transmission visible transmise I_T , dans les zones où les particules, bulles, etc., sont absentes (ce qu'on appelle "le fond"), est donc un bon moyen de contrôle pour s'assurer que les niveaux d'intensité sont similaires canal par canal pour les différentes acquisitions. Cela permet de s'assurer que la variation du signal au cours du temps est à la fois de faible amplitude et relativement commune pour chaque observation, ce qui permet de comparer les acquisitions entre elles. Par exemple, l'irradiation sous faisceau, peut induire une baisse de la fluorescence des fluorophores, par phénomène de photoblanchiment. Il faut donc s'assurer que cet effet est négligeable, ou, *a minima*, identique pour les différentes acquisitions.

Des mesures ont alors été réalisées dans les 3 canaux :

- sur des particules immergées dans l'eau en l'absence d'enzymes (blanc nommé "particules sans enzyme"), issues de l'échantillon C020C
- sur des enzymes seules, sans particules (nommé "enzymes sans particule")
- sur des coupes classiques avec enzymes et particules, mais au niveau du milieu enzymatique, dans des zones dépourvues de particules (nommé "fond d'enzymes")

La Figure 143 montre l'évolution des intensités mesurées dans les trois canaux, pour des régions correspondant au fond dans lesquelles seule la solution est observée. Les profils du fond pour les enzymes sans particules et les particules sans enzymes sont également présentés. Sur cette même figure on montre également un exemple de délimitation de zones pour la mesure des intensités des fonds d'enzymes.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

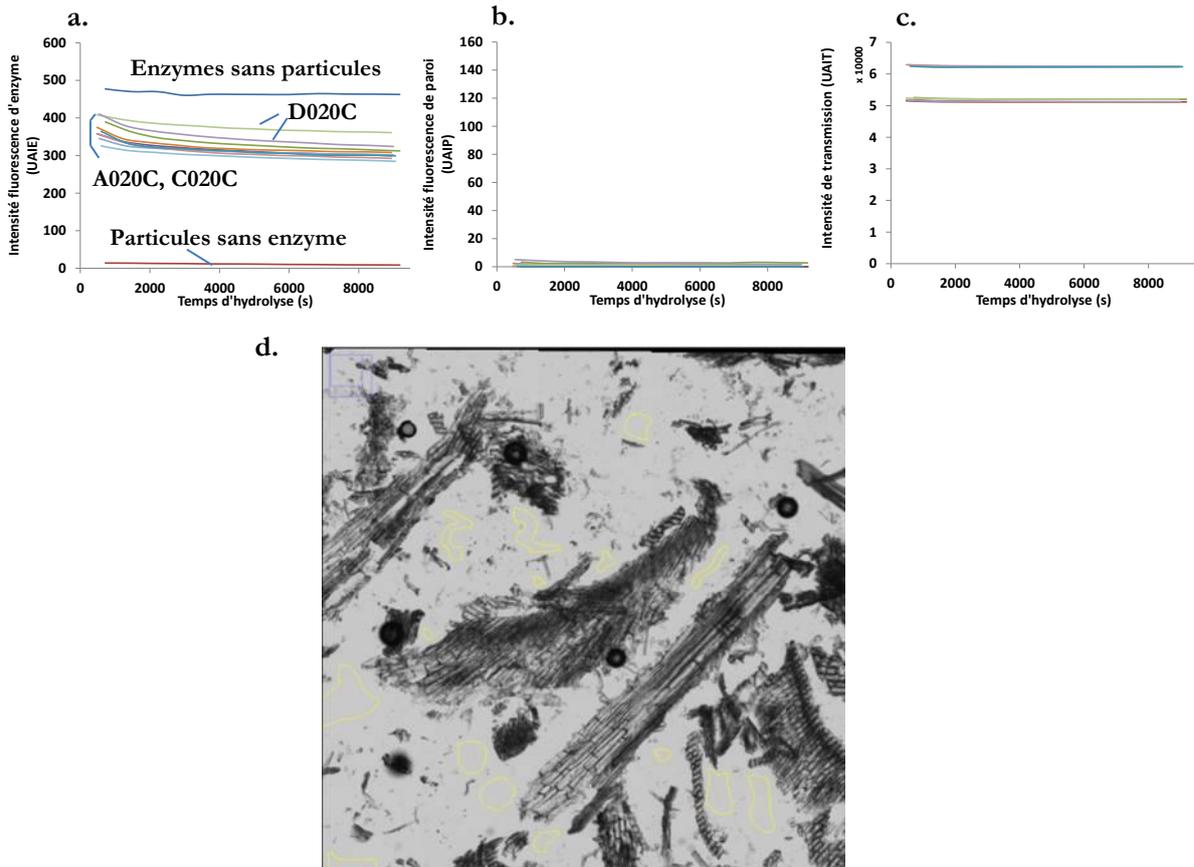


Figure 143 : a, b, et c : Evolution de l'intensité de fluorescence d'enzyme (a), de paroi (b), et d'intensité en transmission (c), en fonction du temps, pour les fonds des différentes acquisitions ; d : Exemple de délimitations (contours jaunes) pour les mesures de fond de fonds (dans ce cas du blanc de particules sans enzymes)

Concernant le fond sur la préparation "enzymes sans particules" :

- l'intensité mesurée dans le premier canal (fluorescence d'enzyme) est stable tout au long de l'analyse autour de 467 UAIE. Il apparaît donc que le phénomène de photoblanchiment des chromophores des enzymes est négligeable. Ainsi, les évolutions d'intensité de fluorescence qui seront mesurées dans les fonds d'enzymes seront représentatives de l'évolution de la concentration en enzymes dans le milieu réactionnel :
- l'intensité de fluorescence des parois est bien évidemment nulle puisqu'il n'y a pas de substrat,
- l'intensité transmise dans le 3^e canal (intensité visible en transmission) est du même ordre que les fonds des autres échantillons, ce qui montre que la source lumineuse (lampe mercure pour ce canal) est stable d'une acquisition à l'autre.

Concernant le fond sur la préparation "particules sans enzyme" :

- l'intensité de fluorescence mesurée dans le 1^e canal (fluorescence des enzymes) est très faible (entre 8 et 14 UAIE) et est négligeable devant les intensités mesurées dans des milieux enzymatiques, ce qui assure que cette fluorescence sera spécifique de la présence des enzymes,
- l'intensité de fluorescence des parois est nulle car on mesure ici les fonds, là où il n'y a pas de particule,
- Enfin, l'intensité mesurée dans le 3^e canal (visible) est du même ordre que ce qu'on observe pour les fonds des autres préparations.

Concernant les fonds d'enzymes des préparations avec particules mises en dégradation :

- Pour la fluorescence des enzymes (canal 1),
 - l'ensemble des échantillons ont leur profil de fluorescence d'enzyme sur une plage assez resserrée d'intensité initiale de fluorescence, entre 410 et 325 unités arbitraires d'intensité. Ceci assure le caractère comparable des profils d'une acquisition à une autre. Cette plage est située de manière logique entre les cas extrêmes que sont la préparation "particules sans enzyme", dont la plage est comprise entre 8 et 14 UAIE, et la préparation "enzymes sans particule", dont l'intensité de fluorescence se situe aux alentours de 467 UAIE,
 - par ailleurs, on constate que pour les fonds d'enzyme des deux préparations de l'échantillon D020C, le profil d'intensité est placé légèrement au-dessus du paquet de profils des autres préparations mises en dégradation (voir la Figure 143a). Il peut s'agir d'un aléa dont l'occurrence serait alors liée à la préparation et non reliée à l'échantillon. Ce point sera malgré tout discuté par la suite et mis en regard des différents comportements d'adsorption-désorption des enzymes sur les différentes particules de ces échantillons, et comparativement aux autres échantillons,
 - enfin, une décroissance légère de l'intensité de fluorescence des enzymes au cours de l'hydrolyse est observée (entre 8 et 20 % selon les échantillons). Ce phénomène n'est pas observé dans le cas des « enzymes sans particule », ce qui tend à dire que cette décroissance n'est pas liée à un photoblanchiment mais plutôt à l'adsorption d'enzymes sur les particules de biomasse, ce qui résulte en une moins grande quantité d'enzymes libres dans le milieu réactionnel.
- La fluorescence de paroi (canal 2) est proche de 0, là encore car les délimitations choisies pour les mesures sur les fonds sont exempts de particules,
- L'intensité visible en transmission (canal 3) est comprise entre 51000 et 63000 UAIT. Elle est de plus très stable au cours du temps.

De manière générale, les intensités des fonds d'enzymes dans les différents échantillons sont globalement assez stables au cours du temps, dans le canal de fluorescence d'enzyme (Figure 143a), comme dans le canal de fluorescence de paroi (Figure 143b) et d'imagerie en fond clair (Figure 143c). Ceci permettra d'attribuer les futures variations observées au niveau des profils à un événement intrinsèquement lié au comportement des enzymes dans le cas du premier canal (adsorption, désorption de l'enzyme par exemple), et des particules dans le cas du troisième canal.

h. Exploitation des résultats

i Profils d'intensités

Pour pouvoir comparer au mieux les profils temporels de fluorescence et d'imagerie visible en transmission, une méthodologie de traitement des données a été mise en place pour permettre de tirer des informations plus quantitatives que celles obtenues par les données brutes. Un exemple est présenté dans ce paragraphe, afin d'expliquer pas à pas cette méthodologie. Pour ce faire, une zone de parenchyme non lignifié (Figure 144a) de l'échantillon A020C est choisie comme exemple.

Pour chaque image de cette zone obtenue au cours de l'hydrolyse enzymatique, des mesures d'intensités ont été réalisées dans les 3 canaux, à savoir le canal de fluorescence des enzymes (327 à 353 nm), le canal correspondant à la fluorescence des parois (420 à 480 nm) et le canal correspondant à l'intensité transmise dans le visible. La zone de mesure est délimitée en jaune sur la Figure 144.a. Les intensités mesurées au cours de l'hydrolyse dans les 3 canaux sont respectivement tracées sur les Figure 144b, c, et d.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

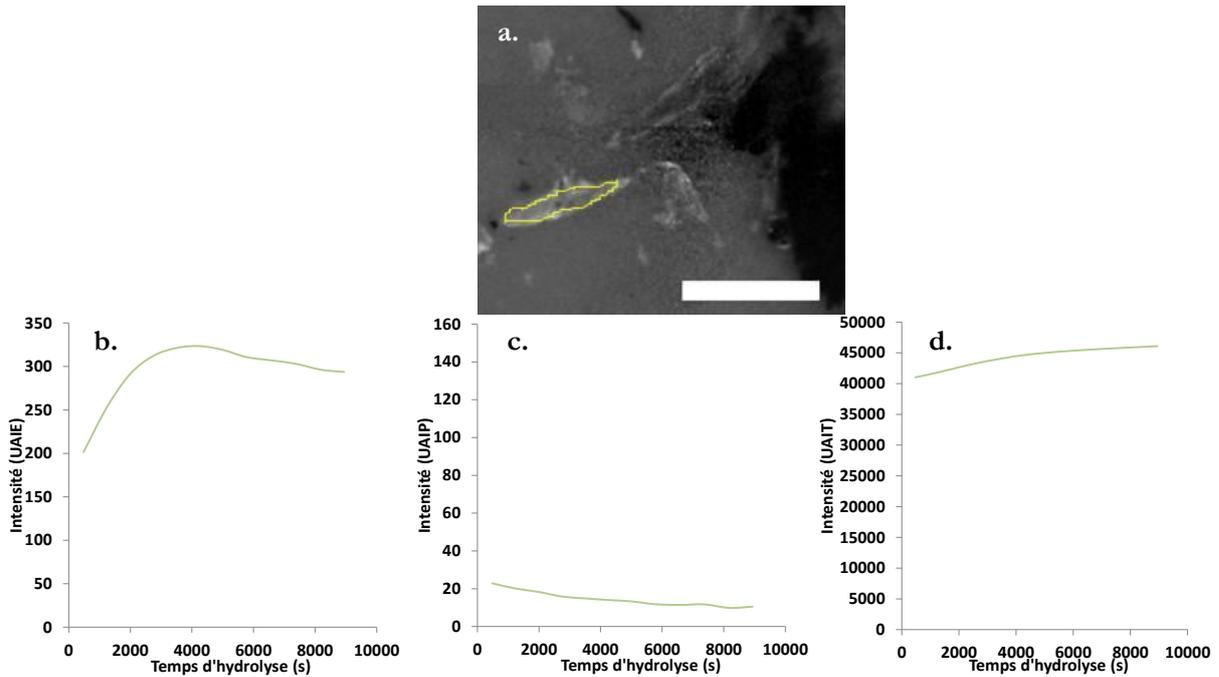


Figure 144 : a : image en visible et transmission représentant le fragment de tissu considéré (parenchyme non lignifié). La zone de mesure est délimitée en jaune. Barre d'échelle : 100 μm ; b : profil temporel d'intensité de fluorescence d'enzyme à 327 nm ; c : profil temporel d'intensité de fluorescence de paroi à 420 nm ; d : profil temporel d'intensité lumineuse transmise (dans le visible)

Le profil de fluorescence d'enzyme (Figure 144b) montre l'existence d'une première phase d'adsorption (comme il s'agit d'un équilibre dynamique d'adsorption-désorption, on devrait plutôt parler d'une phase d'adsorption majoritaire) qui prend fin lorsque l'intensité de fluorescence atteint un maximum, vers 3500 s, après lequel c'est la désorption des enzymes qui devient majoritaire.

L'intensité de fluorescence des parois (Figure 144c) semble diminuer légèrement. Toutefois, comme expliqué précédemment, l'intensité de fluorescence des parois est faible sur les échantillons prétraités ainsi il est difficile d'exploiter ce signal, notamment pour les échantillons prétraités à haute sévérité.

L'intensité visible en transmission quant à elle augmente au cours de l'hydrolyse et de manière plus marquée entre t_1 et 3500 s. Il semble donc exister un lien entre l'évolution de l'intensité de fluorescence des enzymes et l'intensité transmise dans le visible.

Afin d'aller plus loin dans l'interprétation, de corréler les informations observées dans les deux canaux (fluorescence des enzymes et intensité transmise dans le visible) et de pouvoir comparer aisément les différents tissus des différents échantillons, plusieurs traitements sont réalisés et sont présentés ci-dessous.

L'intensité transmise dans le visible $I_T(t)$ est très largement dépendante de l'opacité et de la densité du matériau, ou encore de son épaisseur. De ce fait, les variations d'intensité lumineuse mesurées au cours du temps ne permettent pas de caractériser correctement l'évolution de la zone considérée, à savoir l'amincissement de l'échantillon. Afin de rendre compte de ce phénomène, plusieurs corrections sont réalisées :

- Une soustraction de l'intensité transmise dans le fond (en l'absence d'échantillon) pour chaque temps t :

$$I_{T_{fond}}(t) - I_T(t) \quad \text{Équation (14)}$$

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- On définit le coefficient d'amincissement relatif A_r au temps t par rapport au temps initial t_i , au temps t :

$$A_r(t) = \frac{I_{T_{fond}}(t_i) - I_T(t_i)}{I_{T_{fond}}(t) - I_T(t)} \quad \text{Équation (15)}$$

Où $I_{T_{fond}}(t_i)$ et $I_{T_{fond}}(t)$ sont l'intensité en transmission au niveau du fond au tend initial t_i et au temps t , et $I_T(t)$ l'intensité en transmission au temps t , du tissu considéré.

En remplaçant la valeur de l'intensité visible en transmission par la grandeur A_r , les profils de la Figure 144 deviennent :

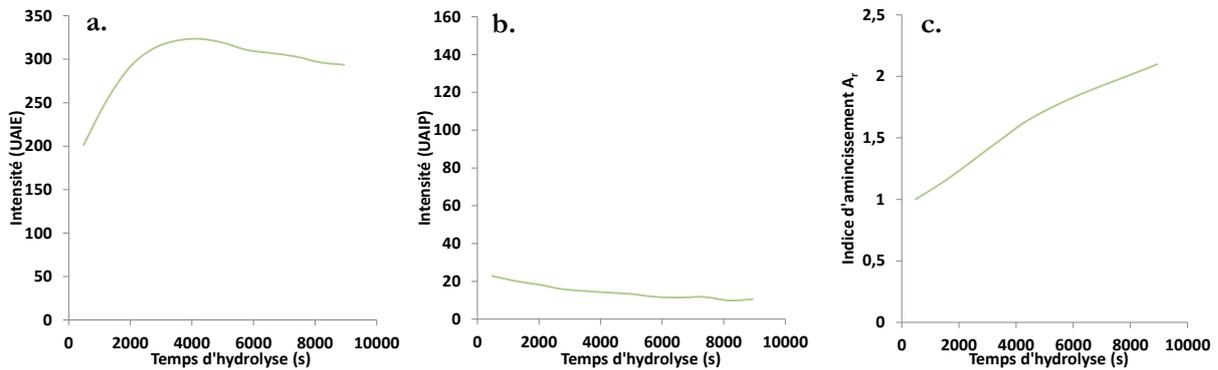


Figure 145 : a : profil temporel d'intensité de fluorescence d'enzyme à 327 nm ; b : profil temporel d'intensité de fluorescence de paroi à 420 nm ; c : profil temporel d'intensité lumineuse transmise (dans le visible)

On peut qualitativement confirmer que l'amincissement est d'autant plus rapide que l'intensité de fluorescence d'enzyme est grande (ici vers $t=3500$ s). Maintenant que l'on possède une grandeur relative à la dégradation de la matrice lignocellulosique qui permette la comparaison des tissus et échantillons, on cherche à expliciter le lien existant entre cette grandeur d'amincissement (que l'on supposera représentative de la digestion du tissu) et un travail effectif des enzymes, à travers leur intensité de fluorescence.

ii Relation entre fluorescence dans l'image des enzymes et dans l'image visible

Basé sur les observations précédentes, on suppose dans un premier temps que la valeur de l'amincissement relatif A_r est proportionnelle (à une constante près) à la quantité totale d'enzymes qui se sont adsorbées sur la particule sur l'intervalle de temps considéré (entre 0 et t). Cela se traduit par le cumul ou somme des intensités de fluorescence $I_{FE}(t)$ jusqu'au temps t , et que l'on notera $\sum I_{FE}(t)$. Dans notre cas, les mesures étant discrètes (au nombre de 12) et le pas de temps entre deux mesures étant constant, on a pour tout temps de mesure t_i :

$$\sum I_{FE}(t_i) = \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j) , i \in \llbracket 1; 12 \rrbracket \quad \text{Équation (16)}$$

où t_j est le temps à la $i^{\text{ème}}$ série d'acquisition (parmi les i séries d'acquisitions échelonnées dans le temps). Ce cumul $\sum I_{FE}(t_j)$ exprime la quantité d'enzymes d'enzyme qu'a accueilli la surface de la particule, et donc indirectement le travail d'hydrolyse qu'ont pu effectuer les enzymes jusqu'au temps t_i à cet endroit.

On exprime maintenant l'amincissement relatif A_r en fonction de ce cumul de contributions des enzymes sur la Figure 146, afin de vérifier le lien pressenti entre ces deux paramètres. On remarque qu'il

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

existe une relation bijective et quasi affine, comme attendu. La légère concavité sur cette courbe suggère que les enzymes sont légèrement plus efficaces en début qu'en fin d'hydrolyse.

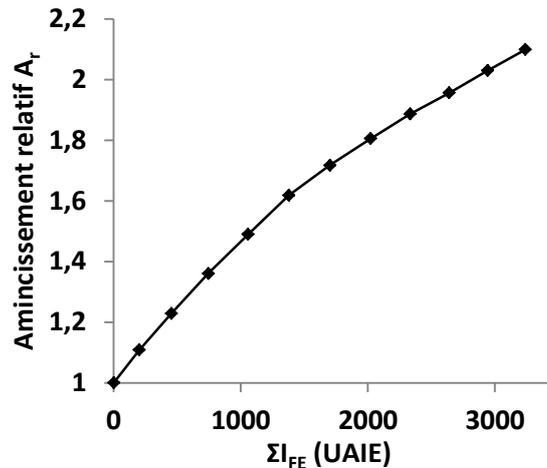


Figure 146 : Indice d'amincissement relatif en fonction des cumuls d'intensités de fluorescence d'enzyme aux différents temps de mesure

iii Scénario d'interaction enzyme-particules

Pour mieux comprendre l'existence d'un tel phénomène, on considère un profil de fluorescence d'enzyme complet, représenté de manière schématique en Figure 147. Entre le moment où les enzymes sont ajoutées et le temps t_1 de la première acquisition, une partie de la première phase d'adsorption des enzymes n'est pas observable (première image acquise au bout d'une dizaine de minutes). De même, au dernier temps d'acquisition t_{12} , la réaction d'hydrolyse n'est pas tout à fait terminée. En effet, le régime n'y est pas encore statique. Mais par la forme du profil observé dans la plage temporelle d'acquisition, on peut supposer qu'il existe une valeur finale seuil d'intensité de fluorescence, en prolongeant le profil. Cela signifie qu'en fin d'hydrolyse, des enzymes sont toujours présentes, mais ne participent plus à l'hydrolyse.

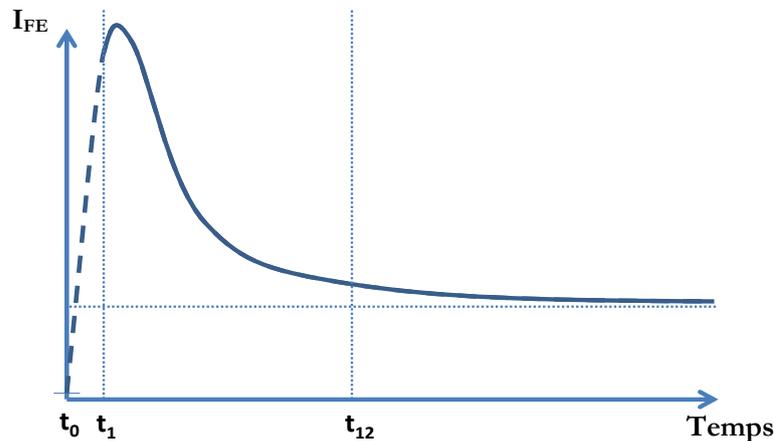


Figure 147 : Représentation schématique d'un profil de fluorescence d'enzyme au cours de l'hydrolyse enzymatique. t_0 représente le moment où les enzymes sont ajoutées à la préparation microscopique, t_1 le temps à la première acquisition, et t_{12} le temps à la dernière acquisition

Ces enzymes peuvent être adsorbées de manière non productive sur la matrice non complètement digérée, ou bien être des enzymes du milieu réactionnel dans le cas où la matrice lignocellulosique aurait été complètement digérée. L'idée consistant à supposer l'existence d'enzymes progressivement bloquées à la surface de l'échantillon est cohérente avec l'hypothèse souvent énoncée dans la littérature pour expliquer la baisse de la cinétique de saccharification, en évoquant un blocage plus ou moins réversible au niveau de la surface de l'échantillon partiellement hydrolysé [262,272]. Dans le cas d'une fluorescence issue

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

du milieu enzymatique par digestion totale de la particule, la valeur finale d'intensité de fluorescence doit être égale à celle du milieu enzymatique (le "fond d'enzyme"). Dans tous les cas, on comprend la nécessité de pouvoir dissocier la part des enzymes qui réalisent effectivement un travail d'hydrolyse, de la part des enzymes qui ne participent plus à cette hydrolyse.

En nommant $I_{FE_{dynam}}(t)$ l'intensité de fluorescence d'enzyme relative aux enzymes qui hydrolysent effectivement la matrice au temps t , et, $I_{FE_{stat}}(t)$ l'intensité de fluorescence d'enzymes relative aux enzymes qui ne participent pas à la saccharification, on a :

$$I_{FE}(t) = I_{FE_{dynam}}(t) + I_{FE_{stat}}(t) \quad \text{Équation (17)}$$

Pour parvenir à dissocier d'un point de vue cinétique la part des enzymes qui participent à la saccharification de la part des enzymes qui n'y participent pas, plusieurs hypothèses sont faites :

Hypothèse 1 :

Dans le cas d'une adsorption d'enzymes non productive en surface de particule, celle-ci se fait de manière irréversible. On suppose de plus que le taux instantané d'adsorption non productive se produisant à un instant t_i est proportionnel à l'intensité totale de fluorescence d'enzymes au temps t_i , $i \in \llbracket 1;12 \rrbracket$:

$$\frac{dI_{FE_{stat}}(t)}{dt} = K \cdot I_{FE}(t) \quad \text{Équation (18)}$$

Où K est une constante à déterminer.

Cette hypothèse se base sur le fait que d'une part l'adsorption non réversible ne peut, par définition, que s'accumuler, d'autre part, que cette adsorption non réversible a plus de chance de se produire lorsque le taux instantané d'adsorption totale est intense, et enfin, que le cumul des intensités de fluorescence des enzymes est censé être représentatif du travail de conversion effectué tout au long de l'hydrolyse.

- Hypothèse 2 :

Le travail des enzymes entre t_0 et t_1 (temps de la première acquisition) est négligeable par rapport au travail des enzymes effectué sur la durée de l'observation. Pour certains tissu très réactifs, on sait que ce ne sera pas vrai, auquel cas un biais sera probablement introduit.

- Hypothèse 3 :

De même, on suppose qu'à la fin de l'expérimentation il n'y a plus d'adsorption réversible, c'est-à-dire que la cinétique d'hydrolyse est nulle et que les enzymes restantes contribuant au signal en fin d'expérimentation sont pour une part des enzymes adsorbées de manière non productive, et pour une autre part, des enzymes libres du milieu réactionnel présentes derrière et/ou devant la particule, et dont la fluorescence émise est mesurée. Cette hypothèse apporte un léger biais car on pressent qu'en fin d'expérimentation, la saccharification suit toujours son cours, bien que fortement ralentie. Dans le cas d'un fragment totalement digeste, les enzymes bloquées sont libérées par la disparition totale du fragment, et la valeur d'intensité de fluorescence d'enzyme converge simplement vers l'intensité locale du fond enzymatique.

Pour représenter de manière plus imagée les parts non utiles (adsorption non réversible et enzymes libres du milieu par transparence/disparition de la particule de biomasse) et dynamique (fraction des enzymes qui s'adsorbent et se désorbent) au cours du temps, on représente de nouveau un profil quelconque de fluorescence d'enzyme mesuré sur un tissu digeste (l'enveloppe de la Figure 148 de gauche).

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

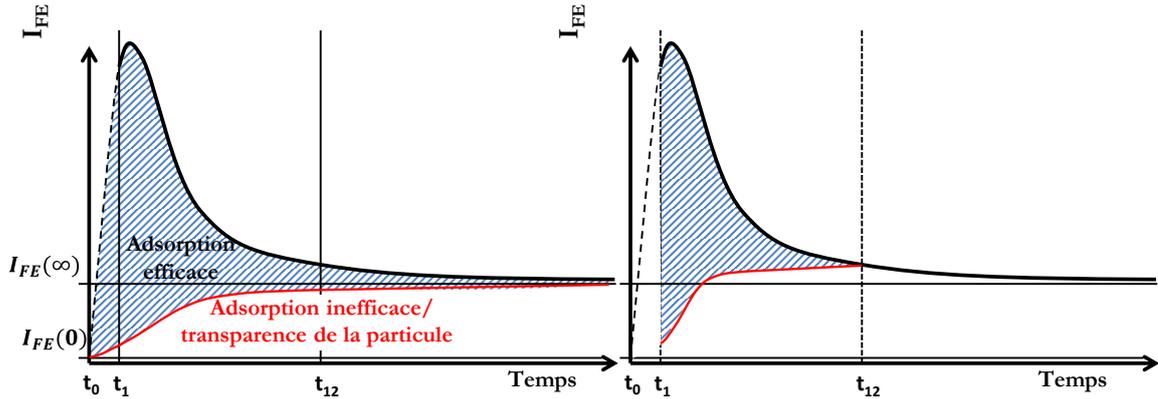


Figure 148 : Représentation schématique de la part de la fluorescence d'enzyme en dissociant la fraction des enzymes qui participent à l'hydrolyse (zone hachurée) de celle dont les enzymes ne participent pas à la saccharification, compte-tenu de l'hypothèse 1 (à gauche), et des hypothèses 1, 2, et 3 (à droite)

La fluorescence des enzymes non efficaces est tracée sous le profil total, en rouge. Ce fond statique augmente tout au long de l'hydrolyse, et de manière d'autant plus marquée que l'intensité totale de fluorescence est forte. A t_{∞} , la fluorescence provient d'enzymes strictement improductives pour les particules partiellement digérées et restées opaques du point de vue de la fluorescence, et provient d'enzymes libres du milieu réactionnel pour les particules les plus digérées (et la valeur finale de l'intensité vaut la valeur du niveau de fond des enzymes à proximité). Pour les particules de digestibilité intermédiaire, les deux phénomènes contribuent à déterminer la valeur finale d'intensité de fluorescence d'enzyme. Pour une particule totalement indigeste, l'éventuelle adsorption non productive serait statique, donnant une fluorescence d'enzymes dynamiques quasi nulle.

L'aire hachurée représente l'intégrale de la fluorescence des enzymes efficaces, qui est la soustraction de l'aire du profil de fluorescence de toutes les enzymes et de l'aire du profil de fluorescence des enzymes non productives (qui ne participent pas à la saccharification).

La figure de droite montre la zone mesurée réellement compte tenu du temps d'expérimentation et de l'hypothèse 4 présentée ci-dessus, ce qui illustre le biais qui peut en découler.

iv Expression du travail potentiel d'hydrolyse des enzymes productives

Par intégration de l'Équation (18), il vient :

$$I_{FE_{stat}}(t) = K \int_{t_0}^t I_{FE}(t) \cdot dt \approx K \int_{t_1}^t I_{FE}(t) \cdot dt \quad \text{Équation (19)}$$

(hypothèse 2)

Les mesures étant discrètes, cela revient à écrire :

$$I_{FE_{stat}}(t_i) = K \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j)(t_j - t_{j-1}) = K \times i \times \Delta t \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j) \quad \text{Équation (20)}$$

où t_i est le temps à la i -ième acquisition ($i \in \llbracket 1; 12 \rrbracket$), et Δt le pas e temps entre deux analyses (environ 12 min et 30 s). Par ailleurs, on a supposé par l'hypothèse 3 :

$$I_{FE_{dynamique}}(t_{12}) \approx 0 \quad \text{Équation (21)}$$

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Donc, d'après l'Équation (18) et l'Équation (20),

$$K = \frac{I_{FE}(t_{12})}{\Delta t \times 12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \quad \text{Équation (22)}$$

L'intensité $I_{FE_{dynam}}(t_i)$ qui représente la proportion d'enzymes à un instant t_i qui participent à l'hydrolyse enzymatique, vaut donc :

$$I_{FE_{dynam}}(t_i) = I_{FE}(t_i) - \frac{I_{FE}(t_{12}) \times i \times \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j)}{12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \quad \text{Équation (23)}$$

En conséquence, le cumul des intensités des enzymes dynamiques représente la "quantité" d'enzymes qui ont participé à l'hydrolyse depuis le début de l'hydrolyse jusqu'à un temps t_i :

$$\Sigma I_{dynam}(t_i) = \sum_{k=1}^i \left(I_{FE}(t_k) - \frac{I_{FE}(t_{12}) \times k \times \sum_{j=1}^k I_{FE}(t_j)}{12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \right) \quad \text{Équation (24)}$$

Par définition de cette grandeur, le cumul $\Sigma I_{dynam}(t_i)$ représente le travail potentiel que peuvent avoir réalisées les enzymes entre le début de l'hydrolyse et le temps t_i considéré. Cette grandeur dépend du pas de temps considéré. En revanche, elle ne présage pas de l'efficacité des enzymes.

v Relation entre le cumul des enzymes productives et l'amincissement des particules

La valeur du cumul ΣI_{dynam} est supposée réaliser une bijection avec l'amincissement relatif A_r qui est la manifestation de la digestion de la matrice lignocellulosique. Afin de le vérifier, l'indice d'amincissement A_r est tracé en fonction du cumul ΣI_{dynam} au cours de l'hydrolyse enzymatique sur la Figure 149. La relation entre les deux est bien confirmée.

La déviation observée a lieu pour les derniers temps d'hydrolyse pour lesquels on considère que l'adsorption dynamique tombe à 0, alors que ce n'est pas rigoureusement le cas puisque la dégradation se poursuit en réalité encore un peu après la dernière mesure. Ce biais pourra être d'autant plus visible que le tissu qui fait l'objet de la mesure possède une cinétique de dégradation lente, et pour laquelle la dégradation après la fin de l'expérimentation aurait été significative, comparativement à la dégradation observée tout au long de l'expérimentation. A l'inverse, pour les échantillons les plus digestes, il est probable que seule la fin de la cinétique ne soit analysée. Dans ce cas, les déterminations de l'amincissement relatif A_r et du cumul ΣI_{dynam} sous-estimeront les valeurs réelles.

La pente mesurée sur ce graphe pourra alors être utilisée pour quantifier la facilité des enzymes à dégrader la matrice pour une dose d'enzymes donnée (commune pour les différentes mesures et échantillons considérés).

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

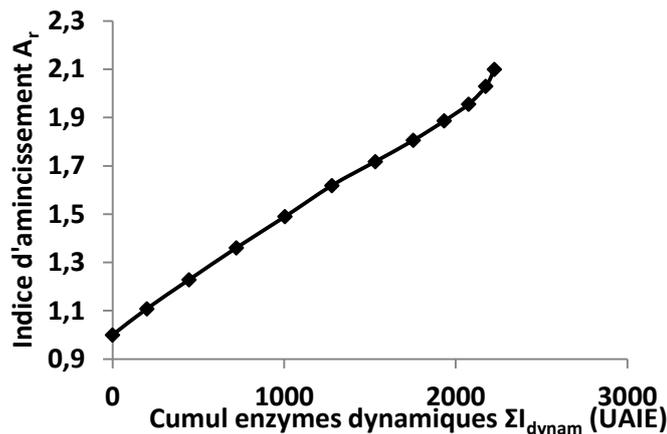


Figure 149 : Indice d'amincissement calculé à partir du canal d'imagerie visible en transmission, en fonction du cumul ΣI_{dynam} des intensités de fluorescence d'enzymes productives

Cette méthodologie d'exploitation des données a alors été réalisée sur chaque zone d'intérêt de chaque échantillon, ce qui permet de comparer le comportement des différentes zones/particules vis-à-vis de leur dégradation lors de l'hydrolyse enzymatique, ainsi que de comparer les différents échantillons.

i. L'analyse du substrat peu prétraité

On considère les séries temporelles d'images mosaïques de l'échantillon A020C, prétraité à 100 °C pendant 20 min, afin d'étudier les évolutions au cours de l'hydrolyse enzymatique. Cet échantillon s'apparente à de la paille native, tant les tissus sont reconnaissables et peu altérés. De ce fait, l'analyse des tissus y est plus poussée que pour les autres échantillons, produits à plus haute sévérité.

i Réactivité et dégradation des tissus

Dans un premier temps, on s'assure de la cohérence des mesures faites par type de tissu, en comparant pour chacun d'entre eux le tracé des différents profils qui leur sont attribués, canal par canal. Le collenchyme, le phloème et le parenchyme xylémien, sortent de ce cadre puisque 1 à 2 profils ont pu être mesurés, par la faible occurrence de ces tissus sous une forme observée de bonne qualité visuelle (absence de bulle ou autre artefact, zone bien nette, identification sûre, particule immobile). Afin de pouvoir comparer les profils des différents tissus, une même échelle est choisie pour tous les tissus, dépendamment du canal d'observation et de l'échantillon considéré. Les graphes qui présentent l'amincissement relatif A_r en fonction du cumul des intensités des enzymes productives ΣI_{dynam} , eux, utilisent des échelles propres à chaque tissu, pour une meilleure représentation.

Le parenchyme lignifié

Le parenchyme lignifié est l'un des tissus les plus abondants de la paille de blé. Les différents profils obtenus dans les 3 canaux sont indiqués dans la Figure 150. L'image de la figure montre un exemple de délimitation pour la mesure d'un des profils. Pour ce qui est de l'affinité enzymatique (canal 1), elle est faible (30 à 100 UAIE) et stable au cours de l'hydrolyse. La fluorescence des parois est assez intense (45 à 130 UAIP) comparativement à d'autres tissus, mais les valeurs sont assez variables car elles dépendent de la mesure (en coupe transversale ou longitudinale). Pour ce tissu, aucun amincissement particulier n'est mesuré sur le canal 3 de l'image en transmission.

Ces résultats indiquent que ce tissu est indigeste à ce stade de sévérité de prétraitement, malgré une très légère adsorption des enzymes au niveau de ce tissu.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

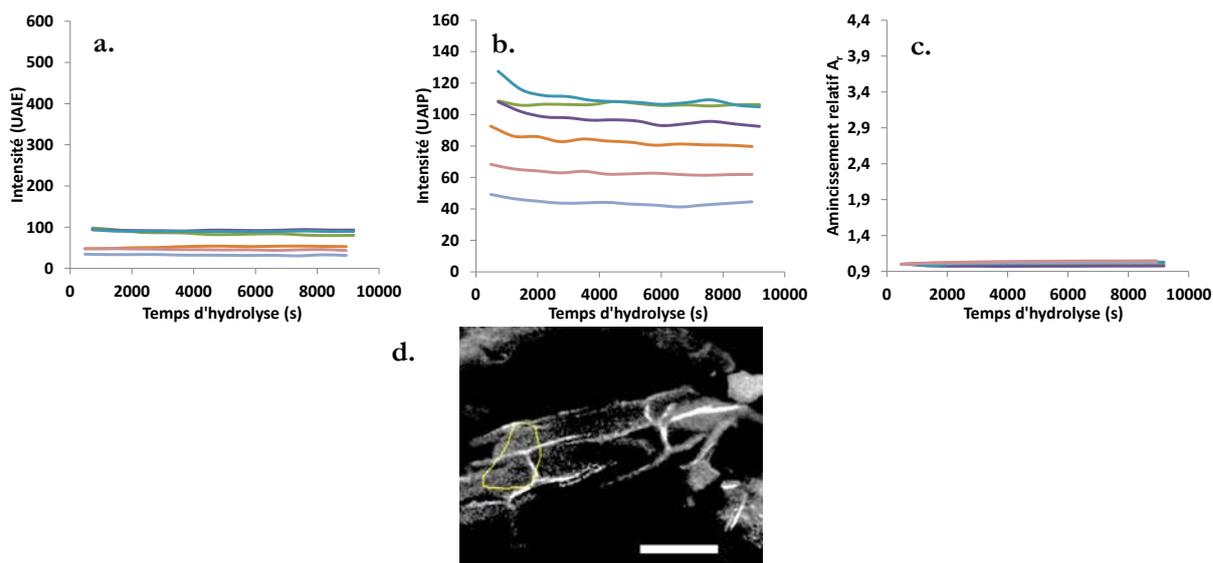


Figure 150 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones de parenchyme lignifié, observées en coupes transversales et longitudinales, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Image présentant un exemple de délimitation de parenchyme lignifié en coupe longitudinale, imagé ici en fluorescence de paroi. Barre d'échelle : 100 μm

La Figure 151 qui montre l'évolution de l'amincissement relatif (avec une échelle de représentation plus adaptée) en fonction du cumul des enzymes productives ΣI_{dynam} , confirme d'une part que l'amincissement n'est pas significatif, et d'autre part que le travail potentiel des enzymes est faible ($\Sigma I_{\text{dynam}}=700$ UAIE au mieux). La valeur ΣI_{dynam} est d'ailleurs certainement surestimée par le fait que la phase transitoire d'adsorption (aussi faible soit-elle) au tout début de l'hydrolyse enzymatique ne peut pas être prise en compte. En effet, dans un cas idéal, ΣI_{dynam} devrait être nulle pour une particule sans aucune digestibilité.

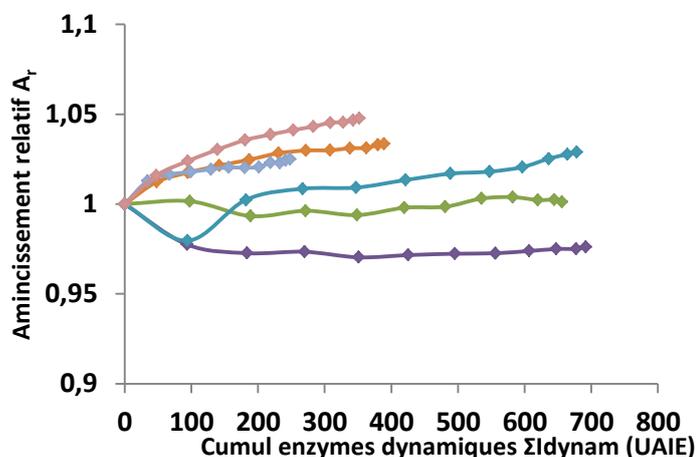


Figure 151 : Amincissement relatif A_r en fonction du cumul des enzymes productives ΣI_{dynam} , pour du parenchyme lignifié

Le sclérenchyme

Le sclérenchyme est un autre tissu majoritaire de la paille de blé. Les profils de sclérenchyme sont plus homogènes que pour le parenchyme lignifié, comme l'atteste la Figure 152. On constate que l'affinité des enzymes pour ce substrat est très faible (30 à 50 UAIE), et qu'elle n'évolue pas au cours du temps. La fluorescence résiduelle des parois est significative (50 à 110 UAIP). L'amincissement semble quant à lui, inexistant.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

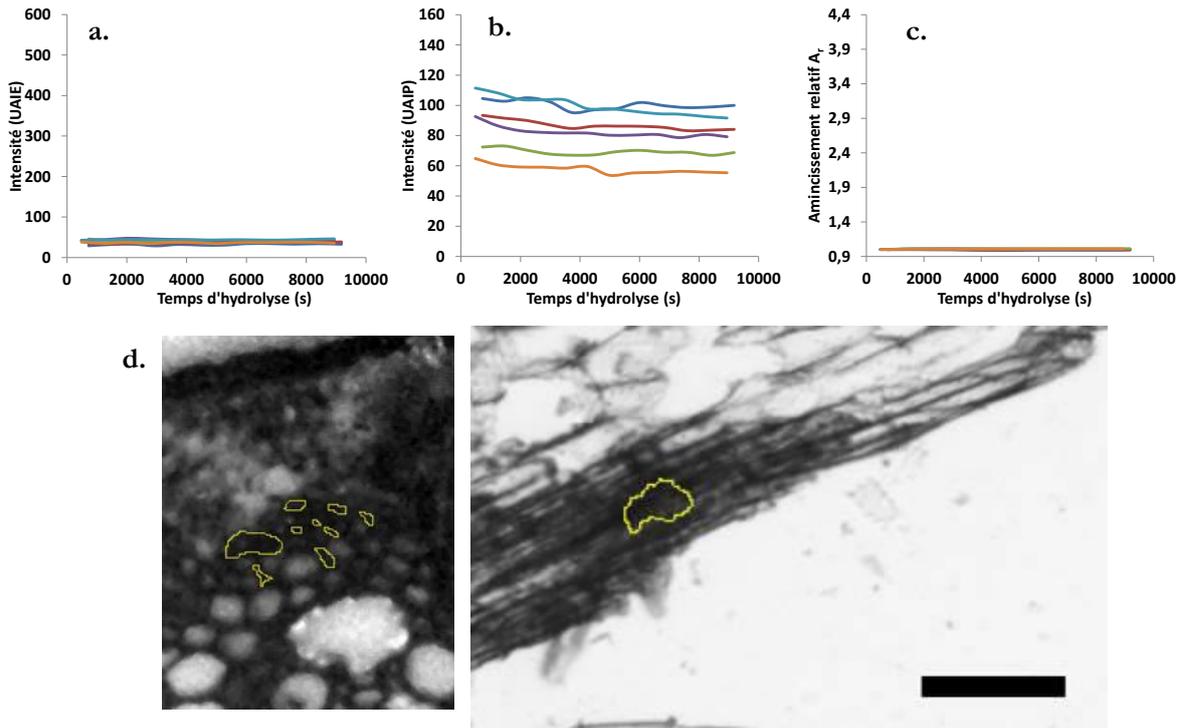


Figure 152 : a, b, c, et d : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones de sclérenchymes, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Deux exemple de sclérenchymes délimités pour la mesure des profils, l'un en coupe transversale et en fluorescence d'enzyme, et l'autre en coupe longitudinale, par imagerie en transmission. Barre d'échelle : 100 μm

Comme pour ce qui était du parenchyme lignifié, l'amincissement est inexistant (le signal en transmission semble par ailleurs plus stable), et le cumul des enzymes est très faible ($\Sigma I_{\text{dynam}} = 330$ UAIE au mieux), comme l'indique la Figure 153. Pour les mêmes raisons que pour le parenchyme lignifié, ΣI_{dynam} est d'ailleurs probablement surestimé.

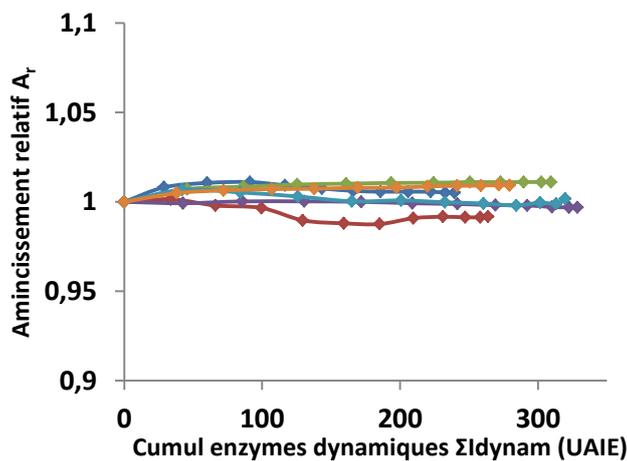


Figure 153 : Amincissement relatif A_r en fonction du cumul ΣI_{dynam} des enzymes productives, pour du sclérenchyme

Parenchymes non lignifiés

Les parenchymes non lignifiés sont beaucoup moins répandus que le sclérenchyme et le parenchyme lignifié. Ils sont surtout présents dans les parties immatures de la tige de blé (tiges jeunes ou partie sommitale par exemple, sous forme de moelle), dans les feuilles (mésophylle), et dans les faisceaux vasculaires (parenchyme xylémien). L'identification précise du type de parenchyme non lignifié est le plus souvent impossible, car ces tissus fragiles sont retrouvés le plus souvent seuls, et sans structure

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

reconnaissable. L'hétérogénéité des profils obtenus (Figure 154a) confirme l'origine diverse des tissus. Ils ont cependant plusieurs points communs. D'abord, ils présentent tous une fluorescence d'enzyme très élevée (entre 130 et 600 UAIE), et donc une digestibilité particulièrement élevée, comme l'attestent les canaux 1 et 3 qui indiquent à la fois une forte dynamique d'adsorption-désorption en concomitance avec l'amincissement des particules. Plus précisément, on retrouve l'existence d'une première phase durant laquelle l'adsorption des enzymes est prépondérante. Après un maximum d'enzymes liées à la particule, la désorption domine ensuite progressivement. De plus, ces parenchymes ont une fluorescence de paroi faible (0 à 35 UAIP).

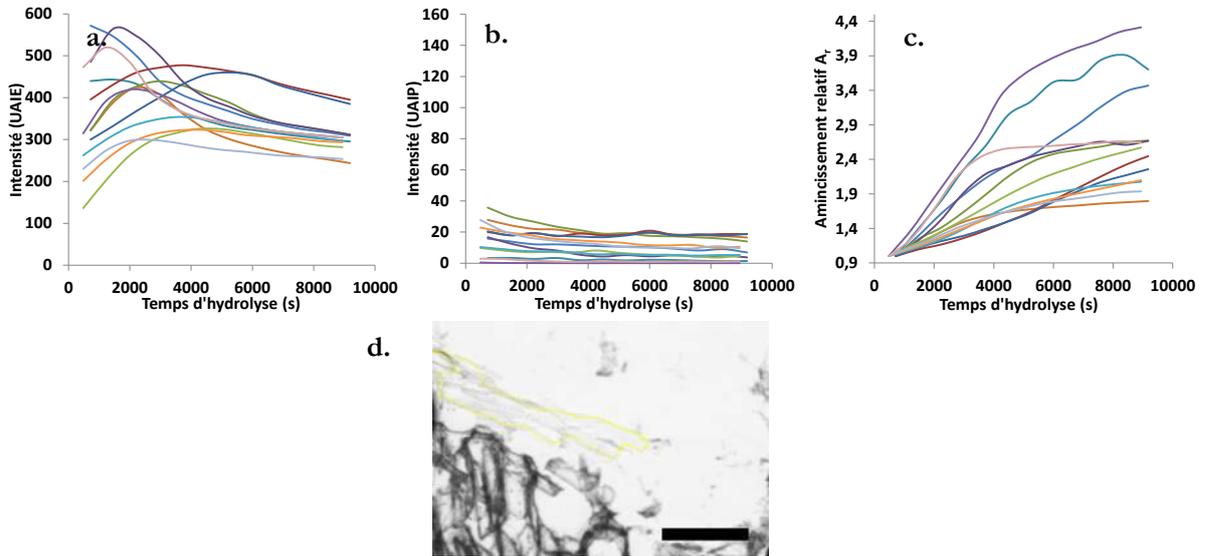


Figure 154 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents parenchymes non lignifiés, observées en coupes longitudinales, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Exemple de parenchyme non lignifié délimité, et vu en coupe longitudinale, par imagerie en transmission. Barre d'échelle : 100 μm

L'amincissement est significatif (jusqu'à 4,2, Figure 155) de même que le cumul ΣI_{dynam} (jusqu'à 3500 UAIE). La forte pente liant A_r à ΣI_{dynam} ($3,7 \cdot 10^{-4}$ à $1,2 \cdot 10^{-3}$ UAIE $^{-1}$) exprime que les enzymes sont particulièrement efficaces sur ces tissus.

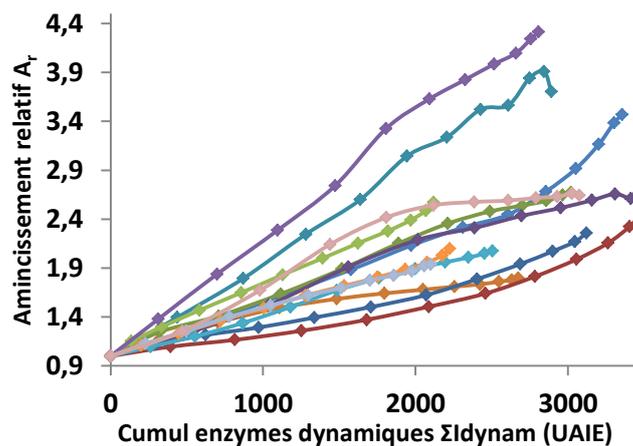


Figure 155 : Amincissement relatif A_r en fonction du cumul des enzymes productives ΣI_{dynam} , pour du parenchyme non lignifié

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Les épidermes

Les épidermes possèdent des profils très différents, comme l'illustre la Figure 156, tant en termes d'affinité vis-à-vis des enzymes, de fluorescence de paroi, que d'amincissement de la paroi. En effet on observe que 2 des 6 épidermes choisis ne présentent aucune affinité enzymatique ni amincissement progressif (Figure 156a et c, traits continus). Un de ces 2 profils est attribué de manière certaine à un épiderme de tige, car le brin de paille entier était conservé, ce qui permet de s'assurer que ces deux profils similaires sont des épidermes de tige. Cette récalcitrance observée en dépit d'une teneur en lignine réduite peut s'expliquer par la forte présence de silice et de composés cireux présents à ce niveau [94]. Ces épidermes indigestes présentent la plus faible fluorescence de paroi (0 à 15 UAIP), comparativement aux autres profils d'épidermes considérés (10 à 65 UAIP). Les autres épidermes (par conséquent, des épidermes de feuille en toute logique) possèdent une fluorescence d'enzymes plus intense et qui augmente au cours du temps, signe qu'il y a une adsorption de plus en plus intense sur la surface de ces tissus, puis finit par stagner voire diminuer. Cela s'accompagne d'ailleurs d'un léger amincissement de la paroi au niveau de l'image en transmission. On montre une image en exemple pour chacun des trois épidermes rencontrés (Figure 156d).

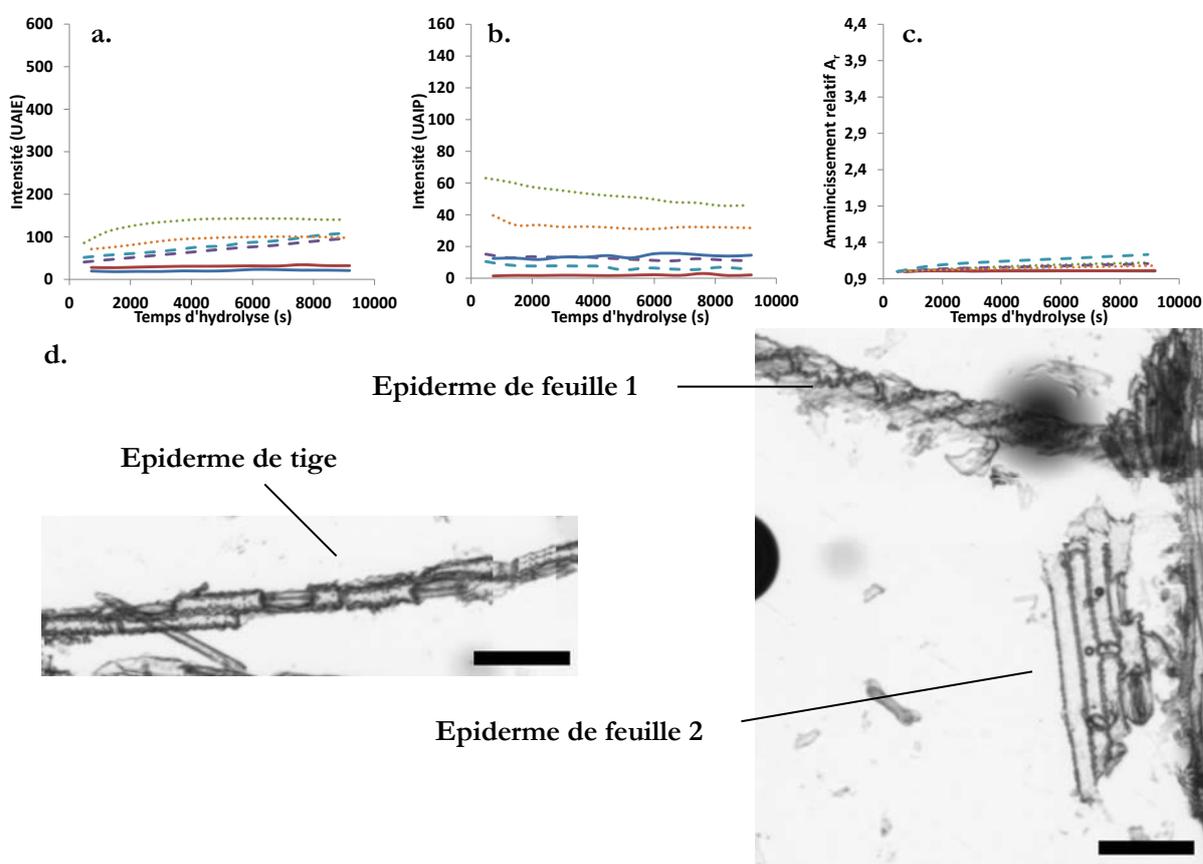


Figure 156 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones d'épidermes, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c). Les trois types d'épidermes identifiés sont indiqués en trait continu (épiderme de tige), tirets (épiderme de feuille, inférieur ou supérieur), et pointillés (épiderme de feuille supérieur ou inférieur) ; d : Images des trois types d'épidermes rencontrés. Barre d'échelle : 100 μm

La Figure 157 confirme la présence suggérée de trois types d'épiderme : un épiderme de tige non digeste (cumul enzymatique nul, pas d'amincissement), un premier type d'épiderme (de feuille *a priori*) pour lequel le travail potentiel des enzymes est plutôt significatif (le cumul ΣI_{dynam} atteint 550 UAIE), mais dont l'amincissement associé est très modéré (jusqu'à 1,1), et un deuxième type d'épiderme (de feuille *a priori*) pour lequel le travail potentiel des enzymes est plus faible (le cumul ΣI_{dynam} est de l'ordre de 460 UAIE), mais s'accompagne d'un amincissement plus conséquent (jusqu'à 1,25). Au niveau des pentes, on a donc dans le premier cas une pente faible (1.10^{-4} UAIE $^{-1}$), et dans un second cas, une pente plus élevée (2,2 et

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

$3,9 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹), qui exprime que l'efficacité des enzymes à l'hydrolyse est meilleure pour ce type d'épiderme. Les cinétiques très lentes de saccharification font que l'on néglige probablement une part conséquente de la dégradation qui se serait poursuivie après la fin de l'expérimentation. D'ailleurs on remarque l'augmentation de la pente sur la Figure 157 pour les dernières mesures, qui témoigne de ce biais.

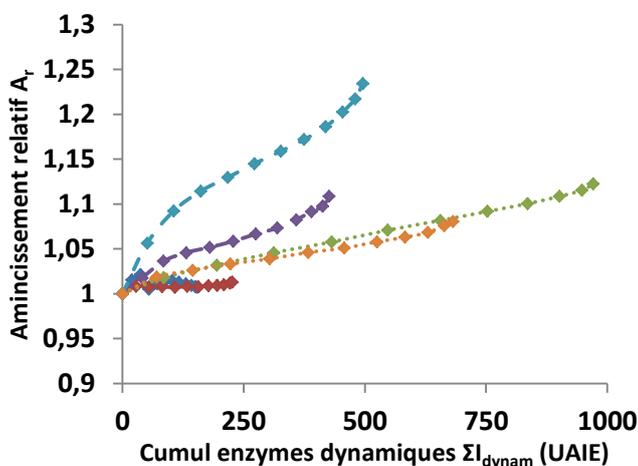


Figure 157 : Amincissement relatif A_r en fonction du cumul le cumul ΣI_{dynam} de l'intensité de fluorescence des enzymes productives, pour les différents épidermes

En conclusion, le comportement de l'épiderme en hydrolyse enzymatique semble donc être dépendant de son origine au niveau du plant de blé. Des trois types de profil mesurés, seul l'épiderme de tige a pu être détecté comme tel, par sa localisation au niveau de la tige de blé. Il est totalement indigeste et est l'épiderme le moins fluorescent. L'épiderme présentant la plus forte affinité enzymatique est aussi celui qui présente la plus forte fluorescence de paroi. Ceci est particulièrement vrai au niveau des stomates (indépendamment de la feuille ou de la tige) pour lesquelles, les cellules de garde présentent une fluorescence de paroi et une affinité enzymatique légèrement plus élevée que pour le reste de l'épiderme qui l'entoure (voir la Figure 158). Pour des substrats particulièrement peu prétraités comme celui-ci, ces ouvertures vers les tissus intérieurs pourraient ainsi jouer un rôle léger dans la cinétique de saccharification en rendant les tissus internes accessibles localement. Par ailleurs, l'épiderme de feuille semble être le seul tissu pour lequel on observe à la fois une fluorescence de paroi non nulle et une digestibilité au moins partielle, notamment au niveau des cellules de garde des stomates. L'observation de la présence d'acides hydroxycinnamiques au niveau des stomates a déjà été vue au microscope à fluorescence UV-VIS (Annexes 5).

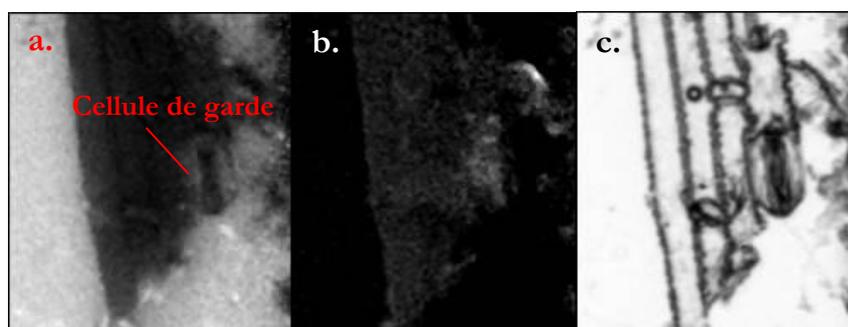


Figure 158 : Images d'un épiderme réactif au niveau d'un stomate. a : fluorescence d'enzyme ; b : fluorescence de paroi ; et c : imagerie de transmission

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tissus minoritaires : collenchyme, parenchyme xylémien, phloème

Quelques tissus ont été retrouvés sans avoir pu faire l'objet d'un nombre satisfaisant de mesures de qualité. Il s'agit du collenchyme, du parenchyme xylémien (non lignifié, présent dans le faisceau vasculaire), et du phloème (idem). Les résultats présentés ci-dessous sont donc à considérer avec réserve.

Pour l'unique profil de collenchyme (Figure 159, tirets bleus), une affinité enzymatique est présente. L'amincissement relatif semble quant à lui très faible (1,06) par rapport à d'autres tissus.

Pour le parenchyme xylémien, les 2 profils de mesure (traits continus en vert et rouge), indiquent que ce tissu est quasiment dégradé dès le début de l'observation, puisque le pic d'adsorption semble déjà avoir été passé. Ce tissu peu fluorescent au niveau de ses parois s'amincit significativement au cours de l'hydrolyse, bien qu'au moment de l'observation l'avancement de la saccharification de ce tissu soit bien avancé. Cela témoigne du caractère fortement accessible de la cellulose qui le constitue.

Le phloème (trait noir) se comporte comme le parenchyme xylémien : ce tissu est quasiment dégradé dès le début de l'observation. Cet échantillon est donc très digeste, d'une magnitude similaire à celle observée pour le parenchyme xylémien.

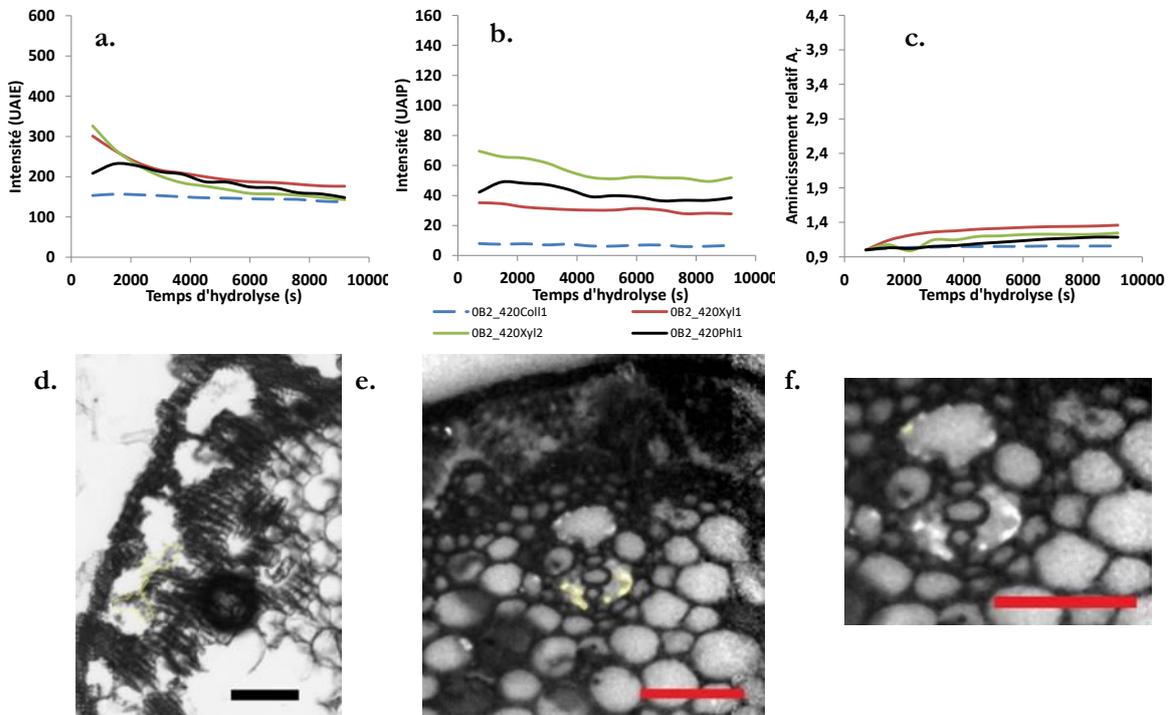


Figure 159 : a, b, c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de collenchyme, parenchyme xylémien, et phloème, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Collenchyme en coupe transversale, imagé en transmission ; e : Parenchyme xylémien en coupe transversale avec sa délimitation utilisée. Barre d'échelle : 100 μm

La Figure 160 montre la relation liant l'amincissement relatif du tissu avec le cumul ΣI_{dynam} des enzymes productives. Le collenchyme semble être le tissu pour lequel l'amincissement est le plus modéré, et également le tissu pour lequel les enzymes actives sont les moins présentes. Par ailleurs, pour le parenchyme xylémien et le phloème, la majorité de la dégradation a visiblement eu lieu avant le premier temps de mesure. De ce fait, on sous-estime très probablement la valeur de l'amincissement relatif réel. Donner la valeur de la pente liant A_r à ΣI_{dynam} ne serait donc pas informatif.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

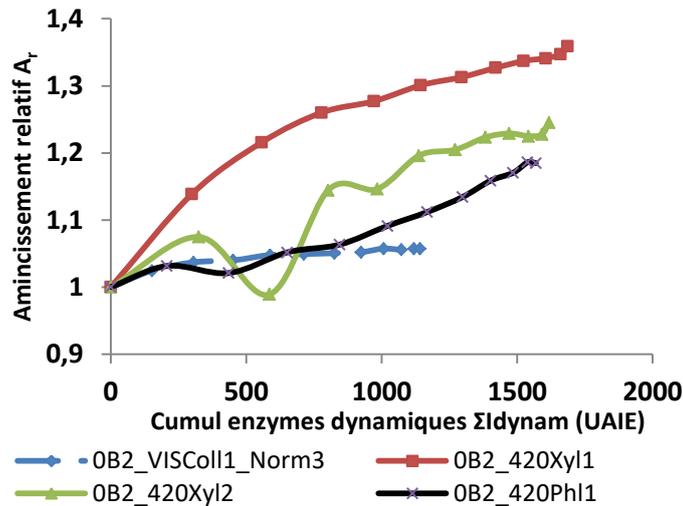


Figure 160 : Aminçissement relatif A_r en fonction du cumul le cumul ΣI_{dynam} des enzymes productives, pour le collenchyme, parenchyme le xylémien, et le phloème

ii Comparaison de la digestibilité des différents tissus présents dans l'échantillon faiblement prétraité

On montre en Figure 161 les graphiques d'intérêts (fluorescence d'enzyme et aminçissement relatif en fonction du cumul enzymatique ΣI_{dynam}), pour les profils moyens des tissus les plus présents, à savoir : le parenchyme lignifié, le sclérenchyme, le parenchyme non lignifié, et les épidermes. Les valeurs de ΣI_{dynam} ont été déterminées à partir des profils de fluorescence moyens de chaque tissu.

Les différents tissus présentent de forts contrastes en termes d'affinité enzymatique, d'aminçissement relatif (A_r) au cours du temps, et d'aminçissement rapporté à l'adsorption d'enzymes productive (i.e. la pente liant A_r à ΣI_{dynam}). Pour pouvoir comparer la digestibilité des tissus entre eux, on s'appuie notamment sur l'aminçissement relatif A_r provoqué pour un travail donné par les enzymes productives, c'est-à-dire la pente liant A_r à ΣI_{dynam} :

Les parenchymes non lignifiés sont ceux qui présentent les pentes les plus fortes (moyenne à $5,8 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹), suivis par les épidermes de feuilles ($1,6 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹), et enfin les tissus indigestes (épiderme de tige, parenchyme, et sclérenchyme) pour lesquels la pente est nulle. Pour ce qui est des tissus minoritaires, la digestion significative du phloème et du parenchyme xylémien dès la première acquisition, laisse penser que la pente réelle serait de l'ordre de celles des parenchymes non lignifiés (ou même plus élevée, vu l'avancée de la digestion).

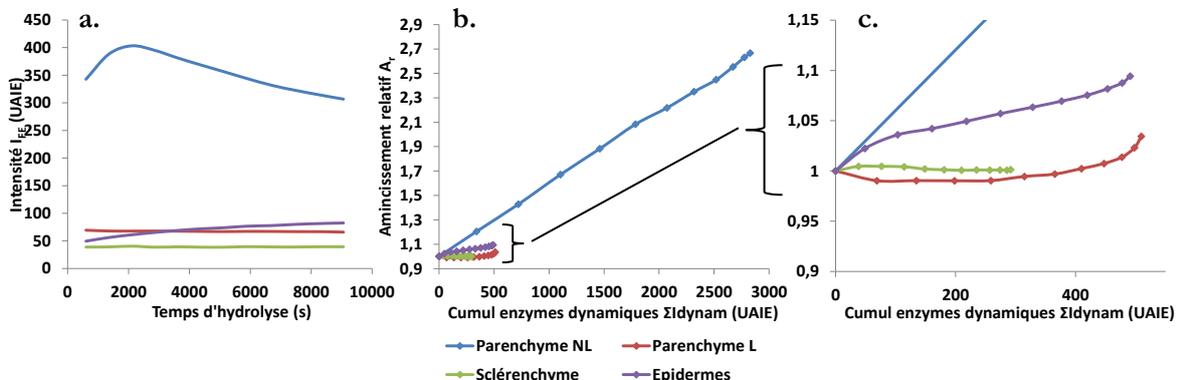


Figure 161 : a et b : Profils temporels moyens de parenchymes non lignifiés (bleu), parenchyme lignifié (rouge), sclérenchyme (vert), et des épidermes, en fluorescence d'enzyme (a) et d'aminçissement relatif en fonction du cumul des enzymes productives ΣI_{dynam} (b et c)

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Les caractéristiques extraites à partir des mesures précédentes sont résumées dans le Tableau 29. Ce classement est en accord avec la littérature [24,51,70,239,273], à savoir que le parenchyme lignifié et le sclérenchyme sont connus pour être récalcitrants, comparativement aux parenchyms lignifiés ou au phloème qui sont plus aisément hydrolysés.

Excepté le cas des épidermes, la récalcitrance des tissus est directement en lien avec la présence couplée de lignine et d'hémicelluloses dans un tissu. Ces tissus (parenchyme lignifié et sclérenchyme donc) sont les plus présents dans la paille de blé. Il est donc crucial de rendre accessible la cellulose qui y est présente, grâce à des prétraitements un peu plus intenses par exemple, qui hydrolysent les hémicelluloses et forcent la migration et le regroupement de la lignine en zones riches et spatialement distinctes des zones cellulosiques qui sont restées à leur place dans la paroi secondaire.

La fluorescence des parois observée pour un épiderme de feuille digeste, et la non digestibilité observée des épidermes de tiges non fluorescents, tendent à montrer ici que la présence ou l'absence des composés fluorescents n'est pas nécessairement le paramètre clefs qui explique le degré de récalcitrance d'un tissu. Par la suite, et à sévérité plus élevée, l'absence de fluorescence de paroi constatée y compris sur des échantillons lignifiés restés non digestes même après prétraitement confirme cette thèse.

Tableau 29 : Caractéristiques des différents tissus en termes de digestibilité et de fluorescence de paroi

	Digestibilité	Fluorescence de paroi
Parenchyme lignifié	Aucune à très faible	Forte : 45 à 130 UAIP
Sclérenchyme	Aucune	Assez forte : 55 à 110 UAIP
Epiderme de tige	Aucune	Très faible : 1 à 15 UAIP
Epiderme de feuille 1	Intermédiaire	Très faible : 5 à 15 UAIP
Epiderme de feuille 2	Intermédiaire	Intermédiaire : 35 à 65 UAIP
Collenchyme	Intermédiaire	Très faible : ~ 8 UAIP
Parenchyme xylémien	Excellente	Intermédiaire : 30 à 70 UAIP
Phloème	Excellente	Intermédiaire : ~40 UAIP
Parenchyms non lignifiés	Bonne à excellente	Très faible : 0 à 35 UAIP

En résumé, seuls **les tissus non lignifiés sont digérés, et tous les tissus lignifiés restent intacts**. Les épidermes qui représentent une part négligeable de la biomasse, présentent une digestibilité intermédiaire. De ce fait, le rendement en glucose mesuré à cette faible sévérité de prétraitement ne serait fonction que de la proportion que représentent ces tissus non lignifiés. C'est d'ailleurs ce que confirme une étude secondaire présentée en Annexe 6, qui a permis d'estimer la proportion que représente ces tissus non lignifiés dans la paille de blé, à partir d'analyses d'images d'une coupe transversale de paille de blé avant et après hydrolyse enzymatique, pour laquelle seuls les tissus non lignifiés ont été hydrolysés.

j. L'analyse des substrats prétraités à plus forte sévérité

On considère maintenant les échantillons C020C et D020C en reprenant la même trame analytique que pour le premier échantillon. Ces échantillons ont subi une température de prétraitement plus élevée (140 °C pour l'échantillon C020C et 160 °C pour l'échantillon D020C). L'état des tissus est plus altéré, et on retrouve en moins grand nombre les tissus digestes qui ont été dispersés et possiblement partiellement hydrolysés. Les tissus minoritaires ne sont plus rencontrés, et ne font donc plus l'objet de mesures.

i Les profils d'adsorption spécifiques des tissus considérés

Peu d'informations peuvent être récupérées à partir de l'observation visuelle des images mosaïques, c'est pourquoi on s'intéresse de nouveau à une quantification de profils d'intensité pour des objets sélectionnés. Dans cette partie, et pour plus de clarté, seuls les résultats obtenus sur les tissus prépondérants seront

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

reportés, à savoir le parenchyme lignifié, le sclérenchyme et les zones déstructurées. Les résultats obtenus sur les tissus minoritaires sont reportés en Annexe 7.

Le canal de la fluorescence des parois étant quasiment à 0 suite à l'altération des acides hydroxycinnamiques par le prétraitement, ce canal ne sera pas reporté. Les échelles utilisées pour représenter les profils sont les mêmes pour les différents tissus.

Le parenchyme lignifié

Les parenchymes lignifiés sont constitués de **zones assez hétérogènes en termes d'affinité enzymatique** : sur un même parenchyme, dans le canal de la fluorescence des enzymes, certaines zones sont quasiment noires et donc sans enzymes adsorbées, et d'autres sont plus claires, indiquant une présence d'enzymes localisées. Il en est de même pour les sclérenchymes. Une illustration de ce phénomène est présentée pour ces deux tissus sur la Figure 162.

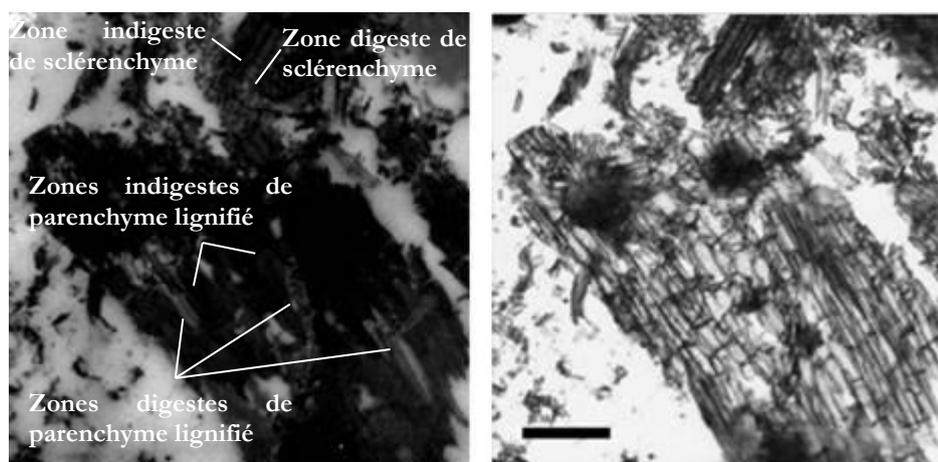


Figure 162 : Exemples d'hétérogénéités en termes d'affinité enzymatique, sur des fragments de parenchyme lignifié et de sclérenchyme, vues sur l'échantillon D020C. Observation en fluorescence d'enzymes (gauche) et en transmission (droite). Barre d'échelle : 200 μm

Ainsi plutôt que de considérer des particules entières de parenchyme lignifié ce qui moyennerait un comportement, des mesures locales ont été réalisées en sélectionnant des régions en fonction des différences d'affinité trouvées. Ces disparités se remarquent bien sur la Figure 163a et b, où plusieurs profils assez distincts sont différenciés, de même que dans la représentation des amincissements relatifs A_r en fonction du cumul enzymatique ΣI_{dynam} (Figure 163c). La pente liant A_r à ΣI_{dynam} varie entre $9,4 \cdot 10^{-5}$ et $9,8 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

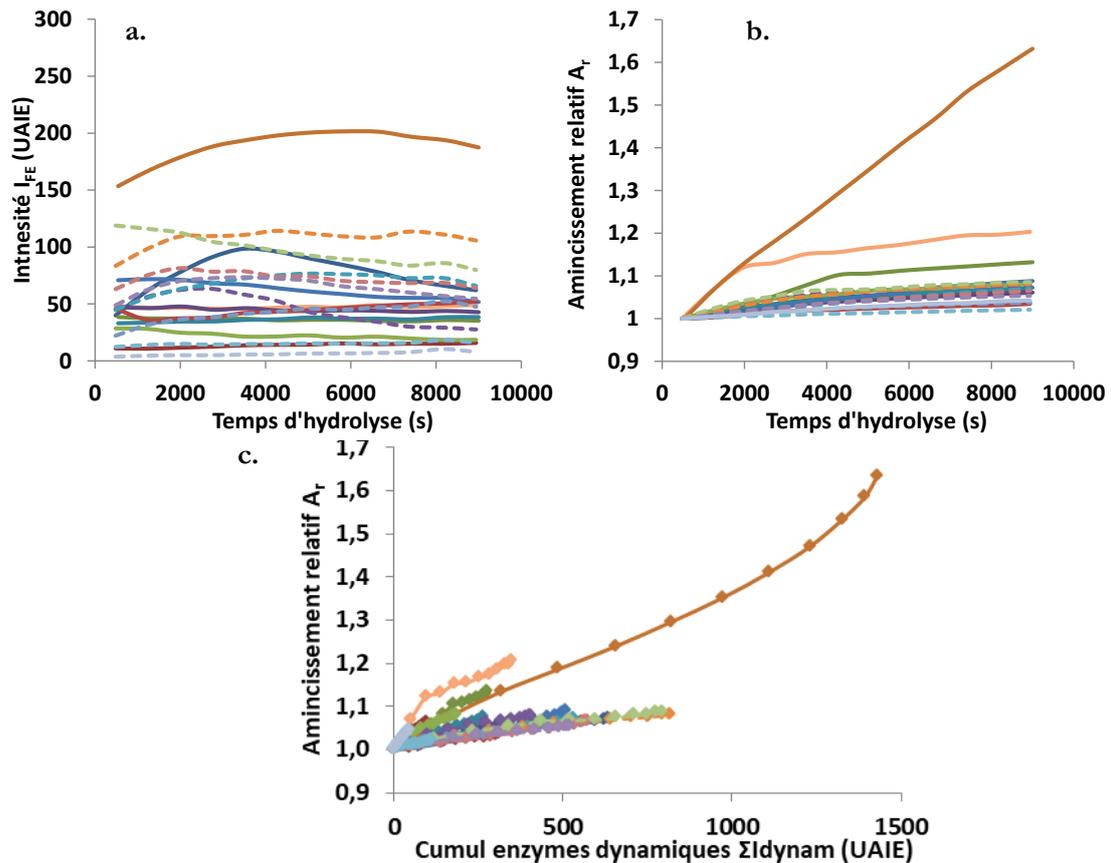


Figure 163 : a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents fragments de parenchyme lignifié observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et amincissement en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des amincissements relatifs en fonction des sommes ΣI_{dynam} pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments de parenchyme lignifié de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des t_i , compris entre t_1 et t_{12}

Sclérenchyme

A ces sévérités de prétraitement, le **sclérenchyme présente visiblement une affinité enzymatique faible mais hétérogène comme chez le parenchyme lignifié, contrairement à l'échantillon produit à faible sévérité**. En effet, un grand nombre de profils d'intensité de fluorescence (Figure 164a) sont autour de 10-30 UAIE, mais plusieurs autres profils sont au-dessus, et atteignent même 100 UAIE. Pour quelques-unes des mesures, on constate même la présence d'une légère phase d'adsorption suivie d'une légère phase de désorption. L'amincissement reste faible mais réel pour un certain nombre de mesures, à en juger par la Figure 164b. La Figure 164c qui montre l'amincissement relatif en fonction du cumul des enzymes productives, confirme que pour certaines zones de sclérenchymes, le tissu est dégradé : on observe à la fois un amincissement et une adsorption-désorption dynamique des enzymes. La pente liant A_r à ΣI_{dynam} varie de 0 à $4,9 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

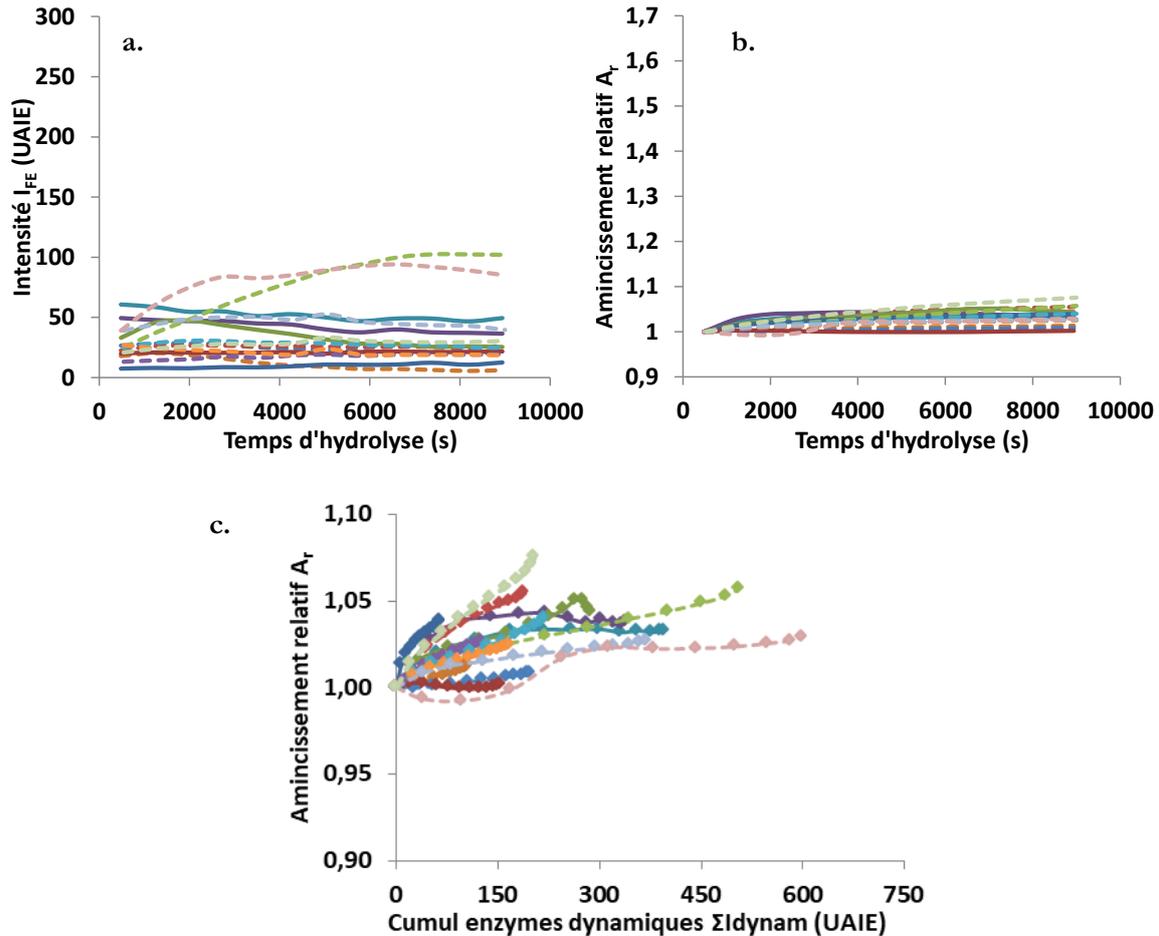


Figure 164 : a. et b. : Profils temporels d'intensité de différents fragments de sclérenchyme observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et en amincissement relatif (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, les tirets concernent l'échantillon D020C ; c : Evolutions de l'amincissement relatif A_r en fonction de ΣI_{dynam} pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments de sclérenchyme de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des t_i , compris entre t_1 et t_{12}

Les zones déstructurées/non identifiées

Sur ces échantillons prétraités à 140 °C et 160 °C, des particules non identifiables en l'état sont présentes. Dans le cas de l'échantillon D020C, certaines de ces zones sont même totalement dépourvues de structures cellulaires (voir en préambule de l'étude, la Figure 141). Ces zones non définies pouvant représenter une proportion significative des échantillons observables sur les mosaïques, il paraissait intéressant de les étudier, en dépit de l'impossibilité de les rattacher à des tissus clairement identifiés.

D'après les profils en fluorescence d'enzymes et en transmission présentés sur la Figure 165, les enzymes s'adsorbent significativement (intensité de fluorescence 50 et 275 UAIE) et l'amincissement des tissus est observé (entre 1 et 1,3). Ces profils ont été mesurés non pas localement mais en moyennant toute la zone déstructurée considérée (voir Figure 165d). En se basant sur l'évolution de l'amincissement relatif A_r en fonction du cumul ΣI_{dynam} des enzymes productives, on constate que les comportements des différentes zones mesurées sont relativement homogènes, tout du moins au niveau de la pente, qui est comprise entre $7,6 \cdot 10^{-5}$ et $1,6 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹, qui lie l'amincissement en fonction de la présence dynamique des enzymes, ce qui laisse penser que ces particules non identifiées sont relativement homogènes en termes de physicochimie à cette échelle. Ces particules possèdent donc une digestibilité certaine.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

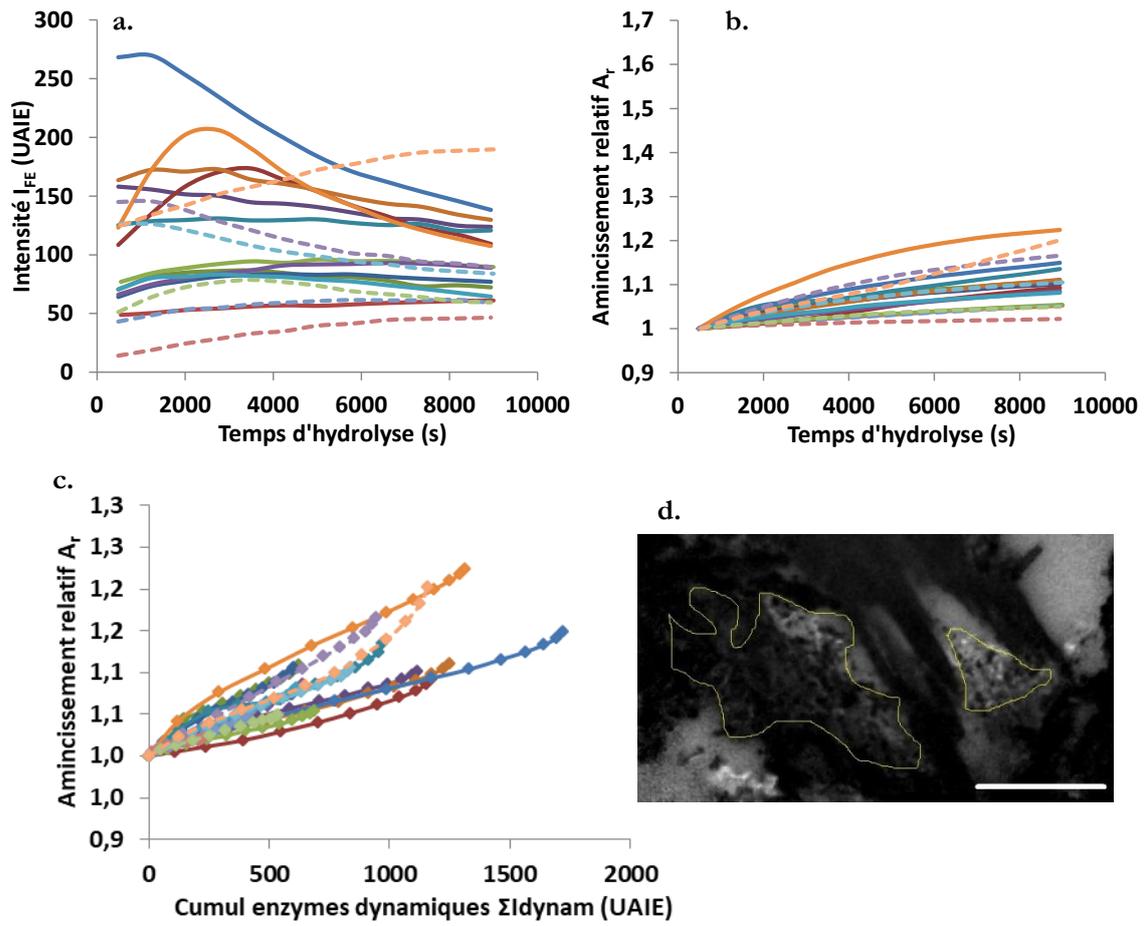


Figure 165 : a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité en des zones non identifiées, en fluorescence d'enzyme (a) et en image en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des amincissements relatifs A_r en fonction des sommes ΣI_{dynam} pour l'ensemble des mesures faites sur des zones non identifiées de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des t_i , compris entre t_1 et t_{12} ; d. : Exemple de zones déstructurée, ici chez l'échantillon D020C, observée en fluorescence d'enzyme. Barre d'échelle : 100 μm

A l'échelle de la dizaine de microns, ces particules sont assez hétérogènes pour ce qui est de l'adsorption des enzymes, comme on le voit sur la Figure 166.

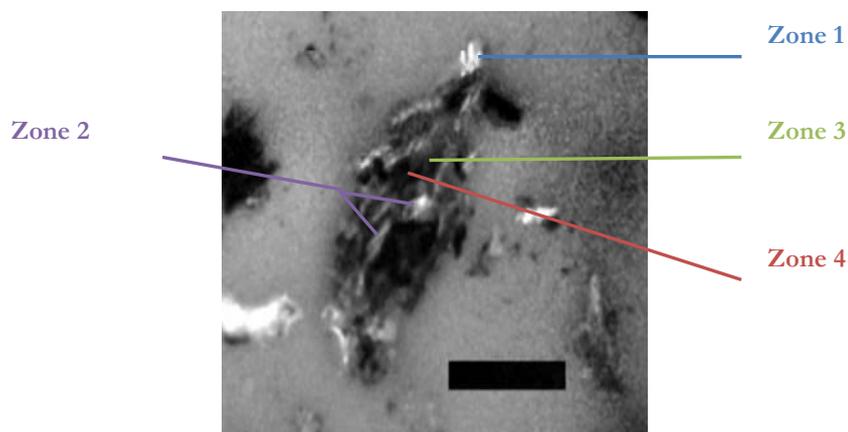


Figure 166 : Image en fluorescence d'enzyme de la particule étudiée en plusieurs zones. Barre d'échelle : 100 μm

Cette hétérogénéité est soulignée sur la Figure 167 au niveau des profils d'intensité obtenus en différentes zones. Les 4 zones définies se distinguent par des affinités enzymatiques très contrastées en intensité, et

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

dans le temps. De plus, il est intéressant de constater sur la Figure 167c que l'efficacité de conversion semble plus grande lorsque l'affinité enzymatique est faible.

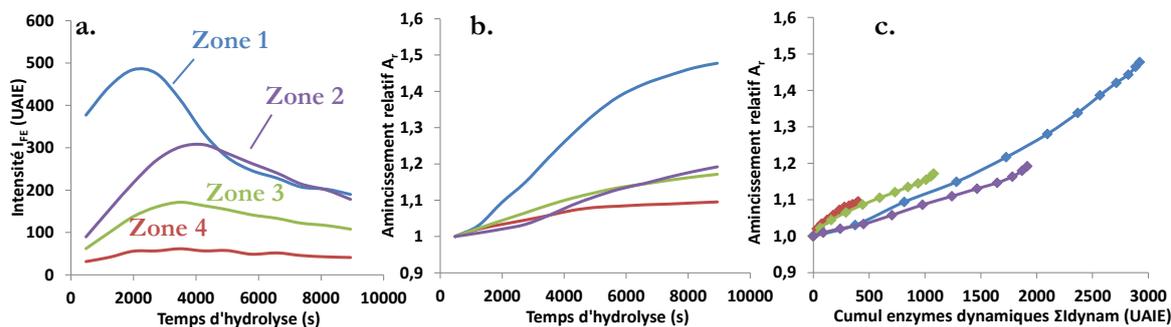


Figure 167 a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité d'une des zones non identifiées, en fluorescence d'enzyme (a) et en image en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des aminoissements relatifs en fonction des sommes ΣI_{dynam} pour l'ensemble des mesures faites et pour l'ensemble des t_b , compris entre t_1 et t_{12}

k. Discussion : digestibilité des tissus, dépendamment des conditions de prétraitement

Nous avons vu précédemment que les tissus avaient des comportements différents vis-à-vis de l'adsorption/désorption des enzymes et de leur dégradation enzymatique, dépendamment de leur nature et de leur chimie. Il convient de s'intéresser maintenant à l'influence des conditions opératoires de prétraitement sur le comportement de ces tissus.

Les profils moyens d'intensité de fluorescence d'enzymes et d'amincissement relatif sont représentés sur la Figure 168 pour chaque type de tissus et pour les trois échantillons A020C, C020C et D020C. Ces profils ont été calculés en réalisant la moyenne des mesures sur un même type de tissu, pour chaque échantillon. Ces données permettent ainsi de comparer l'évolution moyenne de l'adsorption/désorption des enzymes et la dégradation dépendamment du tissu considéré et des conditions opératoires de prétraitement.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

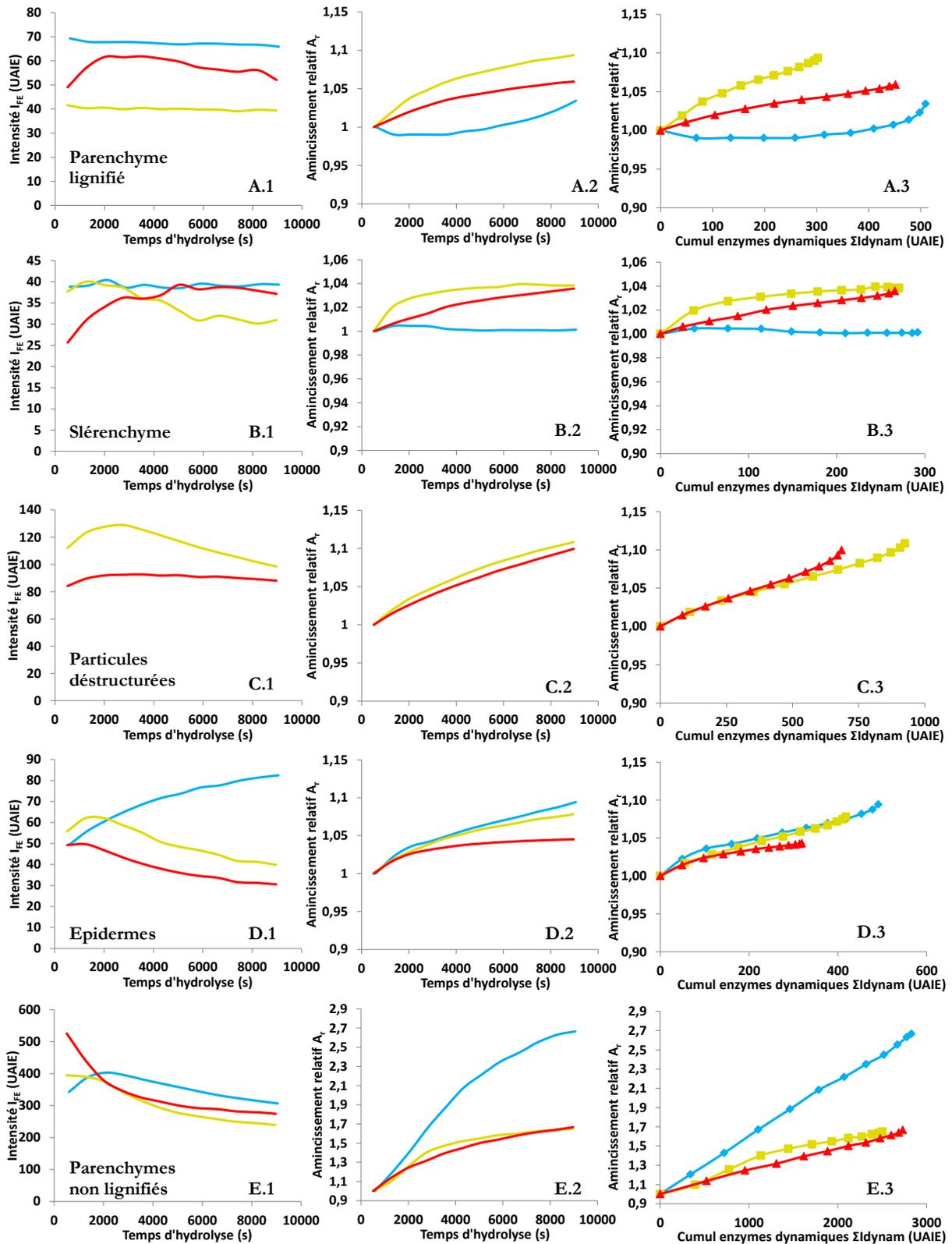


Figure 168 : A gauche : profils d'intensité de fluorescence d'enzyme moyenne (1), d'aminçissement relatif (2), et évolution de l'aminçissement relatif en fonction du cumul des enzymes participant à l'hydrolyse (3), pour le parenchyme lignifié (A), le sclérenchyme (B), les particules déstructurées/ indéfinies (C), les épidermes (D), et les parenchymes non lignifiés (E). Le courbes relatives à l'échantillon A020C sont représentées en bleu, celles relatives à l'échantillon C020C en jaune, et celles relatives à l'échantillon D020C en rouge

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

i Effet du prétraitement sur la présence des tissus

L'augmentation de la sévérité du prétraitement a un effet sur les tissus présents dans l'échantillon après prétraitement. En effet, les tissus cellulosiques (phloème, parenchymes non lignifiés) semblent de moins en moins abondants à mesure que la sévérité augmente, soit par hydrolyse partielle de ces tissus, soit par une dispersion plus fine qui les rend moins visibles. Nous avons pu constater que ces tissus cellulosiques sont très réactifs et sont hydrolysés aisément.

Par ailleurs, les prétraitements associés aux échantillons C020C et D020C ont aussi eu pour effet de rendre certaines zones non identifiables, sans structure cellulaire apparente. Ces zones sont très présentes et hétérogènes spatialement : certaines zones sont probablement ligneuses, sont très peu digestes, et d'autres au contraire sont extrêmement digestes (tant par l'affinité enzymatique que l'amincissement de ces zones au cours du temps observés sur les Figure 168 C1, C2 et C3) et plus transparentes, comme le serait un parenchyme non lignifié.

ii Effet du prétraitement sur la digestibilité moyenne des différents tissus

En ce qui concerne la digestibilité des différents tissus, les résultats trouvés sont conformes à ceux trouvés dans la littérature [24,51,70,239,274]. Ainsi on confirme que les tissus les plus ligneux sont également les moins digestes : sclérenchyme, parenchyme lignifié. A l'inverse les tissus cellulosiques sont les plus digestes : tous les parenchymes non lignifiés.

Ces tendances restent globalement valables quel que soit le prétraitement effectué (voir Figure 169). Les différences de digestibilités sont directement en lien avec les affinités enzymatiques (niveau d'intensité de fluorescence des enzymes similaires) qui dépendent de l'état de lignification du tissu, qui découle directement de la nature du tissu et de la température de prétraitement.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

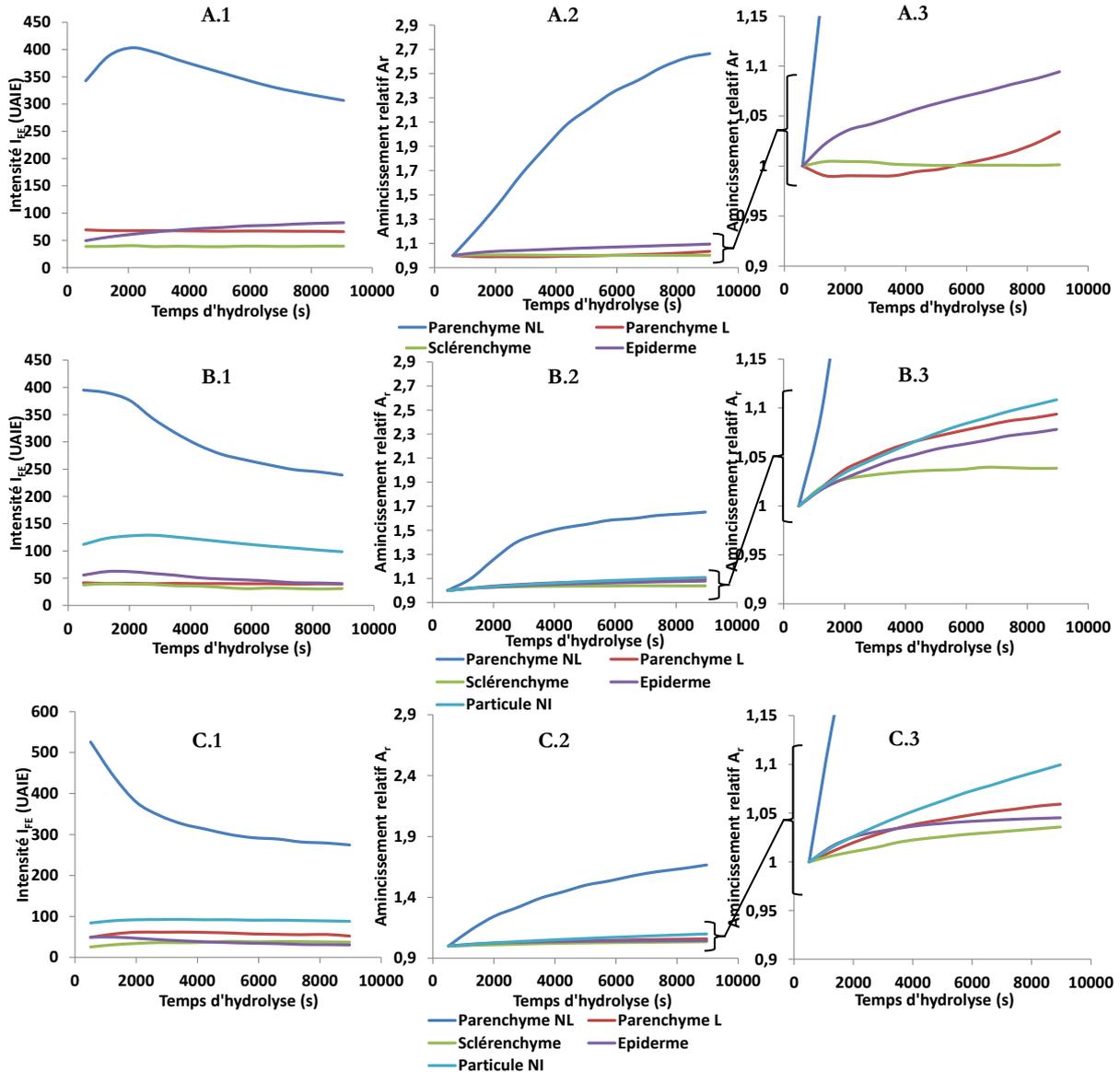


Figure 169 : Intensité de fluorescence d'enzyme (1) et aminicissement relatif (2 et 3) pour les différents échantillons (A020C : A ; C020C : B ; et D020C : C), en fonction du temps, et pour tous les types de tissus

iii Effet du prétraitement sur le taux d'hydrolyse des différents tissus

Les conditions de prétraitement semblent avoir une influence sur l'adsorption/désorption des enzymes sur les tissus, ainsi que sur l'ampleur de la dégradation des tissus

La comparaison des aminicissements relatifs mesurés sur les tissus peu digests tels que le parenchyme lignifié et le sclérenchyme souligne une dégradation plus avancée des tissus en fin d'hydrolyse pour les échantillons prétraités à 140 et 160 °C (voir les Figure 168 A2, B2). Cependant, ce gain n'est pas homogène sur l'ensemble du tissu : parfois significatif avec une cinétique d'adsorption-désorption d'enzymes couplée à un aminicissement, d'autres fois une affinité quasi-nulle sur toute la durée des expérimentations, et sans digestion observable.

L'amélioration de la digestibilité avec l'augmentation de la sévérité du prétraitement se retrouve aussi sur les tissus plus digests (voir les Figure 168 D1 et E1) pour lesquels la dégradation semble commencer avant même la première acquisition pour les échantillons C020C et D020C, dès l'introduction des enzymes, comme cela peut être observé sur les profils d'intensité de fluorescence d'enzymes Figure 168 D1 et E1. De plus, l'affinité enzymatique est aussi améliorée comme l'indiquent les intensités de

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

fluorescence d'enzymes mesurées sur les parenchymes non lignifiés, distribuées entre 100 et 600 UAIE pour l'échantillon A020C et entre 200 et 830 UAIE pour les échantillons C020C et D020C.

iv Effet du prétraitement sur la cinétique d'hydrolyse des différents tissus

Les évolutions relatives des intensités de fluorescence d'enzymes obtenues sur les différents types de tissus pour chaque échantillon sont reportées sur la Figure 172. Ces profils ont été présentés précédemment sur la Figure 168 mais cette nouvelle figure permet d'illustrer le temps pour lequel on observe le maximum de d'adsorption.

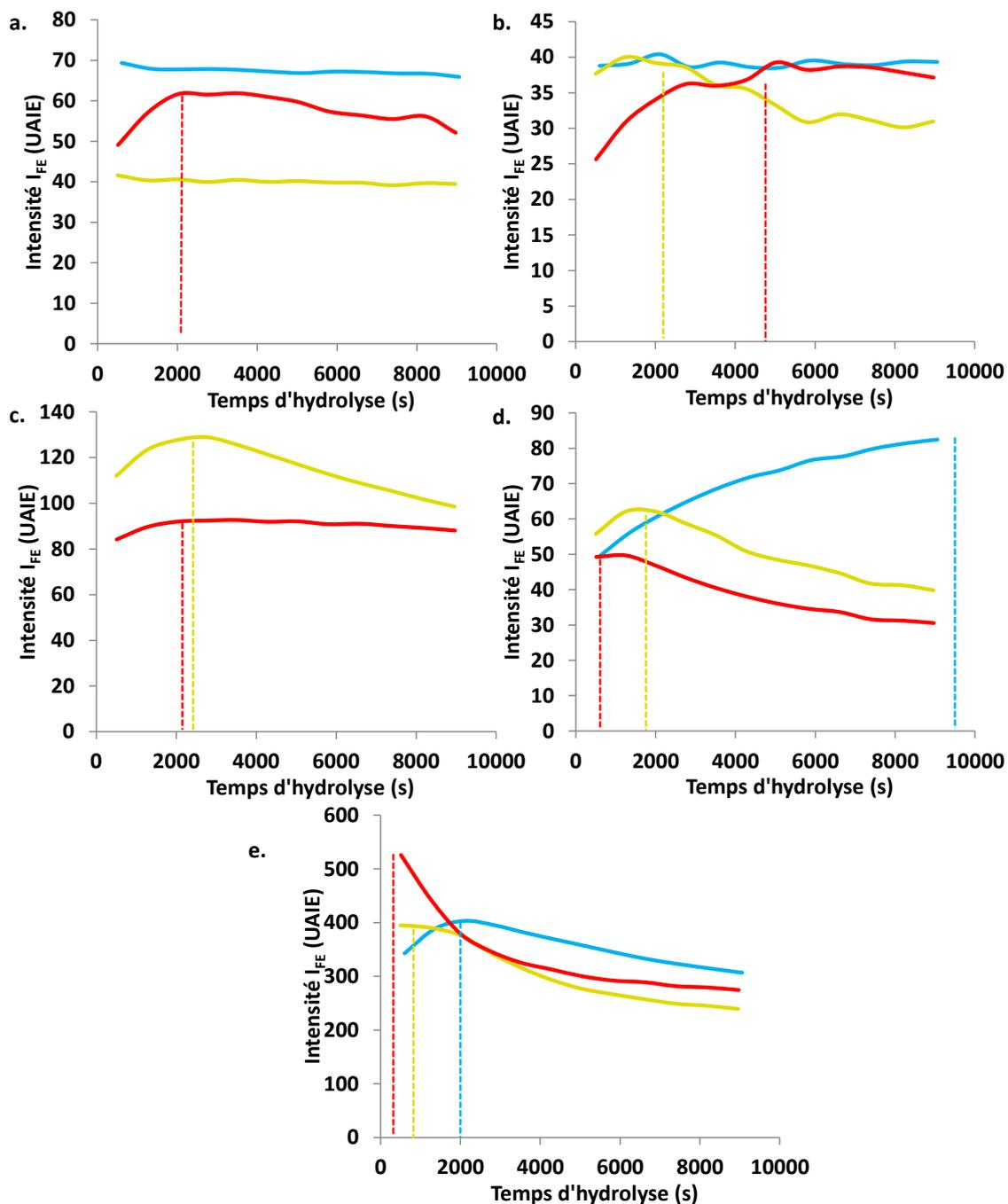


Figure 170 : Profils temporels moyens d'intensité de fluorescence d'enzymes des tissus trois échantillons de l'étude (A020C, bleu, C020C, jaune, D020C, rouge) : parenchyme lignifié (a), sclerenchyma (b), particules déstructurées/non identifiées (c), épidermes (d), et parenchymes non lignifiés (e)

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Il apparaît que le **principal effet du prétraitement**, outre le fait d'améliorer légèrement l'affinité enzymatique et le taux de conversion des tissus, **est d'accélérer la cinétique d'hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire la dynamique d'adsorption-désorption des enzymes**. En effet, le maximum d'intensité de fluorescence, marquant la fin de l'étape d'adsorption et le début de la phase de désorption des enzymes, semble se décaler la plupart du temps en fonction des conditions de prétraitement : plus la température de prétraitement augmente, plus ce maximum d'adsorption se décale vers les temps courts d'hydrolyse. C'est particulièrement le cas entre l'échantillon traité à 100 °C (échantillon A020C), comparativement aux échantillons traités à 140 et 160 °C (C020C et D020C) :

- Pour le parenchyme lignifié, le maximum d'adsorption a lieu vers 35 min chez l'échantillon D020C, alors qu'il n'a pas lieu (car adsorption totalement non productive et donc statique) chez l'échantillon A020C
- Pour le sclérenchyme, le cas est similaire : le maximum d'adsorption a lieu à 35 et 85 min pour les échantillons C020C et D020C, alors que le profil est parfaitement statique pour l'échantillon A020C
- Pour les épidermes, le maximum d'adsorption a lieu vers la 8^{ème} minute pour l'échantillon D020C et vers 35 min pour l'échantillon C020C, alors que chez l'échantillon A020C, ce maximum a lieu vers 2h40, à la toute fin de l'expérimentation
- Pour les parenchymes non lignifiés, le maximum d'adsorption a lieu avant la première acquisition (8 min 30 s) pour l'échantillon D020C, vers 15 min pour l'échantillon C020C, et vers 35 min pour l'échantillon A020C

v Création d'hétérogénéités locales

La simple considération des profils moyens de fluorescence et d'amincissement n'est pas pleinement satisfaisante par le fait que certains tissus (sclérenchyme et parenchymes) et particules déstructurées, présentent des hétérogénéités spatiales. L'observation des profils individuels des tissus lignifiés que sont le parenchyme lignifié ou le sclérenchyme ont permis de constater que l'augmentation de la sévérité de prétraitement semble créer :

- des zones qui deviennent partiellement digests et pour lesquelles une réelle phase d'adsorption puis de désorption est observée par la même occasion. Ce sont ces zones qui s'amincissent le plus, c'est-à-dire qui sont le plus dégradées (voir Figure 163). Ceci n'est pas observé pour les tissus lignifiés de l'échantillon A020C.
- des zones qui n'ont pas gagné en affinité enzymatique, et ne présentent pas de dégradation significative au cours du temps. Pour ces zones, le niveau de fluorescence de ces zones est même plus faible que dans le cas de l'échantillon moins prétraité. Dans le cas du parenchyme lignifié, les valeurs des intensités statiques de fluorescence d'enzymes (relatives aux enzymes non productives) varient entre 30 et 100 UAIE pour l'échantillon A020C, entre 3 et 50 UAIE pour les parenchymes lignifiés restés indigestes des échantillons C020C et D020C. Dans le cas du sclérenchyme, elles passent de 30-45 UAIE (constante au cours du temps) pour l'échantillon A020C, à 5-60 UAIE (constante au cours du temps), pour les échantillons C020C et D020C. Il semble donc qu'en moyenne, l'augmentation de la température de prétraitement permet de diminuer la quantité d'enzymes adsorbées sur des zones non digests (notamment les zones restées ligneuses), ce qui peut expliquer pourquoi les niveaux d'intensité des fonds d'enzymes (milieu réactionnel sans particule) sont plus élevés pour l'échantillon D020C (paragraphe VII.g.iii).

vi Conclusion

Ainsi, loin d'avoir gommé les différences de digestibilité entre les différents tissus, les prétraitements à 140 et 160 °C ont créé des hétérogénéités de digestibilité au sein de tissus. En effet, pour les quelques tissus non lignifiés retrouvés, les prétraitements à température plus élevée (140 et 160 °C) rendent la cellulose encore plus accessible (forte phase d'adsorption, et augmentation de la pente liant A_r à ΣI_{dynam}),

et pour les tissus lignifiés, une partie semble rendue digeste (ou partiellement digeste), alors qu'une autre partie semble avoir complètement préservé son caractère indigeste. Par ailleurs, sur les tissus lignifiés, la part d'enzymes adsorbées de manière non productive semble réduite par un prétraitement plus intense. De plus, l'augmentation de la sévérité du prétraitement a pour effet d'améliorer la cinétique d'hydrolyse, ou tout du moins la cinétique d'adsorption/désorption d'enzymes.

1. Mode d'adsorption des enzymes sur les particules digestes

Dans le cas idéal d'une particule homogène et digeste, il est possible d'étudier plus localement le mode d'adsorption des enzymes et la dégradation de la particule afin de mieux appréhender ces phénomènes. Pour cela, des mesures ont été réalisées sur différents fragments de parenchymes non lignifiés des échantillons A020C, C020C et D020C.

Des images obtenues dans le canal de fluorescence d'enzymes d'une particule digeste de l'échantillon A020C est présenté sur la Figure 171 pour des temps d'hydrolyse de 25 min et 75 min. On remarque que l'adsorption des enzymes ne se fait pas de manière homogène spatialement : les enzymes s'adsorbent en premier lieu sur les contours de la particule. Seulement après, l'adsorption se poursuit jusqu'au centre de la particule (là où l'épaisseur devient plus significative), alors qu'au niveau des extrémités des particules, les enzymes commencent déjà à se désorber de la surface. Au cours du temps, la particule semble être "attaquée" par les enzymes depuis ses extrémités, et ensuite les enzymes se propagent vers son centre, où la matrice a moins d'aspérités.

Au cours de la cinétique cet effet disparaît peu à peu jusqu'à atteindre un niveau d'adsorption homogène sur toute la particule.

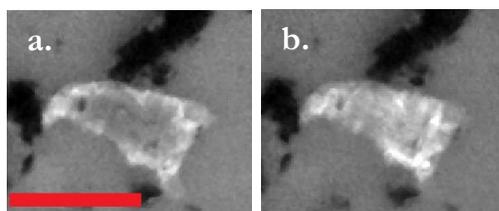


Figure 171 : Particule non lignifiée en fluorescence d'enzyme à 25 min (a) et 75 min (b) montrant l'inversion de contraste se produisant entre le contour et l'intérieur de la particule. : Barre d'échelle : 100 μm

Les profils mesurés au centre de la particule et à son extrémité permettent de quantifier le décalage temporel d'adsorption (Figure 172b). Les maximums d'adsorption ont lieu à $t=50$ min pour l'extérieur du parenchyme, et à $t=90$ min pour l'intérieur, soit un décalage temporel de 40 minutes. De plus, les intensités de fluorescence convergent vers la même valeur en fin d'hydrolyse. Cet effet est donc transitoire et tend à s'estomper au cours du temps.

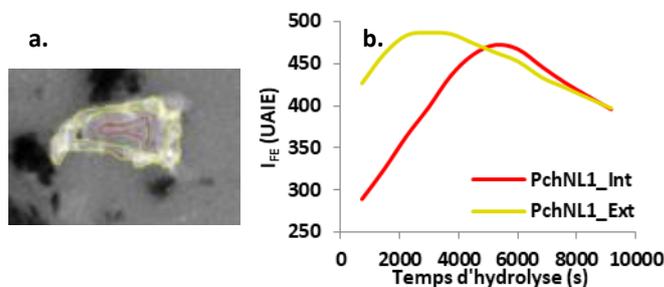


Figure 172 : A gauche, délimitation des zones de mesures de profils temporels de l'intensité de fluorescence d'enzyme à l'extérieur (contour et courbe jaunes) et intérieur (contour et courbe rouges) d'un fragment de parenchyme non lignifié ; à droite, graphique représentant les deux profils temporels obtenus. La courbe rouge est le profil du centre de la particule, la courbe jaune est le profil de l'extérieur de la particule

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

En délimitant un contour rectiligne à mi-chemin entre la particule et le milieu réactionnel (Figure 173a), on peut déterminer que ce gradient temporel d'adsorption d'enzyme s'étend initialement sur 14 μm et tend à s'estomper au cours de l'hydrolyse (Figure 173b). On retrouve cette valeur autour de 10-30 μm pour plusieurs autres mesures effectuées sur d'autres fragments digestes (résultats non présentés). Le décalage temporel d'adsorption varie autour de 10 à 50 min, et semble d'autant plus court que la particule est digeste.

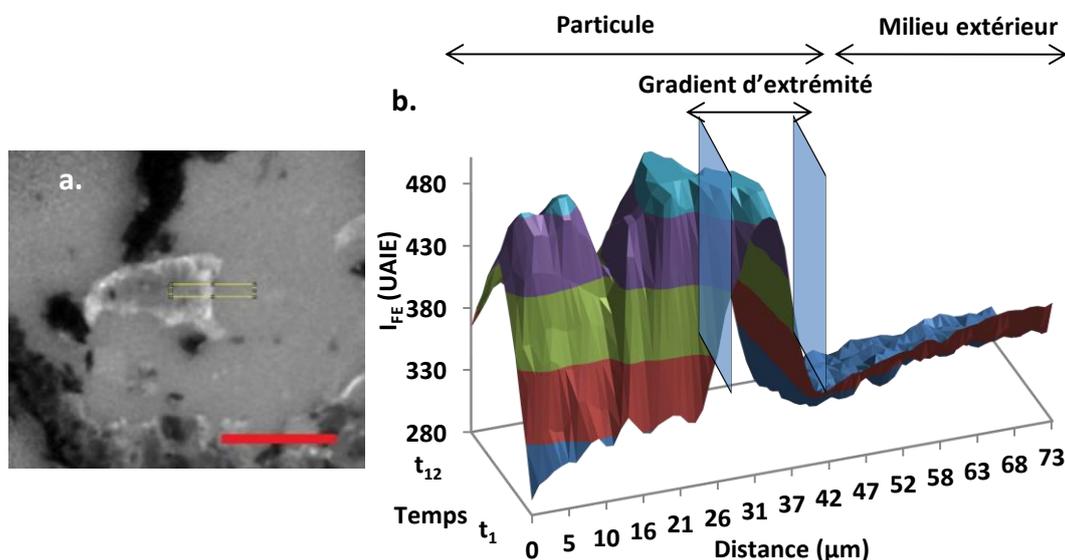


Figure 173 : a. Clicé en fluorescence d'enzyme d'un parenchyme non lignifié au temps initial, présentant un contraste d'adsorption entre le contour de la particule et son centre, avec une délimitation d'un profil rectiligne pour voir l'évolution de ce contraste au cours de l'hydrolyse. Barre d'échelle : 100 μm ; b. Evolution de la fluorescence d'enzyme du profil rectiligne défini, au cours de l'hydrolyse

Les fragments de parenchymes non lignifiés des échantillons C020C et D020C présentent les mêmes types de différences d'adsorption d'enzymes entre leur contour et leur centre. En Figure 174a est donné un exemple sur une particule et pour laquelle un profil de contour et un profil central sont donnés. Le décalage temporel du maximum d'adsorption entre l'extrémité et le centre de la particule est de l'ordre de 20 min. L'épaisseur de la zone extrême sur laquelle l'adsorption préférentielle est de l'ordre 11 μm , d'après le profil rectiligne au premier temps d'acquisition.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

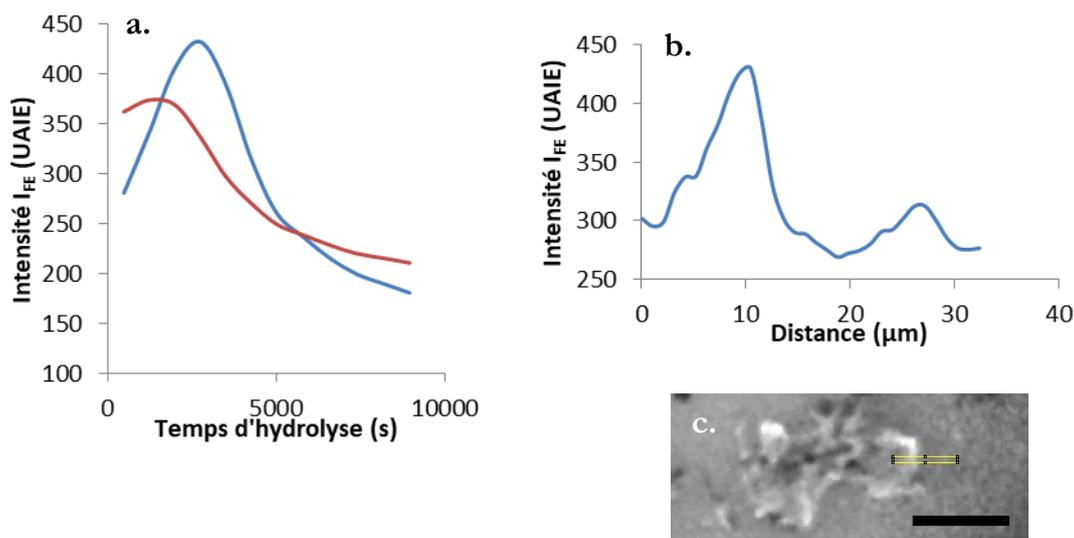


Figure 174 : a. : Profils temporels de fluorescence d'enzyme de l'intérieur (bleu) et de l'extérieur (rouge) de la particule ; b. : Profil spatial rectiligne de fluorescence d'enzyme au premier temps d'acquisition ; c. : image délimitant le profil rectiligne défini. Barre d'échelle : 50 µm

Les contours des particules qui sont des zones de ruptures, de déchirures (issues de l'étape de broyage par exemple), présentent des aspérités (par opposition aux surfaces "natives" des tissus, qui sont lisses), qui constitueraient alors autant des sites propices à l'adsorption des enzymes sur des terminaisons de chaînes cellulosiques rendues accessibles. Une fois ce phénomène d'adsorption aux extrémités commencé et la dégradation des aspérités amorcée, le nombre de sites d'adsorption s'équilibrerait progressivement entre les extrémités qui deviennent graduellement lisses, et les faces des tissus, qui sont lisses dès le départ.

En tout état de cause, on peut penser que cet effet de gradient d'adsorption pourrait induire une variation de la digestibilité entre un tissu digeste non broyé, et ce même tissu finement broyé. Les extrémités étant préférentiellement choisies par les enzymes, le substrat/tissu finement broyé serait plus rapidement digéré. Comme l'étendue de ce gradient se situe aux environs de 10-20 µm, il faudrait probablement un broyage générant des particules d'une taille inférieure ou égale à cette gamme de granulométrie pour observer une augmentation significative de digestibilité attribuable à cet effet-là. Pour rappel, de telles conclusions sont en accord avec des articles de la littérature, dont les résultats indiquent que la diminution de la taille des particules n'a pas d'impact majeur sur la réactivité des substrats (différents des nôtres, certes) dans le cadre d'un broyage grossier (et même la baisse un peu entre 2,5 cm et 500 µm, [88]) mais qu'il existe une gamme en dessous de laquelle la taille de particule a un impact sur la digestibilité des substrats ([79,89] et notamment un seuil vers 30 µm pour l'un de ces travaux [79]).

Les gradients d'adsorption sont observés pour les trois échantillons analysés. La seule différence notable remarquée entre l'échantillon A020C et les échantillons C020C et D020C prétraités à plus haute température, est la diminution du délai observé entre l'adsorption au bord et au cœur de la particule. Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec les précédents résultats qui montraient une amélioration de la cinétique d'adsorption/désorption sur les deux échantillons prétraités C020C et D020C. Ainsi le possible gain de digestibilité occasionné par un affinement de la granulométrie devrait être atténué lorsque le prétraitement est effectué à une sévérité intermédiaire, proche des conditions optimales de prétraitement. Ceci est plutôt cohérent avec les travaux de thèse de Jessica Jane MacAskill [79] qui montre sur substrat de conifère qu'avec un broyage à boulets post-prétraitement, la conversion de la cellulose passe de 25 à environ 47 % à haute sévérité de prétraitement (explosion à la vapeur), alors qu'elle passe d'environ 12 % à 65 % à faible sévérité de prétraitement.

m. Conclusions et perspectives sur les expérimentations DISCO

i La faisabilité technique, mise en œuvre et intérêt

La première conclusion porte sur la faisabilité de l'approche, de même que sur ses possibilités d'amélioration pour d'éventuelles nouvelles expérimentations. Ce type d'expérimentation avait déjà été réalisé sur des coupes transversales de tiges de maïs [239]. Toutefois, dans notre cas, le défi technique était de pouvoir mettre en œuvre une préparation d'échantillon adaptée, une cellule d'observation ainsi qu'un protocole adapté à des échantillons de biomasse lignocellulosiques pulvérulents. En ce sens, les expérimentations ont constitué un vrai succès puisqu'elles ont permis l'étude *in situ* de la dégradation de particules au cours d'une hydrolyse enzymatique, dans des conditions les plus proches possibles de celles employées de manière standard en laboratoire. Toutefois, le protocole pourrait encore être amélioré en optimisant la dilution des enzymes ou encore le pH.

ii Le traitement des données

A travers cette étude, une méthodologie d'analyse de données a été mise en place pour apprécier le comportement des enzymes et la dégradation des tissus dépendamment de la température de prétraitement. Elle intègre des concepts d'amincissement relatif et de travail potentiel des enzymes "utiles" adsorbées de manière dynamique et productive, rendant plus efficace l'analyse comparative. Ceci a permis d'une part de mieux quantifier la digestion effective de la matrice et d'autre part de distinguer les enzymes présentes sur un substrat qui participent ou ne participent pas à la saccharification. Ces dernières sont soit adsorbées de manière non productive, soit libres mais situées derrière la particule en cours de digestion. Dans ce cas, lorsque la particule est suffisamment fine, les enzymes libres peuvent participer à la fluorescence totale mesurée, par transparence partielle de la particule.

L'exploitation de données pourrait probablement encore être poursuivie, par exemple d'un point de vue plus statistique, en raisonnant sur les profils temporels pixel par pixel, sur des zones d'intérêt sans artefacts. Les pixels pourraient alors être classés en fonction de leur profil d'évolution, ce qui permettrait à la fois de réaliser des analyses plus fines et de produire des données plus représentatives et complètes que par l'utilisation de sélections manuelles. Cependant l'analyse chimiométrique ne se prête probablement pas à ces données, notamment car les profils temporels de fluorescence sont intéressants surtout pour les décalages temporels (ou spatiaux) des phases d'adsorption et de désorption, or les décalage de ce type sont mal pris en compte par ACP par exemple.

iii La représentativité des expérimentations

Les différentes avancées permises par ces expérimentations sont à considérer avec précaution compte tenu du fait que les conditions opératoires ne sauraient être représentatives de celles rencontrées à l'échelle industrielle, ou même pour des hydrolyses standards. Les différences majeures qui peuvent mener à des problèmes de représentativité sont :

- l'absence d'agitation et le dimensionnement qui peuvent mener à des phénomènes limitant : la diffusion de l'eau et des enzymes à l'échelle du tissu ou des parois, ou encore l'inhibition locale des cellulases par le glucose et oligomères de glucose,
- la dose d'enzymes utilisée plus élevée, notamment concernant la quantité d'enzymes par rapport à la quantité de substrat,
- Le court temps de saccharification observé.

Une amélioration possible serait de réaliser une hydrolyse enzymatique standard reliée à une cellule d'observation microscopique microfluidique. Ce système permettrait de limiter les incertitudes liées à l'absence d'agitation, le dimensionnement, et les doses d'enzymes. De plus, par la circulation d'une grande quantité d'enzymes non exposées au faisceau, la dénaturation éventuelle des enzymes serait d'autant plus ralentie.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

iv La digestibilité des tissus et positionnement par rapport à la littérature

Concernant la digestibilité des tissus, les résultats trouvés sont conformes à ceux trouvés dans la littérature [24,51,70,239,274]. Les tissus les plus ligneux semblent les moins digestes : sclérenchyme, parenchyme lignifié. A l'inverse les tissus cellulosiques sont les plus digestes comme par exemple les parenchymes non lignifiés. L'épiderme de tige est très récalcitrant alors que les épidermes de feuilles possèdent une certaine digestibilité. Ces différentes tendances observées restent valables quel que soit le prétraitement effectué. Concernant le parenchyme xylémien, le phloème et le collenchyme, il aurait été nécessaire de posséder plus de spécimens et des acquisitions qui débutent véritablement en début d'hydrolyse enzymatique (à l'imprégnation) pour pouvoir donner des conclusions robustes sur ces trois tissus.

v Les effets du prétraitement sur la digestibilité des tissus

En premier lieu, il peut être noté que la fluorescence des parois issue de la lignine et des acides hydroxycinnamiques est visiblement un témoin de la sévérité du prétraitement puisqu'elle est très présente pour l'échantillon A020C produit à 100 °C, très affaiblie pour l'échantillon C020C, et absente pour l'échantillon D020C.

L'augmentation de la sévérité de prétraitement provoque différentes modifications visibles lors du suivi microscopique de la cinétique. Tout d'abord, la reconnaissance des tissus est d'autant plus délicate que la sévérité du prétraitement est élevée, et la proportion relative de chaque tissu/particules est modifiée :

- les tissus cellulosiques semblent de moins en moins abondants à mesure que la sévérité augmente, soit par hydrolyse partielle de ces tissus, soit par une dispersion plus fine qui les rend moins visibles. Ils présentent une affinité enzymatique, une dynamique d'adsorption-désorption et une dégradation d'autant plus forte que la température de prétraitement est élevée.
- Par contre, les prétraitements à 140 °C et 160 °C ont aussi eu pour effet de rendre certaines zones non identifiables, sans structure cellulaire apparente. Ces particules déstructurées sont abondantes et très hétérogènes : certaines zones sont probablement ligneuses (d'après les observations faites en microscopie confocale) et très peu digestes, et d'autres au contraire sont extrêmement digestes.

Ensuite, tous les tissus reconnus (cellulosiques ou ligneux) présentent une dynamique de saccharification (marquée par un amincissement et une phase d'adsorption puis de désorption) d'autant plus accélérée que la sévérité du prétraitement est grande. Pour les tissus lignifiés, le prétraitement à 100 °C ne permet pas de les rendre digestes (seule une faible adsorption statique non productive est mesurée) alors qu'à 140 et 160 °C, ils peuvent présenter une relative digestibilité. Cependant, pour un tissu donné, ce gain en affinité n'est pas homogène sur l'ensemble du tissu : parfois il est significatif, avec une cinétique d'adsorption-désorption d'enzymes couplée à un amincissement, et parfois il est quasi-nul sur toute la durée des expérimentations, et sans digestion observable. Toujours pour les tissus lignifiés, les zones qui ont perdu leur récalcitrance présentent une phase d'adsorption et de désorption qui est visible même si l'intensité absolue de fluorescence d'enzyme est assez faible, ce qui montre l'importance de ce régime dynamique dans la conversion de la cellulose, quelle que soit l'intensité absolue de l'adsorption des enzymes.

vi Les modes d'action des enzymes

La digestion des particules se fait dans le sens de l'épaisseur de la paroi, et non dans le sens de la longueur, ce qui est plutôt logique car l'adsorption se réalise en surface (ou en volume dans le cas des échantillons prétraités suffisamment), et la surface développée par l'épaisseur des parois est négligeable par rapport à la surface développée par la longueur et le diamètre de la cellule. En conséquence, l'hydrolyse s'observe ainsi de manière moins prononcée en coupe longitudinale (cas de la plupart des particules trouvées) qu'en coupe transversale (brin de paille complet par exemple).

A faible sévérité de prétraitement, les enzymes s'adsorbent sur tous les tissus et dès le début de l'hydrolyse. En revanche, la quantité d'enzymes va rester faible et constante pour les tissus non digestes,

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

alors qu'elle sera importante pour les tissus digestes. Par ailleurs, le temps pour lequel l'adsorption d'enzymes est maximale est d'autant plus court que les particules sont réactives. A plus forte sévérité de prétraitement, les maxima d'adsorption d'enzymes sont observés à des temps plus courts : en ce sens la cinétique semble être améliorée. De plus, il n'y a pas d'adsorption constante au cours du temps sur les zones non digestes, **ce qui montre qu'à ces sévérités de prétraitement, la lignine n'est plus une source significative d'adsorption non productive.**

Les enzymes adsorbées sur une particule ne participent pas toutes à la conversion de la cellulose : au cours de l'hydrolyse, certaines enzymes se bloquent en surface (que ce soit de manière non productive sur de la lignine ou par blocage purement physique sur de la lignine ou de la cellulose), sans contribuer à la conversion de la cellulose. Ce phénomène étant irréversible, il s'accumule au cours du temps pour les particules partiellement digestes. La part d'enzymes adsorbées de manière fonctionnelle est, elle, directement corrélée à la digestion des particules.

L'efficacité des enzymes qui peut être vue comme la capacité à dégrader un tissu donné compte tenu de la quantité d'enzymes adsorbées de manière fonctionnelle, est dépendante des tissus (les tissus les moins ligneux sont les plus efficacement dégradés), mais aussi de la sévérité de prétraitement. L'augmentation de la température ne permet pas toujours d'augmenter la part d'enzymes productives adsorbées, ni d'accentuer l'amincissement de la paroi. Cependant on suppose que la détermination de ces grandeurs peut être biaisée notamment si l'échantillon est trop rapidement dégradé (auquel cas les observations faites ne sont pas représentatives de la dégradation et des enzymes qui ont participé à la dégradation), ou si au contraire la cinétique d'adsorption est réelle mais très lente. Il semble que c'est plutôt une période réduite d'adsorption et de désorption lorsque la température de prétraitement augmente qui permet de conclure de la plus grande digestibilité des tissus produits par un prétraitement à température élevée.

On constate par ailleurs qu'il existe une adsorption préférentielle plus précoce des enzymes au niveau des extrémités des particules, comparativement aux faces lisses des particules. Cet effet tend à s'estomper au cours de l'hydrolyse, possiblement par la diminution progressive des sites d'adsorption (suite au lissage provoqué à ces endroits par les enzymes) au niveau des aspérités, déchirures, etc.

vii Facteurs gouvernant la digestibilité du matériel cellulosique

Les facteurs qui semblent caractériser une grande digestibilité observée dans le canal en transmission et par l'intermédiaire de l'amincissement relatif, **sont une grande affinité enzymatique, une grande proportion d'enzymes adsorbées de manière productive, et surtout une dynamique d'adsorption-désorption rapide.**

Par les différentes observations faites, on peut dire que **la présence conjointe de lignine et d'hémicelluloses** (cas des parois secondaires S2 lignifiées des sclérenchymes par exemple) **est le principal facteur de récalcitrance.** En effet, les tissus non lignifiés sont parfaitement digestes (forte adsorption, rapide, et efficace), et les tissus lignifiés pour lesquels les hémicelluloses ont été majoritairement retirées (adsorption modeste, plus ou moins rapide, mais efficace). Ceci est cohérent avec le fait que la teneur en lignine n'a pas été retenue au chapitre précédent comme descripteur pertinent de l'hydrolyse enzymatique dans le cadre d'échantillons traités à l'acide dilué. **C'est donc la distribution spatiale de la lignine au niveau des parois, et ses liens avec les hémicelluloses qui sont potentiellement critiques.**

En revanche, **le niveau de fluorescence des parois ne permet pas de présager directement de la digestibilité des tissus** : à faible sévérité, certaines présentent à la fois une fluorescence de paroi et une digestibilité observable (notamment au niveau des stomates où la fluorescence et la digestion sont plus marquées). A l'inverse, on peut trouver à plus forte sévérité des tissus lignifiés qui ont perdu leur fluorescence de paroi et qui sont toujours indigestes. Cette indépendance observée entre la présence de composés phénoliques et la saccharification est en accord avec d'autres travaux réalisés à l'IFPEN pour lesquels l'adjonction de la fraction des espèces phénoliques d'un hydrolysate de prétraitement à un substrat lignocellulosique mis en hydrolyse enzymatique n'a pas d'effet néfaste sur la conversion de la cellulose en glucose, tout du moins aux concentrations rencontrées. En revanche, cette fluorescence de paroi reste un bon indicateur de l'impact du prétraitement sur la nature chimique du substrat.

L'observation d'une adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules (sur une étendue de 10-30 μm), est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle ces zones présentent un grand nombre de sites d'adsorption au niveau des aspérités, zones de rupture/déchirure, qui délimitent les particules. Cet effet s'atténue lorsque les aspérités sont progressivement hydrolysées par les enzymes, et la perte temporaire de surface accessible observée en début de chapitre tend à confirmer cette hypothèse. De cette observation, on peut penser que pour les particules d'une taille de cet ordre de grandeur, la conversion serait considérablement améliorée. Cependant, cet effet étant prépondérant seulement durant les premières heures de la saccharification, il n'est pas certain que cet effet puisse être exploité pour des hydrolyses longues.

D'un point de vue procédé, on souhaite en général obtenir une matrice homogène prétraitée de manière optimale. Or cette situation est par définition impossible, car la matrice de départ n'est pas homogène, et, comme on vient de le voir, le prétraitement à l'acide dilué n'homogénéise pas réellement les propriétés des différents tissus. Pour un prétraitement proche de l'optimum, les tissus cellulosiques seront inutilement prétraités car suffisamment digests à l'état natif, tandis que les tissus partiellement lignifiés seront correctement prétraités (par la délocalisation de la lignine et hydrolyse importante des hémicelluloses, comme dans le cas du parenchyme lignifié), et les tissus les plus indigestes ne le seront pas encore assez (cas du sclérenchyme). La mise en place à bas coût d'un fractionnement sélectif des tissus, sur la base de certaines analyses de leurs propriétés (électrostatisme, décantation en solvant spécifique, fragmentation aux ultrasons, etc.), pourrait permettre d'optimiser le procédé global de production d'éthanol à partir de biomasse en améliorant la réactivité du substrat et en minimisant le taux d'inhibiteurs de fermentation.

3. Conclusion

Les deux études de ce chapitre sont complémentaires et visaient à étudier l'évolution des paramètres macroscopiques mesurés par prélèvement *ex situ* et établir des liens avec les observations microscopiques *in situ*.

a. Scénario d'hydrolyse enzymatique d'une biomasse prétraitée à l'acide dilué

En début d'hydrolyse enzymatique, les enzymes s'adsorbent en premier lieu aux extrémités des particules qui sont rapidement lissées et digèrent en priorité les tissus cellulosiques.

Une fois ce phénomène transitoire passé, et si le substrat est suffisamment bien prétraité, l'hydrolyse se poursuit au niveau des tissus lignifiés (parenchyme lignifié et sclérenchyme), dans le volume des parois secondaires, là où la cellulose est majoritairement présente. L'hydrolyse de la cellulose dans la paroi laisse une porosité visible par l'augmentation de la surface accessible et de la taille des pores au cours de la saccharification. La matrice est alors fragilisée, ce qui entraîne une fragmentation, en particulier en fin d'hydrolyse, et de manière d'autant plus marquée que le prétraitement est réalisé à haute température. Cependant, cette hydrolyse des tissus lignifiés ne se fait pas de manière homogène. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par un différentiel d'affinité enzymatique au sein d'un même tissu lignifié, ce qui pose question quant à son origine et aux moyens d'y remédier. De plus, ce phénomène explique peut-être pourquoi les rendements en glucose n'atteignent jamais des valeurs proches de la valeur maximale de 100 %, quelles que soient les conditions opératoires choisies. Par ailleurs, à partir d'une température de prétraitement de 140 °C, certains tissus sont suffisamment déstructurés pour que l'on ne puisse plus reconnaître les tissus originels. Ces particules relativement abondantes présentent des zones peu digests, probablement constituées de lignine comme vu par microscopie confocale, et d'autres au contraire plus digests.

A faible température de prétraitement (100 °C), la conversion de la cellulose se limite essentiellement aux tissus non lignifiés, de sorte que l'on peut se demander si certains tissus lignifiés ne seraient-ce qu'imprégnés par le mélange réactionnel (à l'échelle de la cellulose, dans le lumen, et à l'échelle inférieure,

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

dans les parois), par la forte hydrophobicité de la lignine qui est présente (et dans le cas du sclérenchyme, par l'étroitesse des lumens).

Concernant l'hydrolyse en elle-même, le ralentissement temporel de la cinétique est un phénomène systématiquement rencontré lors de la saccharification d'un substrat. Plusieurs facteurs semblent intervenir. D'abord, après digestion préférentielle des tissus cellulosiques et lissage des zones d'aspérité, la conversion se poursuit dans des zones où la cellulose est bien moins accessible. Un autre phénomène participe au ralentissement de la conversion, c'est la dynamique d'adsorption et de désorption imparfaite. Des enzymes restent progressivement bloquées en surface.

Un autre point important est que l'hydrolyse de la cellulose se fait de manière non spécifique sur les phases amorphe et cristalline qui sont par ailleurs intimement liées (liens covalents sur les chaînes, liaisons hydrogène entre les chaînes) et se succèdent au sein des microfibrilles. De ce fait, l'efficacité de l'hydrolyse d'une région amorphe peut dépendre de l'hydrolyse des zones cristallines qui l'entourent.

L'augmentation de la température du prétraitement permet d'augmenter la digestibilité de chaque tissu, pas tant par une augmentation de l'affinité enzymatique des substrats que par une accélération de la dynamique d'adsorption et de désorption des enzymes.

b. Lien avec les descripteurs définis au chapitre précédent

Les études présentées dans ce chapitre peuvent permettre de comprendre quelles sont les interactions existant entre le comportement des enzymes (au cours du temps, vis-à-vis des différents tissus, et dépendamment de la température de prétraitement), et les modifications physicochimiques induites par le prétraitement. En effet, nous avons montré qu'il existait un certain nombre de descripteurs qui permettaient d'expliquer et de modéliser la conversion de la cellulose au cours du temps : la surface accessible, le taux d'hémicelluloses et d'humines, et la cristallinité de la cellulose. Ces paramètres étaient toutefois susceptibles d'évoluer au cours de l'hydrolyse enzymatique. Grâce au suivi des propriétés physico-chimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique, nous avons pu montrer que ce n'était pas le cas de l'indice de cristallinité de la cellulose. Par contre, nous avons vu que la surface pouvait augmenter significativement au cours de l'hydrolyse, notamment en fin d'hydrolyse enzymatique (à partir de 24-48 h). Ces résultats pourraient expliquer en partie la déviation du modèle à 144 h d'hydrolyse, qui considère la constante de vitesse k et l'accessibilité R_m de la cellulose comme des valeurs constantes au cours du temps. En l'occurrence, les rendements à 144 h prédits sous-estimaient souvent les rendements expérimentaux effectivement mesurés. Ainsi, la valeur sous-estimée du rendement en glucose à 144 h pourrait s'expliquer par l'augmentation de la surface accessible au cours de l'hydrolyse enzymatique, exposant de ce fait plus de cellulose aux enzymes et de manière tardive.

Cela permet donc à la fois de conforter le fait que la surface accessible est un descripteur clef de la saccharification, et également de montrer la nécessité de connaître l'évolution des descripteurs ciblés par le fait qu'elle rétroagit directement sur l'accessibilité de la cellulose et sur l'efficacité des enzymes. Ceci est important pour déterminer de manière plus fidèle une cinétique de rendements en glucose au cours de l'hydrolyse.

c. Synthèse des descripteurs et enjeux pour le procédé de conversion

Au terme de ces deux études, il est possible de compléter et synthétiser de manière schématique l'importance des paramètres physicochimiques qui semblent impacter la conversion de la cellulose, dans nos conditions de prétraitement et d'hydrolyse. La Figure 175 montre l'importance des différents descripteurs sur l'accessibilité R_m de la cellulose (a) et de la constante k de vitesse (b), dépendamment de la sévérité du prétraitement.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- La couleur rouge représente un effet négatif, la couleur verte un effet positif.
- Les hachures signifient que le rôle de ces paramètres dans la saccharification est mal caractérisé, et nécessiterait des investigations plus spécifiques et plus approfondies. Les paramètres concernés sont la proportion des particules très fines dans le substrat (de l'ordre d'une dizaine à quelques dizaines de microns), et de la distribution de la lignine dans les tissus, qui peut causer à la fois un masquage physique de la cellulose, et une adsorption non productive qui diminue de ce fait la quantité d'enzymes productives et donc la vitesse de conversion.
- Les couleurs pleines reportent simplement les descripteurs déterminés au chapitre précédent. On rappelle ici que le rôle des humines et des hémicelluloses dans la limitation de l'accessibilité de la cellulose est d'autant plus crucial que leur teneur est faible, ce qui a lieu lorsque les conditions opératoires sont proches de l'optimum (ni trop sévères, ni trop douces), et ce qui donne lieu expérimentalement à des rendements en glucose assez différents pour des conditions opératoires proches.

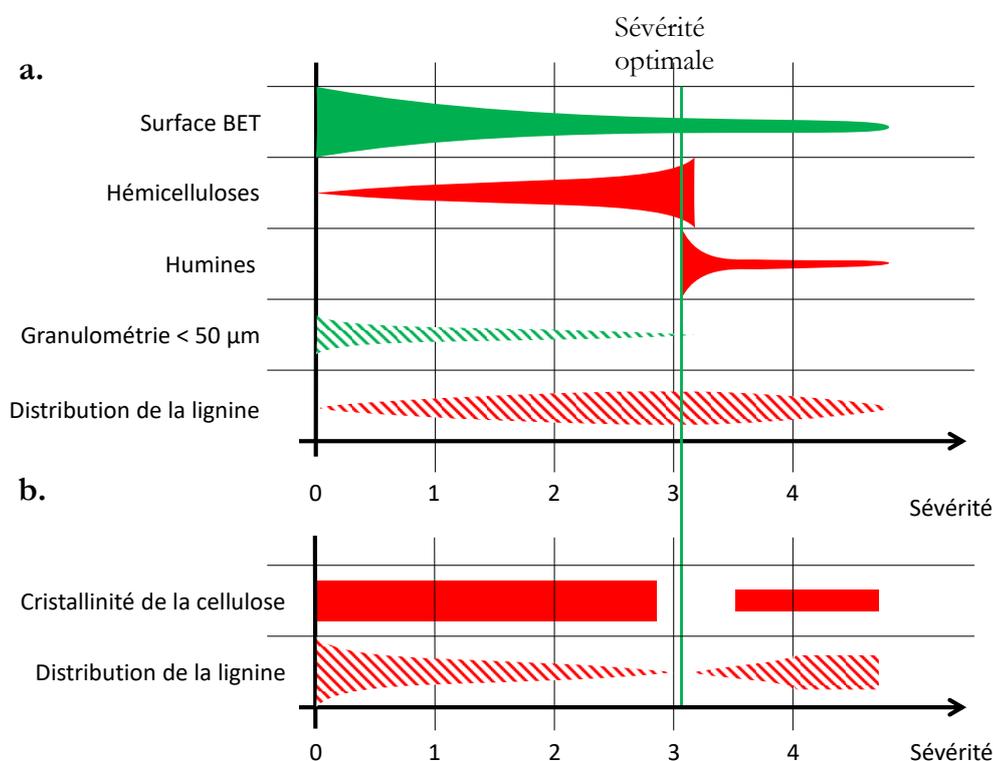


Figure 175 : Représentation schématique de l'importance relative de différents paramètres des substrats lignocellulosiques sur l'accessibilité R_m de la cellulose (a) et la constante k de vitesse de conversion (b), en fonction de la sévérité de prétraitement

L'importance de ces paramètres sur l'hydrolyse enzymatique dépend de leur valeur. Par exemple, l'impact de la teneur en hémicelluloses est d'autant plus important à prendre en compte qu'elle est présente en faible proportion. A l'inverse, pour des fortes teneurs en hémicelluloses, une variation significative de cette teneur aura des effets beaucoup plus ténus sur le rendement en glucose. Il semble intéressant d'illustrer ceci en montrant de la même manière le rôle des différents paramètres non plus en fonction du facteur de sévérité du prétraitement, mais en fonction de la valeur de chaque grandeur (Figure 176). Cependant, cette représentation n'est pas parfaite car elle n'indique pas les dépendances existant entre ces paramètres qui rendent peu probables certaines combinaisons, comme par exemple un échantillon avec une surface accessible très élevée, un taux d'hémicelluloses très élevé, et une teneur nulle en humines.

Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

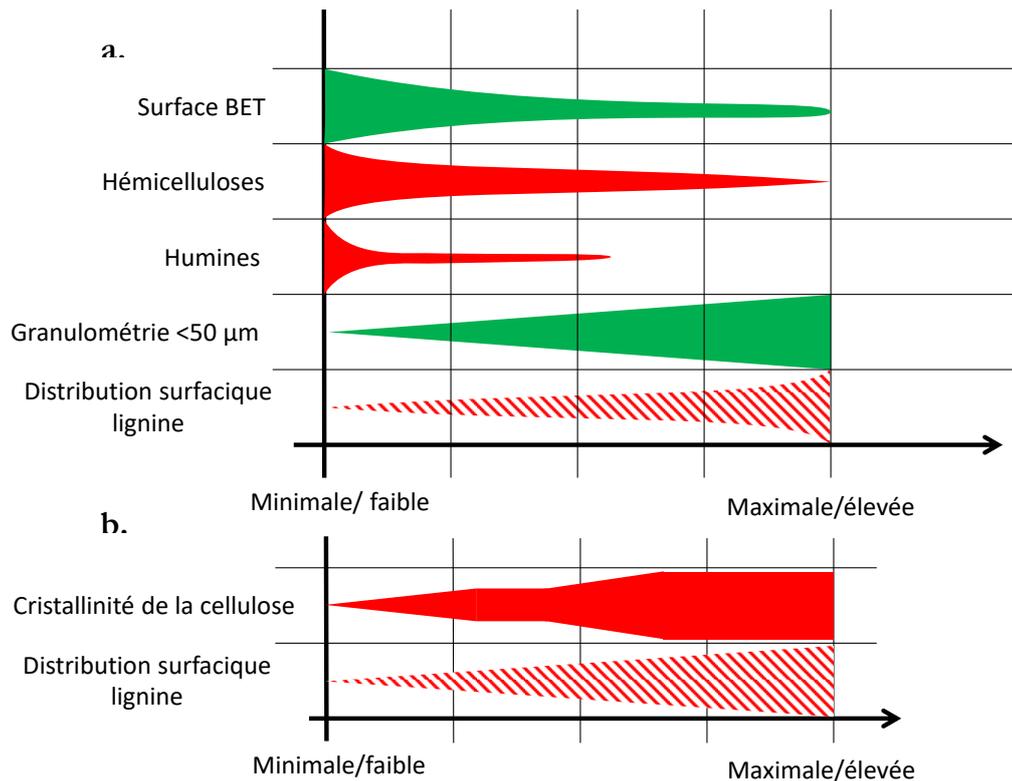


Figure 176 : Représentation schématique de l'importance relative de différents paramètres des substrats lignocellulosiques sur l'accessibilité R_m de la cellulose (a) et la constante k de vitesse de conversion (b), en fonction de la valeur de chaque paramètre

Ainsi, de cette analyse globale, différentes pistes s'ouvrent dans l'optique d'une amélioration de l'étape de prétraitement :

- Eliminer totalement les hémicelluloses, sans créer d'humines (et donc aussi d'inhibiteurs solubles), par excès de sévérité. Dans le cas d'hémicelluloses résiduelles, on suggère l'ajout d'hémicellulases (dont la dose sera à optimiser pour maximiser la synergie avec les cellulases),
- Chercher des conditions opératoires/design de réacteur qui permettent de délocaliser sous la forme de gouttes la lignine qui recouvre initialement la surface des tissus, de même que de réduire l'hétérogénéité d'efficacité de prétraitement pour les tissus lignifiés (voir le chapitre sur l'*in situ*). Ces deux phénomènes sont d'ailleurs très probablement liés,
- Compte tenu de l'inhomogénéité de digestibilité à l'échelle des tissus notamment, envisager la possibilité de réaliser un pré-tri, sélectif de la biomasse (sur la base de la densité, caractère électrostatique, taille des particules, etc.), pour adapter les conditions opératoires de prétraitement à chaque fraction, dépendamment de ses propriétés et de sa digestibilité avant prétraitement,
- Explorer la possibilité de réaliser des prétraitements peu énergivores capables de créer de la porosité/surface d'exposition : cycles de congélation/décongélation des substrats humides (dans les pays nordiques par exemple), sablage, vaporisation du solvant pendant le prétraitement,...
- A l'inverse, ne pas s'attarder sur la cristallinité de la cellulose (et sur les moyens de la modifier) puisqu'elle n'intervient pour ainsi dire plus lorsque le temps d'hydrolyse est suffisamment long,
- Explorer la possibilité de coupler différents prétraitements aux conditions opératoires assez douces, mais dont les effets complémentaires créeraient une synergie bénéfique à la digestibilité du substrat : délignification partielle alcaline, puis hydrolyse des hémicelluloses, ou encore délignification fongique partielle et cycles de congélation/décongélation, et enfin prétraitement à l'acide dilué (ou autohydrolyse) pour hydrolyser les hémicelluloses.

VIII. Conclusions et perspectives

1. Conclusions

L'éthanol cellulosique possède un potentiel certain parmi les différentes alternatives mises en place ou envisagées dans l'optique de décarboner massivement le secteur du transport. L'efficacité de l'étape de prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique doit encore être optimisée afin de rendre économiquement réaliste ce procédé plein de promesses. La compréhension profonde des mécanismes mis en jeu et des limitations de la conversion de la cellulose (ou plus généralement des polysaccharides) en sucres fermentescibles se révèle donc nécessaire pour cibler les améliorations possibles du prétraitement. C'est pourquoi nous avons décidé d'articuler cette thèse suivant trois axes :

- i) Compréhension de l'influence du prétraitement sur les propriétés physico-chimiques de la paille de blé,
- ii) Recherche du lien entre les propriétés physico-chimiques de la biomasse prétraitée et sa réactivité en hydrolyse enzymatique,
- iii) Suivi de l'évolution des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Ces travaux ont été réalisés sur un large jeu d'échantillons de pailles de blé prétraitées dont les propriétés physicochimiques étaient suffisamment variées pour pouvoir déterminer des descripteurs clefs de la conversion de la cellulose par voie enzymatique.

Dans un premier temps, la caractérisation approfondie des substrats prétraités a permis d'une part de déterminer et valider les différentes méthodes d'analyse, protocoles et traitements de données. D'autre part, elle a permis de connaître précisément les modifications physicochimiques opérées par le prétraitement à l'acide dilué et d'explosion à la vapeur dépendamment des conditions opératoires. La biomasse lignocellulosique étant complexe, tant d'un point de vue chimique que d'un point de vue structural avec son organisation multi-échelle, nous avons mis en œuvre un grand nombre de techniques analytiques afin de décrire de manière assez exhaustive ces différents échantillons en termes de morphologie et de chimie : des techniques de microscopie telles que la macroscopie (à autofluorescence UV-VIS d'une part et en imagerie de type fond noir d'autre part), la MEB, la microscopie confocale à fluorescence laser, la microscopie d'autofluorescence UV, mais aussi la granulométrie laser, la FTIR, la RMN ou encore la physisorption d'azote. Grâce à cette approche multi-technique, nous avons pu montrer qu'à sévérité modérée de prétraitement, l'hydrolyse des hémicelluloses était majoritairement responsable de l'augmentation de la surface accessible, par les vides créés suite à cette hydrolyse. Le retrait des hémicelluloses et la température provoquerait une migration de la lignine qui se regrouperait alors sous forme de gouttelettes, minimisant ainsi leur surface exposée à l'eau. A forte sévérité, la production d'humines issues de la polymérisation des produits de dégradation de polysaccharides provoque une augmentation de la surface accessible. La cellulose est aussi légèrement hydrolysée lors de prétraitements avec des sévérités modérées, et de manière plus marquée à forte sévérité. La fraction amorphe de la cellulose est alors préférentiellement hydrolysée car moins stable thermodynamiquement que la fraction cristalline. Ces différentes modifications chimiques et structurales diminuent la résistance mécanique de la matrice qui se fragmente dans une certaine mesure (diminution de la taille des particules) lorsque les hémicelluloses sont retirées, et plus encore à forte sévérité lorsque la cellulose s'hydrolyse à son tour et que les humines se forment. L'effet physique d'une détente explosive se manifeste avant tout par l'éclatement des échantillons à l'échelle macroscopique voire microscopique du substrat. Cet éclatement se traduit, non pas par une section des particules comme cela peut être observé lors d'un broyage, mais majoritairement par un défibrage des faisceaux de fibres : la morphologie fibrillaire est ainsi conservée. Ce phénomène a pour effet d'augmenter légèrement la surface accessible à partir d'une certaine détente. Toutefois cette surface créée ne semble pas être de nature cellulosique.

Une fois les échantillons proprement caractérisés, les paramètres physicochimiques gouvernant la digestibilité des substrats ont été recherchés et quantifiés pour les échantillons issus du prétraitement à l'acide dilué, à travers un modèle empirique décrivant la conversion de la cellulose en hydrolyse en fonction du temps d'hydrolyse et des descripteurs proposés. Dans un contexte de paramètres rétroagissant les uns sur les autres, l'impact respectif de chaque descripteur sur la saccharification de la cellulose est maintenant mieux connu. Cette équation est construite par deux termes. Le premier représente la cellulose accessible aux enzymes, le second représente la digestibilité de la cellulose accessible, c'est-à-dire la rapidité à laquelle la cellulose accessible aux enzymes est hydrolysée. **Grâce à cette démarche, le rendement en glucose peut être déterminé pour la paille de blé traitée à l'acide dilué, à partir de 4 paramètres qui sont accessibles par des analyses classiques** : spectroscopie IR, physisorption d'azote, et RMN. **Nous avons principalement pu montrer l'implication de la surface BET** (représentative de la surface accessible), **de la teneur en hémicelluloses, et de la teneur en humines formées en conditions trop sévères de prétraitement, sur l'accessibilité de la cellulose.** Quant à l'indice de cristallinité de la cellulose, il semble limiter la vitesse de la saccharification (taux de saccharification) pour une accessibilité donnée de la cellulose. De ce fait, l'effet de la cristallinité sur le ralentissement ne peut s'observer que pour de courts temps de saccharification, et après avoir pris en compte le terme d'accessibilité de la cellulose. Ceci explique probablement pourquoi l'effet de ce paramètre sur la saccharification ne fait pas consensus dans la communauté scientifique, puisqu'il est "masqué" chez les substrats lignocellulosiques, et directement observable pour les substrats celluloses à en début d'hydrolyse. La démarche peut maintenant être prolongée pour d'autres types de substrats et procédés. Cependant cette approche qui est un outil pratique de prédiction, présente certaines limites, et requiert de connaître l'évolution des descripteurs au cours de la saccharification. Par ailleurs, ce modèle reste macroscopique et ne donne pas d'information sur le mode d'action des enzymes dépendamment de la nature de la biomasse lignocellulosique.

Le rôle spécifique de la détente explosive sur la digestibilité des substrats a été étudié. La détente explosive n'a pas d'effet positif sur la saccharification (il semblerait même que ce soit légèrement le contraire pour des détentes de moyenne amplitude). Cependant, par le mode opératoire qui a été choisi, il est possible qu'un biais instrumental ait été introduit et rende les expérimentations non représentatives de ce qui serait fait industriellement. En effet, plutôt que de réaliser une détente explosive de manière directement consécutive au traitement à l'acide dilué, il a été choisi de réaliser séparément le traitement à l'acide (sur une unité différente de celle utilisée pour l'étude du traitement à l'acide dilué) sur le substrat qui est ensuite neutralisé (en termes de pH), puis réchauffé pour mettre en pression le réacteur, et finalement détendu.

Afin de mieux appréhender les mécanismes d'hydrolyse de la biomasse prétraitée, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement, un suivi des modifications de la biomasse intervenant au cours de l'hydrolyse enzymatique a été réalisé par deux approches. D'abord, des caractérisations *ex situ* de prélèvements au cours de l'hydrolyse enzymatique ont été réalisées en FTIR, physisorption d'azote, MEB et granulométrie laser. Ensuite, une autre étude a été réalisée sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL en imagerie d'autofluorescence UV pour un suivi *in situ* de la dégradation de substrats prétraités tout en localisant simultanément les enzymes. Lorsque le substrat possède une digestibilité correcte après un prétraitement de sévérité modérée, l'hydrolyse de la cellulose mène à une augmentation de la surface accessible, de manière plus prononcée en fin d'hydrolyse. Les états de surface sont également modifiés, d'abord lissés puis de nature lâche et rugueuse. Il s'avère que l'hydrolyse de la cellulose provoque également une fragilisation du substrat, ce qui mène à une fragmentation de la matrice, notamment en fin d'hydrolyse. Quant au comportement des enzymes, celui-ci dépend énormément de la nature des tissus et des conditions opératoires de prétraitement. De manière générale, la cinétique d'adsorption puis de désorption des enzymes a tendance à ralentir au cours du temps, et de manière d'autant plus prononcée que le tissu est peu digeste. Plus précisément, au cours de l'hydrolyse du tissu, une proportion croissante des enzymes ne participent plus à l'hydrolyse mais restent présentes à la surface du tissu. Sans intervention, cette adsorption non productive est irréversible. En fin d'hydrolyse, il n'y a plus d'enzymes participant activement à l'hydrolyse du tissu, et celui-ci est recouvert d'enzymes adsorbées s'il n'a pas été complètement hydrolysé. Le prétraitement semble avoir un effet positif sur la digestibilité des tissus et ce, quel que soit le tissu considéré. L'augmentation de la température (et donc de la sévérité) de prétraitement jusqu'à obtenir un prétraitement optimal, provoque une augmentation de l'affinité enzymatique sur les

tissus, mais surtout une accélération de la dynamique d'adsorption-désorption sur les différents tissus. Les tissus lignifiés ne peuvent être dégradés partiellement qu'à partir d'une certaine sévérité de prétraitement, alors que les tissus non lignifiés sont complètement digests, même après un prétraitement peu sévère. Par ailleurs, pour les tissus lignifiés, le prétraitement à sévérité intermédiaire les rend partiellement digests, mais de manière hétérogène. En effet, certaines zones d'un même tissu lignifié ont conservé toute leur récalcitrance. Ce comportement observé pourrait expliquer pourquoi avec toutes les conditions opératoires testées, la conversion de la cellulose n'atteint jamais des valeurs proches de 100 %. Le défi serait maintenant de comprendre l'origine de cette hétérogénéité et de trouver un moyen d'uniformiser l'effet du prétraitement. L'hypothèse d'une répartition non optimale de lignine dans la matrice par un prétraitement trop long est pour l'instant avancée. Enfin, l'adsorption des enzymes semble être plus précoce en périphérie qu'au centre des particules digests, ce qui amène à penser que pour des particules de taille inférieure à l'étendue de ce gradient d'adsorption entre le centre et l'extrémité des particules, la conversion de la cellulose est plus rapide puisque l'entièreté de la particule est concernée par l'adsorption précoce (il n'y a plus d'effet de gradient).

Compte tenu des résultats obtenus et des interprétations qui ont été faites, un prétraitement optimal en milieu acide devrait être réalisé à température suffisamment élevée pour éliminer toutes les hémicelluloses. Dans le cas contraire, il devient intéressant d'avoir recours à des hémicellulases lors de l'hydrolyse enzymatique. Le prétraitement doit être suffisamment rapide pour ne pas former d'humines ni permettre une redistribution éventuelle de la lignine dans les tissus.

2. Perspectives

Différentes perspectives à ce travail peuvent être évoquées, dépendamment des domaines concernés.

Nous avons vu que l'accessibilité à la cellulose était un point crucial pour diminuer la récalcitrance du substrat. Celle-ci dépend essentiellement de la présence des hémicelluloses, aisément éliminées lors du prétraitement, de la lignine et des humines. Sur la large gamme d'échantillons étudiés, nous n'avons pas vu d'influence significative de la teneur en lignine, par le fait même que ce prétraitement ne touche pas beaucoup la lignine. Toutefois sur d'autres substrats lignocellulosiques ou avec d'autres types de prétraitement, sa proximité avec la cellulose pourrait être influente.

Les modifications de la lignine tant en termes de structure chimique que de répartition spatiale dans les substrats pourraient donc être approfondies. L'étude de la répartition de la lignine pourrait être poursuivie en utilisant la microscopie confocale à balayage laser comme cela était fait durant la thèse, mais sur une plage d'échantillons significativement élargie. Les interactions covalentes présentes entre la lignine et les polysaccharides sont évoquées dans les phénomènes de récalcitrance des lignocelluloses à l'hydrolyse enzymatique. Le dosage des sucres hybrides (ou phénols glycosylés, présents dans la matrice solide) pourrait permettre d'évaluer leur incidence sur la dégradation enzymatique des lignocelluloses. Comprendre les phénomènes de migration et le regroupement de la lignine en gouttelettes (et d'éventuelles relocalisation pour des longs temps de séjour), survenant lors des prétraitements et leur influence sur l'accessibilité de la cellulose est aussi requis afin de mieux maîtriser ce phénomène. La microscopie à temps de vie de fluorescence (FLIM) pourrait s'avérer pertinente pour suivre les modifications des lignines suite au prétraitement. En effet, le temps de vie d'un fluorophore dépend de sa structure, de sa composition mais aussi de son environnement. Les modifications chimiques de la lignine pourraient également être suivies par RMN 2D. Combiner ces différentes approches pourrait permettre de donner des réponses quant à l'hétérogénéité spatiale d'affinité enzymatique observée chez les tissus lignifiés. Cette hétérogénéité reste inconnue et constitue probablement une des explications au fait que le rendement en glucose n'approche jamais des 100 % malgré la large plage de conditions opératoires testées dans ce travail.

Ensuite l'étude des humines, de leur formation et de leurs effets, pourrait être poursuivie, par des caractérisations (RMN proton carbone notamment), mais aussi par des tests de saccharification en présence d'humines produites à façon et ajoutées artificiellement, afin de s'assurer du caractère inhibiteur des humines par adsorption non productive, ou au contraire par un effet purement physique de masquage,

comme c'est le cas pour les hémicelluloses. L'apport de nouvelles expérimentations synchrotron en microscopie par autofluorescence UV pourrait être utile sur des échantillons traités à trop forte sévérité, c'est-à-dire présentant des humines, afin de statuer sur l'hypothèse d'une adsorption non productive d'enzymes sur ces humines.

Une autre perspective serait bien sûr d'élargir le type d'échantillons étudiés, tant en termes de technologie de prétraitement que de matière première, pour identifier d'autres descripteurs plus universels ou au contraire spécifiques à certains échantillons. La même méthodologie sur une base d'échantillons plus diversifiés pourrait permettre de compléter le squelette du modèle prédictif de rendement en glucose sur la base de descripteurs pertinents.

Des pistes pourraient être également explorées concernant le traitement des données. On peut penser à l'analyse multiblock dans le cadre d'une analyse multivariée qui se base sur un jeu de données hétérogènes (issue d'outils différents), mais aussi à l'analyse multilinéaire et la régression PLS pour essayer de corrélérer sur une même série d'échantillons les différents jeux de données aux rendements en glucose.

Un intérêt pourrait être porté sur l'effet des éléments minéraux sur l'évolution du substrat dans le procédé, notamment à l'étape du prétraitement pour lequel les éléments minéraux pourraient influencer la thermo-dégradation des polysaccharides à forte sévérité de prétraitement.

La thèse s'est attachée à trouver les descripteurs physicochimiques d'un substrat lignocellulosique prétraité et exempt de composés solubles (par lavage). Cependant, en conditions industrielles, le substrat solide n'est pas lavé après le prétraitement. L'effet (d'inhibition notamment) de l'hydrolysate de prétraitement sur la saccharification et dépendamment des conditions opératoires, serait également à prendre en compte.

IX. Références

- [1] D. Hofstrand, Energy agriculture - ethanol energy balance, 2007. <https://www.extension.iastate.edu/agdm/articles/hof/HofJuly07.html>.
- [2] ETIP-Bioenergy, Cellulosic Ethanol, 2017. <http://www.etipbioenergy.eu/value-chains/products-end-use/products/cellulosic-ethanol> (accessed 11 June 2018).
- [3] RFA, Industry Statistics: World Fuel Ethanol Production, 2018. <https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>.
- [4] D. Humbird, R. Davis, L. Tao, C. Kinchin, D. Hsu, and A. Aden: NREL, P. Schoen, J. Lukas, B. Olthof, M. Worley, D. Sexton, and D. Dudgeon: Harris Group Inc., Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover, NREL Technical Reports (2011).
- [5] D.K. Albino, K.Z. Bertrand, Y. Bar-Yam, Food for fuel: The price of ethanol | NECSI, New England Complex Systems Institute (2012).
- [6] C.P. Vance, G.H. Heichel, D. K. Barnes, J.W. Bryan, L.E. Johnson, Nitrogen Fixation, Nodule Development, and Vegetative Regrowth of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) following Harvest, *Plant Physiol.* 64 (1979) 1–8.
- [7] J.C. Hartman, J.B. Nippert, R.A. Orozco, C.J. Springer, Potential ecological impacts of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) biofuel cultivation in the Central Great Plains, USA, *Biomass and Bioenergy* 35 (8) (2011) 3415–3421. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.055>.
- [8] S.S. Jagtap, S.M. Woo, T.-S. Kim, S.S. Dhiman, D. Kim, J.-K. Lee, Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass, *Fuel* 116 (2014) 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.017>.
- [9] S. Trapp, U. Karlson, Aspects of phytoremediation of organic pollutants, *J Soils & Sediments* 1 (1) (2001) 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02986468>.
- [10] R. Slade, A. Bauen, Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass and Bioenergy* 53 (2013) 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>.
- [11] D. Bonaquist, Economies of scale for Biofuels Production: Praxair (2013).
- [12] C. Sagne, M.-F. Chabreliè, Biocarburants de deuxième génération une nouvelle étape est franchie, IFPEN - Panorama 2015 (2015).
- [13] Y. Hadar (Ed.), Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, Springer, 2013.
- [14] L. Rosendahl (Ed.), Direct Thermomechanical Liquefaction for Energy Applications, Woodhead Publishing, 2018.
- [15] A. Barakat, H. de Vries, X. Rouau, Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.169>.
- [16] P. McKendry, Energy production from biomass (part 1): overview of biomass, *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 37–46.
- [17] S.H. Ghaffar, M. Fan, Y. Zhou, O. Abo Madyan, Detailed Analysis of Wheat Straw Node and Internode for Their Prospective Efficient Utilization, *J. Agric. Food Chem.* 65 (41) (2017) 9069–9077. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03304>.
- [18] M. Antongiovanni, C. Sargentini, Variability in chemical composition of straws, *Fourrages et sous-produits méditerranéens Série A* (16) (1991) 49–53.

- [19] H. Zhang, L.G. Thygesen, K. Mortensen, Z. Kádár, J. Lindedam, H. Jørgensen, Structure and enzymatic accessibility of leaf and stem from wheat straw before and after hydrothermal pretreatment, *Biotechnol. Biofuels* 7:74 (2014).
- [20] S.H.T. Harper, J.M. Lynch, The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes, *J. Sci. Food Agric.* 32 (11) (1981) 1057–1062. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740321103>.
- [21] Bioeco, Illustration du vocabulaire de la feuille, 2004. <http://bioeco.free.fr/schemas/feuille/feuille3.htm> (accessed 21 November 2016).
- [22] M. Robinson, *Grasses of the British Isles* 2010278 Edited by Paul Ashton; illustrated by Margaret Tebbs. *Grasses of the British Isles* London: Botanical Society of the British Isles 2009. 612 pp., ISBN: 978 0 901158 41 3 (hbck); 978 0 901158 42 0 (pbck) £25 (hbck); £20 (pbck) B.S.B.I. Handbook, no. 13, Reference Reviews 24 (6) (2010) 35–36. <https://doi.org/10.1108/09504121011067193>.
- [23] L. Howard, C. Daghljan, Botanical Stem SEM: *Oryza* Stem, 2000. <http://remf.dartmouth.edu/images/botanicalStemSEM/source/6.html>.
- [24] M.A. Hansen, B.J. Hidayat, K.K. Mogensen, M.D. Jeppesen, B. Jørgensen, K.S. Johansen, L.G. Thygesen, Enzyme affinity to cell types in wheat straw (*Triticum aestivum* L.) before and after hydrothermal pretreatment, *Biotechnol. Biofuels* 6 (1) (2013) 54. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-54>.
- [25] Laboratoire Biologie et Multimédia, Feuille Monocotylédone le Muguet, 2001. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/anatomie/feuille/muguet/psmuguet.html> (accessed 20 July 2016).
- [26] E. Sjöström, *Wood chemistry: Fundamentals and applications*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1993.
- [27] H.M. Zhai, Z.Z. Lee, Ultrastructure and Topochemistry of Delignification in Alkaline Pulping of Wheat Straw, *Journal of Wood Chemistry and Technology* 9(3) (1989) 387–406.
- [28] M. Sorieul, A. Dickson, S.J. Hill, H. Pearson, Plant Fibre: Molecular Structure and Biomechanical Properties, of a Complex Living Material, Influencing Its Deconstruction towards a Biobased Composite, *Materials (Basel)* 9 (8) (2016). <https://doi.org/10.3390/ma9080618>.
- [29] M. Ioelovich, Study of thermodynamic properties of various allomorphs of cellulose, *ChemXpress* 9 (3) (2016) 259–265.
- [30] A. Sarkar and S. Pérez, Discover Poysaccharides - Cellulose, 2012. http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_cellulose.html (accessed 21 November 2016).
- [31] S.H. Ghaffar, M. Fan, Revealing the morphology and chemical distribution of nodes in wheat straw, *Biomass and Bioenergy* 77 (2015) 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.032>.
- [32] L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin, Conrad, Jr. & C.M., An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer, *Textile Research Journal* October (1959) 786–794.
- [33] V.P. Puri, Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification, *Biotechnol. Bioeng.* 26(10) (1984) 1219–1222.
- [34] H. Chen, Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose, *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice (Chapter 2)* (2014) 25–71.
- [35] Wagner Rodrigo de Souza, Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass, In *Tech - Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization Chapter 9* (2013) 207–247.
- [36] R. Sun, J.M. Lawther, W.B. Banks, Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 325–331.
- [37] A. Abot, Caractérisation des fibres longues de chanvre (*Cannabis sativa*) en vue de leurs utilisations dans des matériaux composites, 2010.

- [38] C. Lapierre, B. Pollet, C. Rolando, New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods, *Res. Chem. Intermed.* 21 (3-5) (1995) 397–412. <https://doi.org/10.1007/BF03052266>.
- [39] R. Sun, X.F. Sun, S.Q. Wang, W. Zhu, X.Y. Wang, Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood, *Industrial Crops and Products* 15 (3) (2002) 179–188. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(01\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00112-1).
- [40] R. Sun, B. Xiao, J.M. Lawther, Fractional and structural characterization of ball-milled and enzyme lignins from wheat straw, *J. Appl. Polym. Sci.* 68 (10) (1998) 1633–1641. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980606\)68:10<1633:AID-APP12>3.3.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980606)68:10<1633:AID-APP12>3.3.CO;2-T).
- [41] R.D. Hatfield, D.M. Rancour, J.M. Marita, Grass Cell Walls: A Story of Cross-Linking, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 2056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02056>.
- [42] Z. Jin, K.S. Katsumata, Lam, Thi Bach Tuyet, K. Iiyama, Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous woods, *Biopolymers* 83 (2) (2006) 103–110. <https://doi.org/10.1002/bip.20533>.
- [43] J. Zeng, D. Singh, D. Gao, S. Chen, Effects of lignin modification on wheat straw cell wall deconstruction by *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnol. Biofuels* 7 (1) (2014) 161. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0161-3>.
- [44] A. Heredia, A. Jimenez, R. Guillen, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1995) 24–31.
- [45] K.H. Caffall, D. Mohnen, The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides, *Carbohydr. Res.* 344 (14) (2009) 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>.
- [46] D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis, *Curr. Opin. Plant Biol.* 11 (3) (2008) 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.
- [47] R.-C. Sun, X.-F. Sun, S.-H. Zhang, Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood, *J. Agric. Food Chem.* 49 (11) (2001) 5122–5129. <https://doi.org/10.1021/jf010500r>.
- [48] K. Matzke, M. Riederer, A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L, *Planta* 185 (2) (1991) 233–245. <https://doi.org/10.1007/BF00194066>.
- [49] N. Carpita, McCann, *The Cell Wall*, in: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, pp. 52–108.
- [50] M.G. Resch, J.O. Baker, S.R. Decker, Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), *Laboratory Analytical Procedure* (2015).
- [51] M. Zeng, E. Ximenes, M.R. Ladisch, N.S. Mosier, W. Vermerris, C.-P. Huang, D.M. Sherman, Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (part 1), *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2) (2012) 390–397. <https://doi.org/10.1002/bit.23337>.
- [52] M. Zeng, E. Ximenes, M.R. Ladisch, N.S. Mosier, W. Vermerris, C.-P. Huang, D.M. Sherman, Tissue-specific biomass recalcitrance in corn stover pretreated with liquid hot-water: SEM imaging (part 2), *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2) (2012) 398–404. <https://doi.org/10.1002/bit.23335>.
- [53] T. Watanabe, A. Shino, K. Akashi, J. Kikuchi, Spectroscopic investigation of tissue-specific biomass profiling for *Jatropha curcas* L, *Plant Biotechnology* 29 (2) (2012) 163–170. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.12.0222a>.
- [54] V.A. Huck-Pezzei, J.D. Pallua, C. Pezzei, L.K. Bittner, S.A. Schönbichler, G. Abel, M. Popp, G.K. Bonn, C.W. Huck, Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum*), *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (6-7) (2012) 1771–1778. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6296-9>.
- [55] L. Donaldson, A. Vaidya, Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy, *Sci. Rep.* (7) (2017) 44386.

- [56] N. Gierlinger, L. Goswami, M. Schmidt, I. Burgert, C. Coutand, T. Rogge, M. Schwanninger, In situ FT-IR microscopic study on enzymatic treatment of poplar wood cross-sections, *Biomacromolecules* 9 (8) (2008) 2194–2201. <https://doi.org/10.1021/bm800300b>.
- [57] C. Gritsch, Y. Wan, Mitchell, Rowan A C, P.R. Shewry, S.J. Hanley, A. Karp, G-fibre cell wall development in willow stems during tension wood induction, *J. Exp. Bot.* 66 (20) (2015) 6447–6459. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv358>.
- [58] J.-P. Joseleau, T. Imai, K. Kuroda, K. Ruel, Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*, *Planta* 219 (2) (2004) 338–345. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1226-5>.
- [59] N. Nishikubo, T. Awano, A. Banasiak, V. Bourquin, F. Ibatullin, R. Funada, H. Brumer, T.T. Teeri, T. Hayashi, B. Sundberg, E.J. Mellerowicz, Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar—a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees, *Plant Cell Physiol.* 48 (6) (2007) 843–855. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm055>.
- [60] M. Gruno, P. Valjamae, G. Pettersson, G. Johansson, Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate, *Biotechnol. Bioeng.* 86 (5) (2004) 503–511. <https://doi.org/10.1002/bit.10838>.
- [61] H. Henriksson, J. Stahlberg, R. Isaksson, G. Pettersson, The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1, *FEBS Lett.* 390 (3) (1996) 339–344.
- [62] P. Tomme, H. van Tilbeurgh, G. Pettersson, J. van Damme, J. Vandekerckhove, J. Knowles, T. Teeri, M. Claeysens, Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis, *Eur. J. Biochem.* 170 (3) (1988) 575–581.
- [63] L. Zhong, J.F. Matthews, P.I. Hansen, M.F. Crowley, J.M. Cleary, R.C. Walker, M.R. Nimlos, Brooks, C.L., Adney, W.S., Himmel, M.E., J. Brady, Computational simulations of the *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I acting on microcrystalline cellulose I β : the enzyme-substrate complex, *Carbohydr. Res.* (344(15)) (2009) 1984–1992.
- [64] L.R. Lynd, P.J. Weimer, van Zyl, W. H., I.S. Pretorius, Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3) (2002) 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>.
- [65] M. Lawoko, A. Nutt, H. Henriksson, G. Gellerstedt, G. Henriksson, Hemicellulase Activity of Aerobic Fungal Cellulases, *Holzforschung* 54 (5) (2000) 497–500. <https://doi.org/10.1515/HF.2000.084>.
- [66] S. Malherbe & T.E. Cloete, Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications, *Environmental Science & BioTechnology* 1 (2002) 105–114.
- [67] B. Westereng, T. Ishida, G. Vaaje-Kolstad, M. Wu, V.G.H. Eijsink, K. Igarashi, M. Samejima, J. Ståhlberg, S.J. Horn, M. Sandgren, The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose, *PLoS ONE* 6 (11) (2011) e27807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027807>.
- [68] R.J. Quinlan, M.D. Sweeney, L. Lo Leggio, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, K.S. Johansen, Krogh, Kristian B R M, C.I. Jørgensen, M. Tovborg, A. Anthonsen, T. Tryfona, C.P. Walter, P. Dupree, F. Xu, G.J. Davies, P.H. Walton, Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (37) (2011) 15079–15084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>.
- [69] K.S. Johansen, Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation, *Trends in Plant Science* 21 (11) (2016) 926–936. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.012>.
- [70] B. Chabbert, A. Habrant, M. Herbaut, L. Foulon, V. Aguié-Béghin, S. Garajova, S. Grisel, C. Bennati-Granier, I. Gimbert-Herpoël, F. Jamme, M. Réfrégiers, C. Sandt, J.-G. Berrin, G. Paës,

- Action of lytic polysaccharide monoxygenase on plant tissue is governed by cellular type, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 17792. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17938-2>.
- [71] M. Couturier, S. Ladevèze, G. Sulzenbacher, L. Ciano, M. Fanuel, C. Moreau, A. Villares, B. Cathala, F. Chaspoul, K.E. Frandsen, A. Labourel, I. Herpoël-Gimbert, S. Grisel, M. Haon, N. Lenfant, H. Rogniaux, D. Ropartz, G.J. Davies, M.-N. Rosso, P.H. Walton, B. Henrissat, J.-G. Berrin, Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation, *Nat. Chem. Biol.* 14 (3) (2018) 306–310. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2558>.
- [72] M.G. Resch, B.S. Donohoe, J.O. Baker, S.R. Decker, Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 1858–1867.
- [73] S. Yoav, Y. Barak, M. Shamshoum, I. Borovok, R. Lamed, B. Dassa, Y. Hadar, E. Morag, E.A. Bayer, How does cellulosome composition influence deconstruction of lignocellulosic substrates in *Clostridium (Ruminiclostridium) thermocellum* DSM 1313? *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017) 222. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0909-7>.
- [74] B. Nidetzky, W. Steiner, M. Hayn, M. Claeysens, Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction, *Biochem. J.* 298 Pt 3 (1994) 705–710.
- [75] J. Medve, J. Karlsson, D. Lee, F. Tjerneld, Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes, *Biotechnol. Bioeng.* 59 (5) (1998) 621–634.
- [76] L. Zhu, J.P. O'Dwyer, V.S. Chang, C.B. Granda, M.T. Holtzaple, Structural features affecting biomass enzymatic digestibility, *Bioresour. Technol.* 99 (9) (2008) 3817–3828. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.033>.
- [77] N. Narayanaswamy, A. Faik, D.J. Goetz, T. Gu, Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production, *Bioresour. Technol.* 102 (13) (2011) 6995–7000. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.052>.
- [78] S. Sun, W. Chen, J. Tang, B. Wang, X. Cao, S. Sun, R.-C. Sun, Synergetic effect of dilute acid and alkali treatments on fractional application of rice straw, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016) 217. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0632-9>.
- [79] J.J. MacAskill, Understanding the Relative Importance of the Effects of Soluble and Insoluble Inhibitors on the Enzyme Digestibility of Steam Pretreated Radiata Pine, Hamilton, 2018.
- [80] Santos, Victor Tabosa de Oliveira, G. Siqueira, A.M.F. Milagres, A. Ferraz, Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids, *Industrial Crops and Products* 111 (2018) 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.053>.
- [81] P. Kumar, D.M. Barrett, M.J. Delwiche, P. Stroeve, Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (8) (2009) 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>.
- [82] V. Rooni, M. Raud, T. Kikas, The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries, *Energy* 139 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.07.146>.
- [83] R.P. Overend, E. Chornet, Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments, *Philosophical Transactions of the Royal Society* 321 (1987) 523–536.
- [84] N. Jacquet, C. Vanderghem, S. Danthine, N. Quiévy, C. Blecker, J. Devaux, M. Paquot, Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers, *Bioresour. Technol.* 121 (2012) 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.073>.
- [85] B.C. Saha, L.B. Iten, M.A. Cotta, Y.V. Wu, Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, *Process Biochemistry* 40 (2005) 3693–3700.

- [86] Y. Pu, F. Hu, F. Huang, B.H. Davison, A.J. Ragauskas, Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments, *Biotechnol. Biofuels* 6 (15) (2013).
- [87] I. Ballesteros, J.M. Oliva, M.J. Negro, P. Manzanares, M. Ballesteros, Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes, *Process Biochemistry* 38 (2002) 187–192.
- [88] Z.-H. Liu, L. Qin, F. Pang, M.-j. Jin, B.-Z. Li, Y. Kang, B.E. Dale, Y.-J. Yuan, Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover, *Industrial Crops and Products* 44 (2013) 176–184.
- [89] A.-I. Yeh, Y.-C. Huang, S.H. Chen, Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, *Carbohydr. Polym.* 79 (1) (2010) 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>.
- [90] Hendriks, A T W M, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 100 (1) (2009) 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
- [91] Z. Miao, T.E. Grift, A.C. Hansen, K.C. Ting, Energy requirement for comminution of biomass in relation to particle physical properties, *Industrial Crops and Products* 33 (2) (2011) 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.016>.
- [92] R. Kumar, G. Mago, V. Balan, C.E. Wyman, Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies, *Bioresour. Technol.* 100 (17) (2009) 3948–3962. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>.
- [93] M.R. Vignon, C. Garcia-Jaldon, D. Dupeyre, Steam explosion of woody hemp chènevotte, *International Journal of Biological Macromolecules* 17 (6) (1995) 395–404. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(96\)81852-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)81852-6).
- [94] C.T. Yu, W.H. Chen, L.C. Men, W.S. Hwang, Microscopic structure features changes of rice straw treated by boiled acid solution, *Industrial Crops and Products* 29 (2-3) (2009) 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.06.005>.
- [95] R. Dhabhai, S.P. Chaurasia, A.K. Dalai, Effect of Pretreatment Conditions on Structural Characteristics of Wheat Straw, *Chemical Engineering Communications* 200 (9) (2013) 1251–1259. <https://doi.org/10.1080/00986445.2012.743895>.
- [96] S.K.R. Patil, J. Heltzel, C.R.F. Lund, Comparison of Structural Features of Humins Formed Catalytically from Glucose, Fructose, and 5-Hydroxymethylfurfuraldehyde, *Energy Fuels* 26 (8) (2012) 5281–5293. <https://doi.org/10.1021/ef3007454>.
- [97] S.K.R. Patil, C.R.F. Lund, Formation and Growth of Humins via Aldol Addition and Condensation during Acid-Catalyzed Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural, *Energy Fuels* 25 (10) (2011) 4745–4755. <https://doi.org/10.1021/ef2010157>.
- [98] G. Tsilomelekis, M.J. Orella, Z. Lin, Z. Cheng, W. Zheng, V. Nikolakis, D.G. Vlachos, Molecular structure, morphology and growth mechanisms and rates of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) derived humins, *Green Chem.* 18 (7) (2016) 1983–1993. <https://doi.org/10.1039/C5GC01938A>.
- [99] I. van Zandvoort, Y. Wang, C.B. Rasrendra, van Eck, Ernst R H, P.C.A. Bruijninx, H.J. Heeres, B.M. Weckhuysen, Formation, molecular structure, and morphology of humins in biomass conversion: influence of feedstock and processing conditions, *ChemSusChem* 6 (9) (2013) 1745–1758. <https://doi.org/10.1002/cssc.201300332>.
- [100] R. Kumar, F. Hu, P. Sannigrahi, S. Jung, A.J. Ragauskas, C.E. Wyman, Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (3) (2013) 737–753. <https://doi.org/10.1002/bit.24744>.
- [101] P. Sannigrahi, D.H. Kim, S. Jung, A.J. Ragauskas, Pseudo-lignin and pretreatment chemistry, *Energy Environ. Sci.* 4 (4) (2011) 1306–1310.
- [102] D.Y. Corredor, Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, Manhattan, Kansas, 2008.

- [103] M.J. Selig, S. Viamajala, S. R. Decker, M.P. Tucker, M.E. Himmel, T.B. Vinzant, Deposition of Lignin Droplets Produced During Dilute Acid Pretreatment of Maize Stems Retards Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 1333–1339.
- [104] J.B. Kristensen, L.G. Thygesen, C. Felby, Jørgensen Henning, T. Elder, Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production, *Biotechnol. Biofuels* 1:5 (2008).
- [105] B.S. Donohoe, S.R. Decker, M.P. Tucker, M.E. Himmel, T.B. Vinzant, Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment, *Biotechnol. Bioeng.* 101 (5) (2008) 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>.
- [106] H. Li, Y. Pu, R. Kumar, A.J. Ragauskas, C.E. Wyman, Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (3) (2014) 485–492.
- [107] T. Pielhop, G.O. Larrazábal, M.H. Studer, S. Brethauer, C.-M. Seidel, Rudolf von Rohr, Philipp, Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation, *Green Chem* 17 (6) (2015) 3521–3532. <https://doi.org/10.1039/c4gc02381a>.
- [108] Y. Zeng, S. Zhao, H. Wei, M.P. Tucker, M.E. Himmel, N.S. Mosier, R. Meilan, S.-Y. Ding, In situ micro-spectroscopic investigation of lignin in poplar cell walls pretreated by maleic acid, *Biotechnol. Biofuels* 8 (1) (2015) 126. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0312-1>.
- [109] del P. Castillo, Rosario, J. Araya, E. Troncoso, S. Vinet, Fourier transform infrared imaging and microscopy studies of *Pinus radiata* pulps regarding the simultaneous saccharification and fermentation process, *Analytica Chimica Acta* 866 (2015) 10–20.
- [110] W.-H. Chen, Y.-J. Tu, H.-K. Sheen, Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating, *Applied Energy* 88 (8) (2011) 2726–2734. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.02.027>.
- [111] H. Gu, R. An, J. Bao, Pretreatment refining leads to constant particle size distribution of lignocellulose biomass in enzymatic hydrolysis, *Chemical Engineering Journal* 352 (2018) 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.145>.
- [112] W.-H. Chen, S.-C. Ye, H.-K. Sheen, Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment, *Applied Energy* 93 (2012) 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.014>.
- [113] X. Meng, M. Foston, J. Leisen, J. DeMartini, C.E. Wyman, A.J. Ragauskas, Determination of porosity of lignocellulosic biomass before and after pretreatment by using Simons' stain and NMR techniques, *Bioresour. Technol.* 144 (2013) 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.091>.
- [114] G.-L. Guo, W.-H. Chen, W.-H. Chen, L.-C. Men, W.-S. Hwang, Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production, *Bioresour. Technol.* 99 (14) (2008) 6046–6053. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.047>.
- [115] X. Meng, T. Wells, Q. Sun, F. Huang, A. Ragauskas, Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of *Populus*, *Green Chem* 17 (8) (2015) 4239–4246. <https://doi.org/10.1039/c5gc00689a>.
- [116] M.-R. Zoulikha, M. Thierry, Z. Jean-Michel Qiuyu, A. Nouviaire, R. Sid-Ahmed, Combined steam-explosion toward vacuum and dilute-acid spraying of wheat straw. Impact of severity factor on enzymatic hydrolysis, *Renewable Energy* 78 (2015) 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.038>.
- [117] L.-P. Xiao, Z.-J. Shi, F. Xu, R.-C. Sun, Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.143>.
- [118] K.C. Nlewem, M.E. Thrash, Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass, *Bioresour. Technol.* 101 (14) (2010) 5426–5430. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.031>.

- [119] T.A. Lloyd, C.E. Wyman, Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 1967–1977.
- [120] R.P. Chandra, S.M. Ewanick, P.A. Chung, K. Au-Yeung, L. Del Rio, W. Mabee, J.N. Saddler, Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates, *Biotechnol. Lett.* 31 (8) (2009) 1217–1222. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9993-5>.
- [121] S. Ewanick, R. Bura, The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse, *Bioresour. Technol.* 102 (3) (2011) 2651–2658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.117>.
- [122] P. Ma, J. Lan, Y. Feng, R. Liu, J. Qu, H. He, Effects of Continuous Steam Explosion on the Microstructure and Properties of Eucalyptus Fibers, *BioResources* 11(1) (2016) 1417–1431.
- [123] T. Auxenfans, D. Crônier, B. Chabbert, G. Paës, Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment, *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017) 36. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>.
- [124] J.B. Kristensen, C. Felby, H. Jørgensen, Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biotechnol. Biofuels* 2:11 (2009).
- [125] S.P.S. Chundawat, B.S. Donohoe, da Costa Sousa, Leonardo, T. Elder, U.P. Agarwal, F. Lu, J. Ralph, M.E. Himmel, V. Balan, B.E. Dale, Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment, *Energy Environ. Sci.* 4 (3) (2011) 973–984. <https://doi.org/10.1039/c0ee00574f>.
- [126] Ava Greenwood, *Mathematical Modelling of the Dilute Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse*, School of Mathematical Sciences, 2016.
- [127] Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83 (1) (2002) 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7).
- [128] G. Michalowicz, B. Toussaint, M.R. Vignon, Ultrastructural Changes in Poplar Cell Wall during Steam Explosion Treatment, *Holzforschung* 45 (3) (1991) 175–179.
- [129] M.P. García-Aparicio, I. Ballesteros, A. González, J.M. Oliva, M. Ballesteros, M.J. Negro, Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis, *Applied biochemistry and biotechnology* 129-132 (2006) 278–288. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-268-7_22.
- [130] S.-Y. Ding, Y.-S. Liu, Y. Zeng, M.E. Himmel, J.O. Baker, E.A. Bayer, How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility? *Science* 338 (6110) (2012) 1055–1059. <https://doi.org/10.1126/science.1226073>.
- [131] C. Sant' Anna, W. de Souza, Microscopy as a tool to follow deconstruction of lignocellulosic biomass, *Advances in Science and Technology* (2012) 639–645.
- [132] D. Ciolacu, S. Gorgieva, D. Tampu, V. Kokol, Enzymatic hydrolysis of different allomorphic forms of microcrystalline cellulose, *Cellulose* 18 (6) (2011) 1527–1541. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9601-4>.
- [133] M.J. Taherzadeh, K. Karimi, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *Int. J. Mol. Sci.* 9 (9) (2008) 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>.
- [134] T. Kinnarinen, A. Häkkinen, Influence of enzyme loading on enzymatic hydrolysis of cardboard waste and size distribution of the resulting fiber residue, *Bioresour. Technol.* 159 (2014).
- [135] M.-F. Devaux, A.S.P. Papineau, *Macrovision et analyse granulométrique en niveaux de gris pour l'analyse histologique de tissus végétaux*, 2009.
- [136] M.-F. Devaux, D. Legland, Grey level granulometry for histological image analysis of plant tissues, *Microscopy: advances in scientific research and education* (2014) 681–688.
- [137] X. Pan, D. Xie, R.W. Yu, J.N. Saddler, The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process, *Biotechnol. Bioeng.* 101 (1) (2008) 39–48.

- [138] M. Wiman, D. Dienes, M.A. Hansen, van der Meulen, Torbjörn, G. Zacchi, Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce, *Bioresour. Technol.* 126 (2012) 208–215.
- [139] M. Tanaka, M. Ikesaka, R. Matsuno, A.O. Converse, Effect of pore size in substrate and diffusion of enzyme on hydrolysis of cellulosic materials with cellulases, *Biotechnol. Bioeng.* 32(5) (1988) 698–706.
- [140] M. Foston, A.J. Ragauskas, Changes in the Structure of the Cellulose Fiber Wall during Dilute Acid Pretreatment in *Populus* Studied by ^1H and ^2H NMR, *Energy Fuels* 24 (10) (2010) 5677–5685. <https://doi.org/10.1021/ef100882t>.
- [141] Hans E. Grethlein, The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates, *Nature Biotechnology* 3 (1985) 155–160.
- [142] J. Rahikainen, S. Mikander, K. Marjamaa, T. Tamminen, A. Lappas, L. Viikari, K. Kruus, Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood - study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (12) (2011) 2823–2834.
- [143] B. Clair, J. Gril, F. Di Renzo, H. Yamamoto, F. Quignard, Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood, *Biomacromolecules* 9 (2) (2008) 494–498. <https://doi.org/10.1021/bm700987q>.
- [144] S. Brunauer, H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular layers, *Journal of the American chemical Society* 60(2) (1938) 309–319.
- [145] K. Sing, D.H. Everett, R. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquérol, T. Siemieniowska, REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS/SOLID SYSTEMS with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity, *Pure & Applied Chemistry* 57 (4) (1985) 603–619.
- [146] E. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *Journal of the American chemical Society* 73 (1) (1951) 373–380.
- [147] C. Piccolo, M. Wiman, F. Bezzo, G. Lidén, Enzyme adsorption on SO_2 catalyzed steam-pretreated wheat and spruce material, *Enzyme and Microbial Technology* 46 (3-4) (2010) 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.007>.
- [148] A. Chesson, P.T. Gardner, T.J. Wood, Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions, *J. Sci. Food Agric.* 75 (3) (1997) 289–295. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199711\)75:3<289:AID-JSFA879>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<289:AID-JSFA879>3.0.CO;2-R).
- [149] A. Roller, F. Burgos, C. Bravo-Linares, E. Vásquez, F. Droppelmann, Determining pore size distribution in wet earlywood cell wall by solute exclusion using total organic carbon technique (TOC), *Wood Sci Technol* 48 (4) (2014) 787–795. <https://doi.org/10.1007/s00226-014-0637-0>.
- [150] Å. Östlund, T. Köhnke, L. Nordstierna, M. Nydén, NMR cryoporometry to study the fiber wall structure and the effect of drying, *Cellulose* 17 (2) (2010) 321–328. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9383-0>.
- [151] W. Zhe, W. Ximing, Progress of Multi-Scale Pore Structure and Characterization Methods of Wood, *Research Scientia Silvae Sinicae* 10 (2014).
- [152] J.F. Beecher, Hunt Christopher G, Zhu J.Y, Tools for the Characterization of Biomass at the Nanometer Scale, *Nanoscience and Technology of Renewable Biomaterials* (2009) 61–90.
- [153] W. Zillig, Moisture transport in wood using a multiscale approach, 2009.
- [154] D. Derome, A. Rafsanjani, A. Patera, R. Guyer, J. Carmeliet, Hygromorphic behaviour of cellular material: hysteretic swelling and shrinkage of wood probed by phase contrast X-ray tomography, *Philosophical Magazine - Structures and Properties of Condensed Matter* 92 (28-30) (2012) 1–21, 3680-3698.
- [155] L. Kumar, V. Arantes, R. Chandra, J. Saddler, The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility, *Bioresour. Technol.* 103 (1) (2012) 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.091>.

- [156] X.F. Sun, F. Xu, R.C. Sun, Fowler P., M.S. Baird, Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw, *Cellulose* 17 (2010) 321–328.
- [157] L.T. Fan, Y.H. Lee, D.R. Beardmore, The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* (23(2)) (1981) 419–424.
- [158] M. Hall, P. Bansal, J.H. Lee, M.J. Realff, A.S. Bommarius, Cellulose crystallinity--a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate, *FEBS J.* 277 (6) (2010) 1571–1582. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x>.
- [159] Mansfield, Mooney, Saddler, Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis, *Biotechnol. Prog.* 15 (5) (1999) 804–816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>.
- [160] L. Wang, Y. Zhang, P. Gao, D. Shi, H. Liu, H. Gao, Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (3) (2006) 443–456. <https://doi.org/10.1002/bit.20730>.
- [161] L. Li, W. Zhou, H. Wu, Y. Yu, F. Liu, D. Zhu, Relationship between Crystallinity Index and Enzymatic Hydrolysis Performance of Celluloses Separated from Aquatic and Terrestrial Plant Materials, *BioResources* 9 (3) (2014) 3993–4005.
- [162] L. Laureano-Perez, F. Teymouri, H. Alizadeh, B.E. Dale, Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of corn stover, *Applied biochemistry and biotechnology* 121-124 (2005) 1081–1099.
- [163] S. Park, J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, D.K. Johnson, Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnol. Biofuels* 3 (2010) 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>.
- [164] N. Sathitsuksanoh, Z. Zhu, S. Wi, Y.-H.P. Zhang, Cellulose solvent-based biomass pretreatment breaks highly ordered hydrogen bonds in cellulose fibers of switchgrass, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (3) (2011) 521–529. <https://doi.org/10.1002/bit.22964>.
- [165] C. Lee, K. Dazen, K. Kafle, A. Moore, D.K. Johnson, S. Park, S.H. Kim, Correlations of apparent cellulose crystallinity determined by XRD, NMR, IR, Raman, and SFG methods, *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*. Springer International Publishing. (2015) pp. 115-131.
- [166] K. Karthika, A.B. Arun, P.D. Rekha, Enzymatic hydrolysis and characterization of lignocellulosic biomass exposed to electron beam irradiation, *Carbohydr. Polym.* 90 (2) (2012) 1038–1045. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.040>.
- [167] R. Tiwari, S. Rana, S. Singh, A. Arora, R. Kaushik, V.V. Agrawal, A.K. Saxena, L. Nain, Biological delignification of paddy straw and *Parthenium* sp. using a novel micromycete *Myrothecium roridum* LG7 for enhanced saccharification, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.079>.
- [168] G. Zuckerstätter, G. Schild, P. Wollboldt, T. Röder, H.K. Weber, H. Sixta, The elucidation of cellulose supramolecular structure by ¹³C CP-MAS NMR, *Lenzinger berichte* 87 (2009) 38–46.
- [169] H. Lou, M. Wang, H. Lai, X. Lin, M. Zhou, D. Yang, X. Qiu, Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate, *Bioresour. Technol.* 146 (2013) 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.115>.
- [170] C. Huang, J. He, D. Min, C. Lai, Q. Yong, Understanding the Nonproductive Enzyme Adsorption and Physicochemical Properties of Residual Lignins in Moso Bamboo Pretreated with Sulfuric Acid and Kraft Pulping, *Applied biochemistry and biotechnology* 180 (8) (2016) 1508–1523. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2183-8>.
- [171] S. Nakagame, R.P. Chandra, Kadla, John F., Saddler, Jack N., The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 4507–4517.

- [172] J.D. Crowe, N. Feringa, S. Pattathil, B. Merritt, C. Foster, D. Dines, R.G. Ong, D.B. Hodge, Identification of developmental stage and anatomical fraction contributions to cell wall recalcitrance in switchgrass, *Biotechnol. Biofuels* 10 (2017) 184–200. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0870-5>.
- [173] M. Huron, Impact of delignification on the morphology and the reactivity of steam exploded wheat straw, *Industrial Crops and Products* 79 (2016) 104–109.
- [174] H. Timpano, R. Sibout, M.-F. Devaux, C. Alvarado, R. Looten, X. Falourd, B. Pontoire, M. Martin, F. Legée, L. Cézard, C. Lapierre, E. Badel, S. Citerne, S. Vernhettes, H. Höfte, F. Guillon, M. Gonneau, Brachypodium Cell Wall Mutant with Enhanced Saccharification Potential Despite Increased Lignin Content, *Bioenerg. Res.* (2014).
- [175] C.A. Mooney, S.D. Mansfield, M.G. Touhy, J.N. Saddler, The Effect of Initial Pore Volume and Lignin Content on the Enzymatic Hydrolysis of Softwoods, *Bioresour. Technol.* 64 (1998) 113–119.
- [176] S. Nakagame, R.P. Chandra, J.N. Saddler, The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* 105 (5) (2010) 871–879. <https://doi.org/10.1002/bit.22626>.
- [177] Jerzy Trojanowski, Biological Degradation of Lignin, *International Biodeterioration & Biodegradation* 48 (2001) 213–218.
- [178] C.H. Vane, T.C. Drage, C.E. Snape, Biodegradation of oak (*Quercus alba*) wood during growth of the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): A molecular approach, *J. Agric. Food Chem.* 51 (4) (2003) 947–956. <https://doi.org/10.1021/jf020932h>.
- [179] A. Hatakka, K.E. Hammel, Fungal Biodegradation of Lignocelluloses, *The Mycota* 10 (2) (2011) 319–340.
- [180] W. Ying, Z. Shi, H. Yang, G. Xu, Z. Zheng, J. Yang, Effect of alkaline lignin modification on cellulase-lignin interactions and enzymatic saccharification yield, *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) 214. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1217-6>.
- [181] M. Li, Y. Pu, A.J. Ragauskas, Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance, *Front. Chem.* 4 (2016) 45. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00045>.
- [182] T.W. Jeffries, Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes, *Biodegradation* 1 (2-3) (1990) 163–176. <https://doi.org/10.1007/BF00058834>.
- [183] N. Belmokhtar, A. Habrant, N. Lopes-Ferreira, Changes in Phenolics Distribution After Chemical Pretreatment and Enzymatic Conversion of *Miscanthus x giganteus* Internode, *Bioenerg. Res.* 6 (2013) 506–518.
- [184] R.P. Chandra, R. Bura, W. Mabee, A. Berlin, X. Pan, J.N. Saddler, Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 108 (2007) 67–93.
- [185] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour. Technol.* 101 (13) (2010) 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- [186] X. Zhao, L. Zhang, D. Liu, Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 6 (4) (2012) 465–482. <https://doi.org/10.1002/bbb.1331>.
- [187] M. Ioelovich, E. Morag, Effect of Cellulose Structure on Enzymatic Hydrolysis, *BioResources* 6 (3) (2011) 2818–2835.
- [188] X. Meng, Q. Sun, M. Kosa, F. Huang, Y. Pu, A.J. Ragauskas, Physicochemical Structural Changes of Poplar and Switchgrass during Biomass Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4 (9) (2016) 4563–4572. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00603>.
- [189] X. Pan, N. Gilkes, J.N. Saddler, Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates, *Holzforschung* 60 (2006) 398–401.

- [190] V.S. Chang, M.T. Holtzaple, Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, *Applied biochemistry and biotechnology* 84-86 (2000) 5–37.
- [191] A. Ayoub, R.A. Venditti, J.J. Pawlak, H. Sadeghifar, A. Salam, Development of an acetylation reaction of switchgrass hemicellulose in ionic liquid without catalyst, *Industrial Crops and Products* 44 (2013) 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.036>.
- [192] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Analytical Techniques in the Sciences (2005).
- [193] B. Qi, C. Aldrich, L. Lorenzen, Effect of ultrasonication on the humic acids extracted from lignocellulose substrate decomposed by anaerobic digestion, *Chemical Engineering Journal* 98 (1-2) (2004) 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2003.07.002>.
- [194] Chundawat, Shishir P S, B. Venkatesh, B.E. Dale, Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2) (2007) 219–231. <https://doi.org/10.1002/bit.21132>.
- [195] W. Cao, C. Sun, R. Liu, R. Yin, X. Wu, Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse, *Bioresour. Technol.* 111 (2012) 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.034>.
- [196] D.L. Sills, J.M. Gossett, Using FTIR spectroscopy to model alkaline pretreatment and enzymatic saccharification of six lignocellulosic biomasses, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (4) (2012) 894–903. <https://doi.org/10.1002/bit.24376>.
- [197] L. Chen, F. Hong, X.-x. Yang, S.-f. Han, Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism, *Bioresour. Technol.* 135 (2013) 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029>.
- [198] M.A. Lima, G.B. Lavorente, H.K.P. da Silva, J. Bragatto, C.A. Rezende, O.D. Bernardinelli, E.R. de Azevedo, L.D. Gomez, S.J. McQueen-Mason, C.A. Labate, I. Polikarpov, Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production – part 1, *Biotechnol. Biofuels* 6 (75) (2013).
- [199] J.S. Lupoi, S. Singh, B.A. Simmons, R.J. Henry, Assessment of Lignocellulosic Biomass Using Analytical Spectroscopy: an Evolution to High-Throughput Techniques, *Bioenerg. Res.* 7 (2013) 1–23.
- [200] D.L. Sills, J.M. Gossett, Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkalipretreated biomasses, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2) (2012).
- [201] H. Chen, C. Ferrari, M. Angiuli, J. Yao, C. Raspi, E. Bramanti, Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis, *Carbohydr. Polym.* 82 (3) (2010) 772–778. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.052>.
- [202] Y. Tamaki, G. Mazza, Rapid determination of lignin content of straw using fourier transform mid-infrared spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2) (2011) 504–512. <https://doi.org/10.1021/jf1036678>.
- [203] G. Zhou, G. Taylor, A. Polle, FTIR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy contents reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy poplars, *Plant Methods* 7 (2011) 9. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-9>.
- [204] S.R. Collins, N. Wellner, I. Martinez Bordonado, A.L. Harper, C.N. Miller, I. Bancroft, K.W. Waldron, Variation in the chemical composition of wheat straw: the role of tissue ratio and composition, *Biotechnol. Biofuels* 7 (121) (2014) 1–14.
- [205] X. Jin, X. Chen, C. Shi, M. Li, Y. Guan, C.Y. Yu, T. Yamada, E.J. Sacks, J. Peng, Determination of hemicellulose, cellulose and lignin content using visible and near infrared spectroscopy in *Miscanthus sinensis*, *Bioresour. Technol.* 241 (2017) 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.047>.

- [206] R. Chazal, P. Robert, S. Durand, M.-F. Devaux, L. Saulnier, C. Lapierre, F. Guillon, Investigating Lignin Key Features in Maize Lignocelluloses Using Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy* 68 (12) (2014) 1342–1347.
- [207] P.K. Adapa, L.G. Schonena, T. Canam, T. Dumonceaux, Quantitative Analysis of Lignocellulosic Components of Non-Treated and Steam Exploded Barley, Canola, Oat and Wheat Straw Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Faculty Research & Creative Activity* 107 (2011).
- [208] L. Chen, J. Li, M. Lu, X. Guo, H. Zhang, L. Han, Integrated chemical and multi-scale structural analyses for the processes of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover, *Carbohydr. Polym.* 141 (2016) 1–9.
- [209] L.-S. Johansson, J. Campbell, K. Koljonen, P. Stenius, Evaluation of surface lignin on cellulose fibers with XPS, *Applied Surface Science* 144-145 (1999) 92–95. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00920-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00920-9).
- [210] P. Merdy, E. Guillon, J. Dumonceau, M. Aplincourt, Characterisation of a wheat straw cell wall residue by various techniques: A comparative study with a synthetic and an extracted lignin, *Analytica Chimica Acta* 459 (2002) 133–142.
- [211] Y. Xu, K. Li, M. Zhang, Lignin precipitation on the pulp fibers in the ethanol-based organosolv pulping, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 301 (2007) 255–263.
- [212] Y. Yu, K. Koljonen, H. Paulapuro, Surface chemical composition of some non-wood pulps, *Industrial Crops and Products* 15 (2002) 123–130.
- [213] L. Sanchez-Silva, D. López-González, J. Villaseñor, P. Sánchez, J.L. Valverde, Thermogravimetric-mass spectrometric analysis of lignocellulosic and marine biomass pyrolysis, *Bioresour. Technol.* 109 (2012) 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.001>.
- [214] L. Qin, W.-C. Li, J.-Q. Zhu, J.-N. Liang, B.-Z. Li, Y.-J. Yuan, Ethylenediamine pretreatment changes cellulose allomorph and lignin structure of lignocellulose at ambient pressure, *Biotechnol. Biofuels* 8 (174) (2015). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0359-z>.
- [215] D.T. Djajadi, M.M. Jensen, M. Oliveira, A. Jensen, L.G. Thygesen, M. Pinelo, M. Glasius, H. Jørgensen, A.S. Meyer, Lignin from hydrothermally pretreated grass biomass retards enzymatic cellulose degradation by acting as a physical barrier rather than by inducing nonproductive adsorption of enzymes, *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) 85. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1085-0>.
- [216] Z. Wang, L.J. Jönsson, Comparison of catalytically non-productive adsorption of fungal proteins to lignins and pseudo-lignin using isobaric mass tagging, *Bioresour. Technol.* 268 (2018) 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.149>.
- [217] B.R. Wood, K.R. Bamberg, C.J. Evans, M.A. Quinn, D. McNaughton, A three-dimensional multivariate image processing technique for the analysis of FTIR spectroscopic images of multiple tissue sections, *BMC Med. Imaging* 6 (2006) 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2342-6-12>.
- [218] F. Allouche, M. Hanafi, F. Jamme, P. Robert, C. Barron, F. Guillon, M.F. Devaux, Coupling hyperspectral image data having different spatial resolutions using Multiple Co-inertia Analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 117 (2012) 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.04.004>.
- [219] K. Fackler, M. Schwanninger, How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 587–599.
- [220] Y. Mei, L. Miller, W. Gao, R.A. & Gross, Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy, *Biomacromolecules* 4(1) (2003) 70–74.
- [221] M. Schmidt, N. Gierlinger, Schade, U., Rogge, T., & Grunze, M., Polarized infrared microspectroscopy of single spruce fibers: Hydrogen bonding in wood polymers, *Biopolymers* 83(5) (2006) 546–555.

- [222] Ma et. al, Ultrastructural Topochemistry of Cell Wall Polymers in Populus Nigra by Transmission Electron Microscopy and Raman Imaging Chemical topography of Populus, *BioResources* 6(4) (2011) 3944–3959.
- [223] J.-F. Ma, X. Zhou, X. Zhang, F. Xu, Label-Free in situ Raman analysis of opposite and tension wood in populus nigra, *BioResources* 8 (2) (2013) 2222–2233.
- [224] J.S. Lupoi, E. Gjersing, M.F. Davis, Evaluating lignocellulosic biomass, its derivatives, and downstream products with Raman spectroscopy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015) 50. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00050>.
- [225] S. Chen, X. Zhang, Z. Ling, Z. Ji, B.V. Ramarao, S. Ramaswamy, F. Xu, Probing and visualizing the heterogeneity of fiber cell wall deconstruction in sugar maple (*Acer saccharum*) during liquid hot water pretreatment, *RSC Adv.* 6 (83) (2016) 79297–79306. <https://doi.org/10.1039/C6RA18333F>.
- [226] G. Siqueira, A.M. Milagres, W. Carvalho, G. Koch, A. Ferraz, Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides, *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-7>.
- [227] T. Auxenfans, C. Terry, G. Paës, Seeing biomass recalcitrance through fluorescence, *Sci. Rep.* 7 (8838) (2017).
- [228] J. Bond, L. Donaldson, S.J. Hill, K. Hitchcock, Safranin fluorescent staining of wood cell walls, *Biotechnol. & Histochemistry* 83 (3) (2008) 161–171.
- [229] L.A. Donaldson, Lignification and lignin topochemistry — an ultrastructural view, *Phytochemistry* 57 (2001) 859–873.
- [230] L.A. Donaldson, K. Radotic, Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood, *J. Microsc.* 251 (2) (2013) 178–187. <https://doi.org/10.1111/jmi.12059>.
- [231] J.S. Luterbacher, L.P. Walker, J.M. Moran-Mirabal, Observing and modeling BMCC degradation by commercial cellulase cocktails with fluorescently labeled *Trichoderma reesei* Cel7A through confocal microscopy, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (1) (2013) 108–117. <https://doi.org/10.1002/bit.24597>.
- [232] C. Sant'Anna, L.T. Costa, Y. Abud, L. Biancatto, F.C. Miguens, W. de Souza, Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy, *Microsc. Res. Tech.* 76 (8) (2013) 829–834. <https://doi.org/10.1002/jemt.22235>.
- [233] D. Yang, J.M. Moran-Mirabal, J.-Y. Parlange, L.P. Walker, Investigation of the porous structure of cellulosic substrates through confocal laser scanning microscopy, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (11) (2013) 2836–2845. <https://doi.org/10.1002/bit.24958>.
- [234] J.S. Luterbacher, J.M. Moran-Mirabal, E.W. Burkholder, L.P. Walker, Modeling enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates using confocal fluorescence microscopy I: filter paper cellulose, *Biotechnol. Bioeng.* 112 (1) (2015) 21–31. <https://doi.org/10.1002/bit.25329>.
- [235] J.S. Luterbacher, J.M. Moran-Mirabal, E.W. Burkholder, L.P. Walker, Modeling enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates using fluorescent confocal microscopy II: pretreated biomass, *Biotechnol. Bioeng.* 112 (1) (2015) 32–42. <https://doi.org/10.1002/bit.25328>.
- [236] J. Xue, M. Bosch, J.P. Knox, Heterogeneity and glycan masking of cell wall microstructures in the stems of *Miscanthus x giganteus*, and its parents *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*, *PLoS ONE* 8 (11) (2013) e82114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082114>.
- [237] V.C. Coletta, C.A. Rezende, F.R. da Conceição, I. Polikarpov, F.E.G. Guimarães, Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biotechnol. Biofuels* 6:43 (2013).
- [238] F. Jamme, D. Bourquin, G. Tawil, A. Viksø-Nielsen, A. Buléon, M. Réfrégiers, 3D Imaging of Enzymes Working in Situ, *Anal. Chem.* 86(11) (2014) 5265–5270.
- [239] M.-F. Devaux, F. Jamme, W. André, B. Bouchet, C. Alvarado, S. Durand, P. Robert, L. Saulnier, E. Bonnin, F. Guillon, Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell

- Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 200. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00200>.
- [240] batiactu, Cogénération paille l'exemple réussi de Pécs en Hongrie, 2015. <http://www.batiactu.com/edito/cogeneration-paille-exemple-reussi-pecs-hongrie-42464.php> (accessed 2017).
- [241] C. Loustau-Cazalet, Relation morphologie/réactivité des substrats lignocellulosiques: impact du prétraitement par explosion à la vapeur, Solaize, 2018 (en cours).
- [242] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011): Laboratory Analytical Procedure (LAP), Laboratory Analytical Procedure (2012).
- [243] A.M. da Costa Lopes, K.G. João, D.F. Rubik, E. Bogel-Lukasik, L.C. Duarte, J. Andreaus, R. Bogel-Lukasik, Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation, *Bioresour. Technol.* 142 (2013) 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.032>.
- [244] X. F. Sun, F. Xu, R. C. Sun, P. Fowler and M. S. Baird, Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 97–106.
- [245] Roland El Hage, Nicolas Brosse, Laurent Chrusciel, Christian Sanchez, Poulomi Sannigrahi, Arthur Ragauskas, Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1632–1638.
- [246] Lindsey M. Kline, Douglas G. Hayes, Alvin R. Womac, and Nicole Labbé, Simplified Determination of Lignin content in hard and soft woods via UV-Spectrophotometric Analysis of Biomass dissolved in Ionic Liquids, *BioResources* 5(3) (2010) 1366–1383.
- [247] M. Fan, D. Dai, and B. Huang (Ed.), Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibres, *Materials Analysis*, Dr Salih Mohammed Salih, 2012.
- [248] M. Corcel, M.-F. Devaux, F. Guillon, C. Barron, F. Radjai, S. Nezamabadi, S. Luding, J.Y. Delenne, Identification of tissular origin of particles based on autofluorescence multispectral image analysis at the macroscopic scale, *EPJ Web Conf.* 140 (2) (2017) 5012. <https://doi.org/10.1051/epjconf/201714005012>.
- [249] Mary L Parker and Keith W Waldron, Texture of Chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics, *J Sci Food Agric* 68 (1995) 337–346.
- [250] Z. Merali, J.D. Ho, Collins, Samuel R A, G. Le Gall, A. Elliston, A. Kasper, K.W. Waldron, Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation, *Bioresour. Technol.* 131 (2013) 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.023>.
- [251] K. Iiyama, Lam, Thi Bach Tuyet, B.A. Stone, Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes, *Phytochemistry* 29 (3) (1990) 733–737. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80009-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80009-6).
- [252] EPSIM, La ligne de lumière DISCO, 2013.
- [253] S.Y. Oh, D.I. Yoo, Y. Shin, H.C. Kim, H.Y. Kim, Y.S. Chung, W.H. Park, J.H. Youk, Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 340 (15) (2005) 2376–2391. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.007>.
- [254] X. F. Sun, F. Xu, R. C. Sun, P. Fowler and M. S. Baird, Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw, *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 97–106.
- [255] Roland El Hage, Nicolas Brosse, Laurent Chrusciel, Christian Sanchez, Poulomi Sannigrahi, Arthur Ragauskas, Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1632–1638.
- [256] X.F. Sun, F. Xu, R.C. Sun, Z.C. Genga, P. Fowler, M.S. Baird, Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw, *Carbohydr. Polym.* 60 (2004) 15–26.

- [257] Lindsey M. Kline, Douglas G. Hayes, Alvin R. Womac, and Nicole Labbé, Simplified Determination of Lignin content in hard and soft woods via UV-Spectrophotometric Analysis of Biomass dissolved in Ionic Liquids, *BioResources* 5(3) (2010) 1366–1383.
- [258] Mizi Fan, Dason Dai, and Biao Huang, Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibres *InTech* (2012).
- [259] M. Kacuráková, FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.* 43 (2) (2000) 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X).
- [260] P. K. Adapa, L. G. Schonenau, Thomas Canam, and T. Dumonceaux, Quantitative Analysis of Lignocellulosic Components of Non-Treated and Steam Exploded Barley, Canola, Oat and Wheat Straw Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Faculty Research & Creative Activity* 107 (2011).
- [261] S.V. Vassilev, D. Baxter, L.K. Andersen, C.G. Vassileva, An overview of the chemical composition of biomass, *Fuel* 89 (5) (2010) 913–933. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>.
- [262] P. Bansal, B.J. Vowell, M. Hall, M.J. Realff, J.H. Lee, A.S. Bommarius, Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.063>.
- [263] S. Agarwal, D. van Es, H.J. Heeres, Catalytic pyrolysis of recalcitrant, insoluble humin byproducts from C6 sugar biorefineries, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 123 (2017) 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.12.014>.
- [264] T.M.C. Hoang, van Eck, E. R. H., W.P. Bula, J.G.E. Gardeniers, L. Lefferts, K. Seshan, Humin based by-products from biomass processing as a potential carbonaceous source for synthesis gas production, *Green Chem.* 17 (2) (2015) 959–972. <https://doi.org/10.1039/C4GC01324G>.
- [265] I. van Zandvoort, E.J. Koers, M. Weingarth, P.C.A. Bruijninx, M. Baldus, B.M. Weckhuysen, Structural characterization of 13 C-enriched humins and alkali-treated 13 C humins by 2D solid-state NMR, *Green Chem.* 17 (8) (2015) 4383–4392. <https://doi.org/10.1039/C5GC00327J>.
- [266] B. Chabbert, C. Terryn, M. Herbaut, A. Vaidya, A. Habrant, G. Paës, L. Donaldson, Fluorescence techniques can reveal cell wall organization and predict saccharification in pretreated wood biomass, *Industrial Crops and Products* 123 (2018) 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.058>.
- [267] G.G.D. Silva, M. Couturier, J.-G. Berrin, A. Buléon, X. Rouau, Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw, *Bioresour. Technol.* 103 (1) (2012) 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073>.
- [268] L. Chai, M. Liu, X. Yan, X. Cheng, T. Zhang, M. Si, X. Min, Y. Shi, Elucidating the Interactive Impacts of Substrate-Related Properties on Lignocellulosic Biomass Digestibility: A Sequential Analysis, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 6 (5) (2018) 6783–6791. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00592>.
- [269] T. Ikeda, K. Holtman, J.F. Kadla, H.-M. Chang, H. Jameel, Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method, *J. Agric. Food Chem.* 50 (1) (2002) 129–135. <https://doi.org/10.1021/jf010870f>.
- [270] K.M. Holtman, H. Chang, H. Jameel, J.F. Kadla, Quantitative 13 C NMR Characterization of Milled Wood Lignins Isolated by Different Milling Techniques, *Journal of Wood Chemistry and Technology* 26 (1) (2006) 21–34. <https://doi.org/10.1080/02773810600582152>.
- [271] S. Wang, F. Li, P. Zhang, S. Jin, X. Tao, X. Tang, J. Ye, M. Nabi, H. Wang, Ultrasound assisted alkaline pretreatment to enhance enzymatic saccharification of grass clipping, *Energy Conversion and Management* 149 (2017) 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.07.042>.
- [272] B. Yang, D.M. Willies, C.E. Wyman, Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion, *Biotechnol. Bioeng.* 94 (6) (2006) 1122–1128. <https://doi.org/10.1002/bit.20942>.

- [273] Z. Ji, X. Zhang, Z. Ling, R.-C. Sun, F. Xu, Tissue specific response of *Miscanthus×giganteus* to dilute acid pretreatment for enhancing cellulose digestibility, *Carbohydr. Polym.* 154 (2016) 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.086>.
- [274] T.H.F. Costa, M.E. Vega-Sánchez, A.M.F. Milagres, H.V. Scheller, A. Ferraz, Tissue-specific distribution of hemicelluloses in six different sugarcane hybrids as related to cell wall recalcitrance, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016) 99. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0513-2>.

X. Glossaire

- Allomorphe (groupe) : qualifie un matériau dans une phase cristalline donnée, parmi les différentes structures cristallines sous lesquels il peut exister (p36,37,43,44,145,181).
- Amylacé : se dit d'une plante qui accumule des réserves énergétiques sous la forme d'amidon qui pourra servir à la production de biocarburant de première génération (p1,5).
- Angiospermes : division qui regroupe l'ensemble des plantes à fleurs (p10,16,18).
- Apoplastique : qualifie un type de circulation de la sève qui a lieu entre les cellules, *via* les interstices présents entre les cellules et le lumen des cellules mortes (p15).
- Autotrophe : se dit des organismes vivants qui produisent leur matière organique à partir de matière minérale et inorganique, par réduction (p2,10).
- Bois de compression : partie d'un conifère qui subit des contraintes mécaniques de compression qui changent la structure et la composition du bois (p55, teneur en lignine plus élevée notamment).
- Bois de tension : partie d'un arbre feuillu qui subit des contraintes mécaniques de tension qui changent la structure et la composition du bois (p23,51,52, par exemple : teneur en lignine moindre, présence d'une paroi cellulaire interne additionnelle, appelée couche G).
- Cellulolytique : caractérise la capacité d'une enzyme à cliver les chaînes celluloses.
- Coalescence : phénomène de regroupement de matière en goutte. Ce phénomène peut avoir lieu pour la lignine, à partir d'une certaine sévérité de prétraitement (p29,30,54).
- Collenchyme : tissu de soutien non lignifié et peu spécialisé, avec des cellules de petits diamètres aux parois épaisses (p15,179,190,193,212).
- Chlorenchyme : parenchyme chlorophyllien, siège de la photosynthèse (p15,16).
- Cuticule : couche externe de l'épiderme, constituée de cutines et de cire imperméables (p13).
- Epiderme : tissu superficiel de protection des végétaux, présent à la fois sur la tige et les feuilles.
- Eucaryote : adjectif qualifiant le domaine regroupant les organismes vivants dont les cellules présentent un noyau (p10), par opposition aux procaryotes qui en sont dépourvus.
- Faisceau vasculaire : partie du système vasculaire qui se regroupe les tissus conducteur de la sève brute (xylème) et de la sève élaborée (phloème). Ces deux tissus sont entourés d'une gaine fasciculaire de soutien fibreuse.
- Hétérotrophe : qualifie un organisme vivant qui présente la nécessité de se nourrir à l'aide de matière organique préexistante (p2,10), par opposition aux organismes autotrophes.
- Hornification : phénomène d'effondrement irréversible de la structure d'un matériau poreux humide (ici la paille de blé), sous l'action des forces de capillarité, ce qui provoque une forte diminution de la surface accessible (p149,150).
- Méristème : tissu embryonnaire qui permet de générer par division cellulaire les différentes cellules de la plante (p14).
- Mésophylle : parenchyme chlorophyllien situé entre l'épiderme supérieur et inférieur de la feuille (p13,188,192,208).
- Moelle : tissu fondamental de parenchyme non lignifié présent au centre de la tige. Ce tissu tend à disparaître chez les tiges mûres (croissance terminée ou croissance secondaire).
- Monocotylédones : super-ordre des plantes à fleurs (angiospermes), pour lesquelles la graine n'est constituée que d'un seul cotylédon, feuille primordiale servant de réserve nutritive à la germination (p10,13,13,18,42).
- Parenchymes : tissus fondamentaux constitués de cellules peu différenciées à parois fines. Leurs rôles peuvent être très variés dépendamment du type de parenchyme : stockage d'énergie, d'eau ou de gaz, rôle assimilateur, etc.
- Phloème : tissu conducteur de la sève élaborée qui contient notamment les sucres produits par la photosynthèse.
- Photobleaching : phénomène d'atténuation de la fluorescence suite à une excitation lumineuse intense (p39,85).
- Phytolithes : agrégats minéraux formés par les végétaux comme protection physique, par exemple au niveau de l'épiderme des céréales, riches en silice (p179,192).

Plasmodesme : canal de diamètre nanométrique qui permet la circulation de la sève d'une cellule à une autre par voie symplastique, dans le cytoplasme. Le cytoplasme est la partie fondamentale de la cellule vivante, où réside son noyau (p15).

Ponctuation : trou dans la paroi cellulaire secondaire (p50,171,174).

Procaryote : adjectif qualifiant le domaine regroupant les organismes cellulaires qui ne présentent pas de noyaux (p10).

Protoxylème : xylème composé de petits vaisseaux (trachées) voués à se différencier (p14,15).

Quenching : phénomène de réduction l'intensité de fluorescence d'un fluorophore par l'intermédiaire d'un désactivateur. Les causes de désactivation peuvent être diverses (réactions électroniques à des états excités, transfert d'énergie, complexation,...) et les manifestations influencées par un grand nombre de paramètres physicochimiques : pression, température, pH, etc (p59).

Sclérenchyme : tissu de soutien constitué de cellules à parois fibreuses, épaisses et lignifiées. Ces longues cellules mortes possèdent un petit diamètre.

Stomate : ouverture au niveau de l'épiderme qui permet les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère. Elle est constituée de deux cellules de garde contractiles, qui gère le niveau d'ouverture du stomate (p13,171,173,192,211,230).

Symplastique : qualifie un type de circulation de la sève qui a lieu entre les cellules et pour lequel la sève présente dans le cytoplasme des cellules passe d'une cellule à une autre par l'intermédiaire de minuscules canaux qui perforent les parois cellulaires et qui sont appelés plasmodesmes (p15).

Vaisseau du métaxylème : trachée lignifiée présente dans le faisceau vasculaire et participant à la circulation de la sève brute (p14).

Xylème : tissu conducteur de la sève brute, provenant des racines.

XI. Annexes

1. Equivalence entre surface BET et le volume poreux

La Figure 177 montre la relation de linéarité qui lie la surface BET au volume poreux, pour les échantillons traités à l'acide dilué.

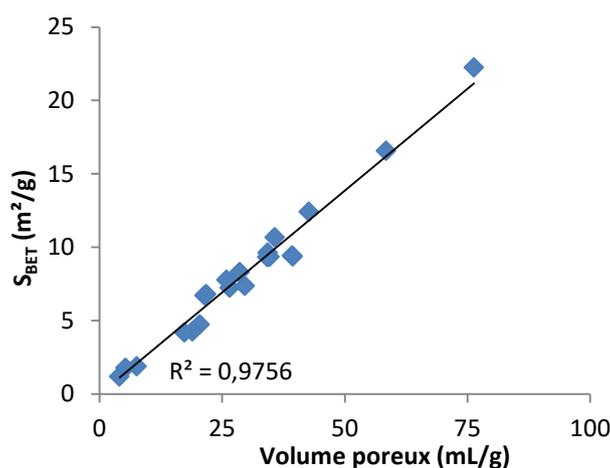


Figure 177 : Evolution de la surface BET en fonction du volume poreux

2. Intensité d'autofluorescence à l'échelle des parois

Pour s'assurer que la fluorescence bleue et rouge mesurée en imagerie d'autofluorescence UV-VIS provient respectivement des acides hydroxycinnamiques et de la lignine, on a délimité sur une coupe transversale de tige de blé, un contour rectiligne dont on trace les profils spatiaux d'intensité de fluorescence bleue (par excitation UVB) et de fluorescence rouge (par excitation bleue). La Figure 178 montre la section et la délimitation du profil. On connaît d'après la littérature l'évolution des taux de lignine et d'hémicelluloses à travers les différentes parois d'une cellule lignifiée (sclérenchyme ici), et on sait que les acides hydroxycinnamiques peuvent être liés à ces deux composés.

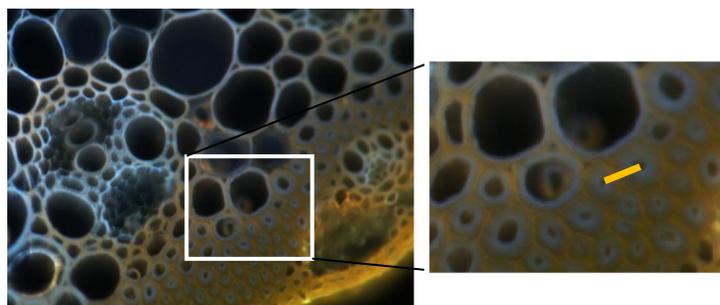


Figure 178 : Champ de vue du profil rectiligne ayant servi à faire les mesures (rectangle orange). Objectif numérique X8, microscope à autofluorescence UV-VIS

La Figure 179 montre les profils spatiaux d'intensité de fluorescence bleue et rouge, par excitations UVB et Bleue. On constate que la fluorescence rouge suit directement le taux de lignification de chaque paroi (que l'on peut trouver dans la littérature) : très important chez pour la lamelle moyenne, elle est sensiblement plus basse pour les parois secondaire, et devient de plus en plus basse à l'approche du lumen (centre de la cellule). La fluorescence est la plus présente dans les zones constituées à la fois de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et lignine), et devient absente au niveau de la lamelle moyenne qui n'est pas réputée contenir une proportion significative de polysaccharides (excepté des pectines). Cette observation tend donc à confirmer à la fois le fait que la fluorescence rouge provient de la lignine, et que la fluorescence bleue provient des acides hydroxycinnamiques qui réalisent des ponts covalents entre les hémicelluloses et la lignine.

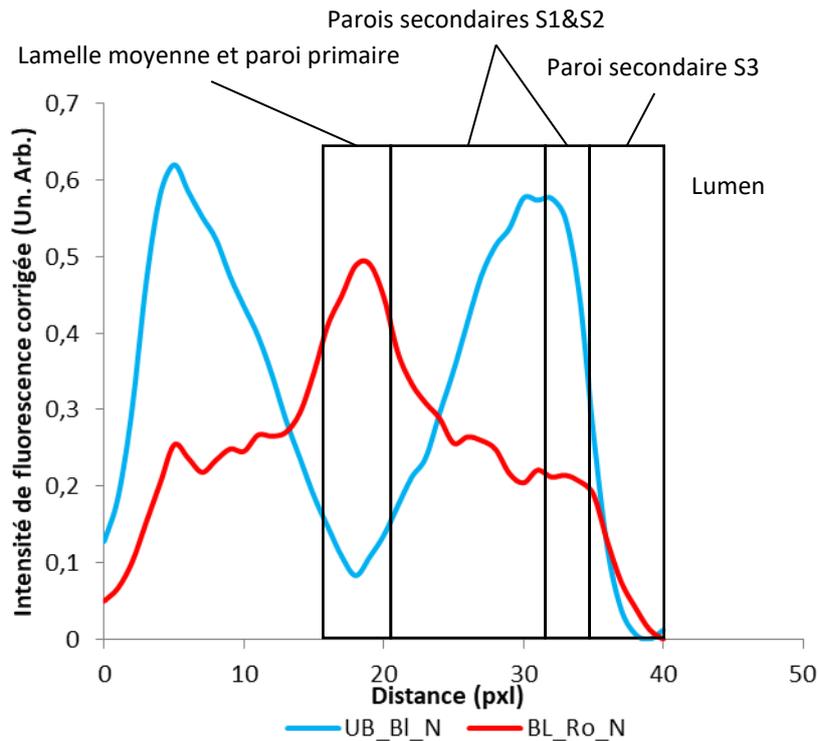


Figure 179 : Profil d'intensité de fluorescence bleue (par excitation UVB) rouge (par excitation bleue), en fonction de la position dans la paroi du sclérenchyme

3. Observations en MEB d'échantillons hydrolysés, en zones repérées

L'analyse au MEB en observation directe des échantillons C020C et A020C avant et après hydrolyse enzymatique en des zones repérées, montrent que l'hydrolyse a notamment pour effet de lisser la surface des tissus (Figure 180), et d'ouvrir les ponctuations (Figure 181).

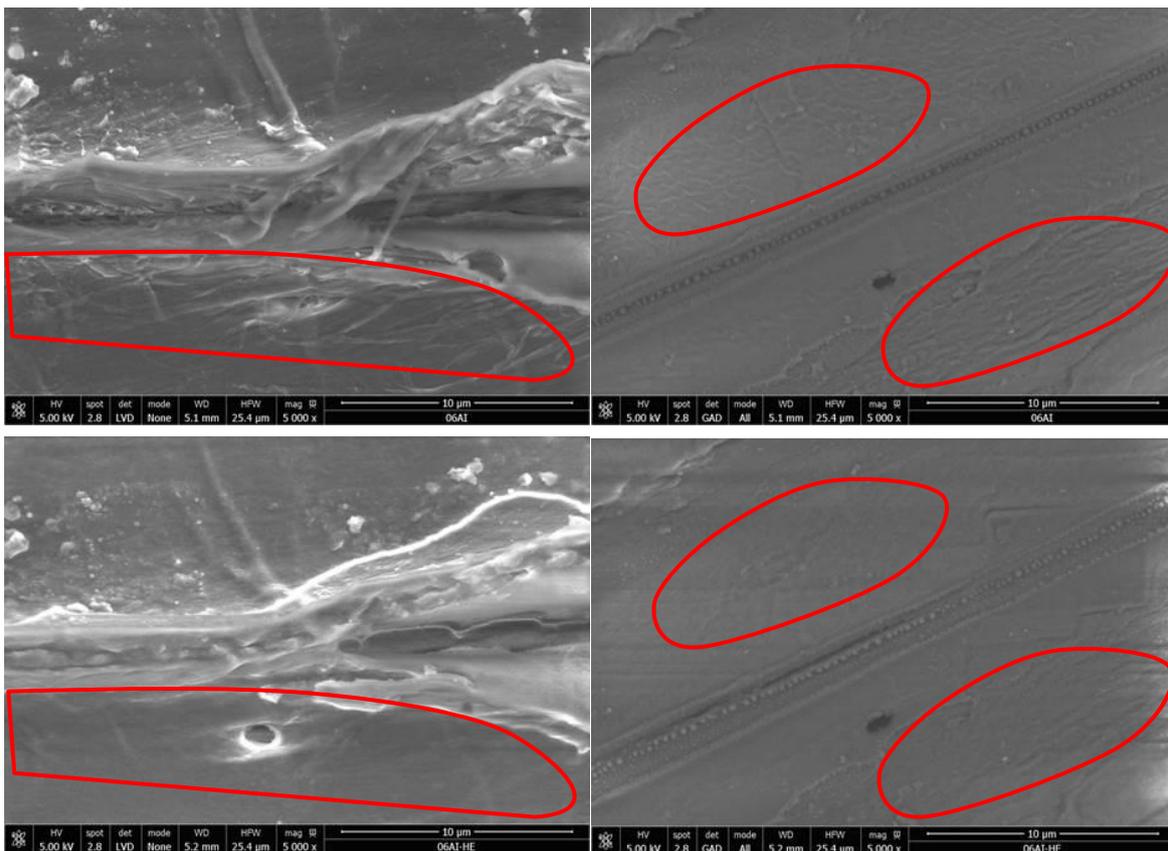


Figure 180 : Zone observée avant et après hydrolyse enzymatique, montrant un lissage des surfaces au cours de la dégradation

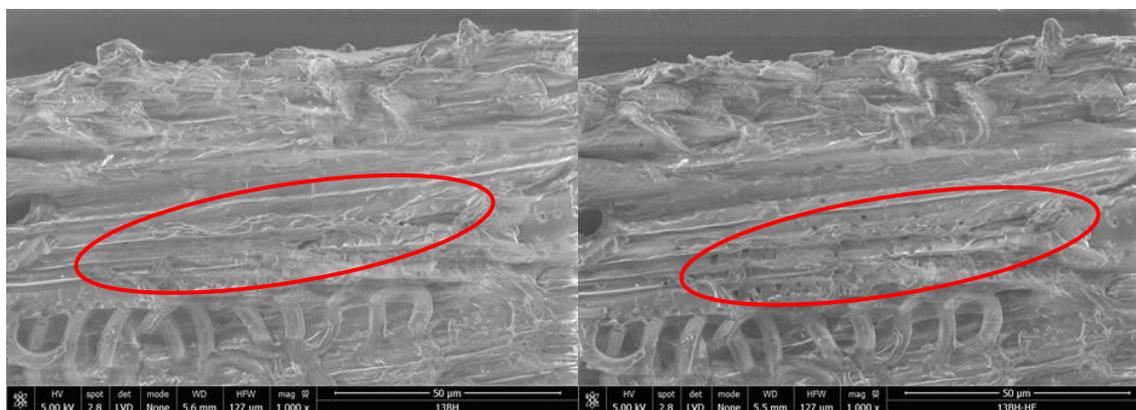


Figure 181 : Zone observée avant et après hydrolyse enzymatique, montrant l'apparition des ponctuations mises à découvert au cours de la dégradation

4. Stabilité des substrats lignocellulosiques immergés sans enzymes

Un prototype de visualisation fabriqué par l'INRA de Nantes-Angers a servi à visualiser de la paille native non traitée et une paille de blé explosée à la vapeur (échantillon industriel, prétraité de manière optimale) en condition d'hydrolyse, c'est-à-dire en milieu aqueux sous agitation et à 50 °C, mais sans enzymes. Ceci a été entrepris afin de voir comment évoluent ces substrats lors de l'immersion), et pouvoir distinguer ces

évolutions (fragmentation notamment) des évolutions transitoires de l'effet des enzymes Le prototype est un réacteur muni d'une cellule de visualisation éclairée à l'aide de LEDs, d'une agitation et d'une caméra. Une fois le substrat introduit, 10 images sont acquises par temps d'acquisition, entre 0 et 15 min, par pas de 2 min.

La Figure 182 montre une image de paille de blé native et de paille traitée, au temps 0 et à 15 min d'immersion en agitation. On voit qualitativement que la paille native est peu désagrégée à la suite de l'immersion, alors que la paille traitée s'est largement désagrégée en fine particules.

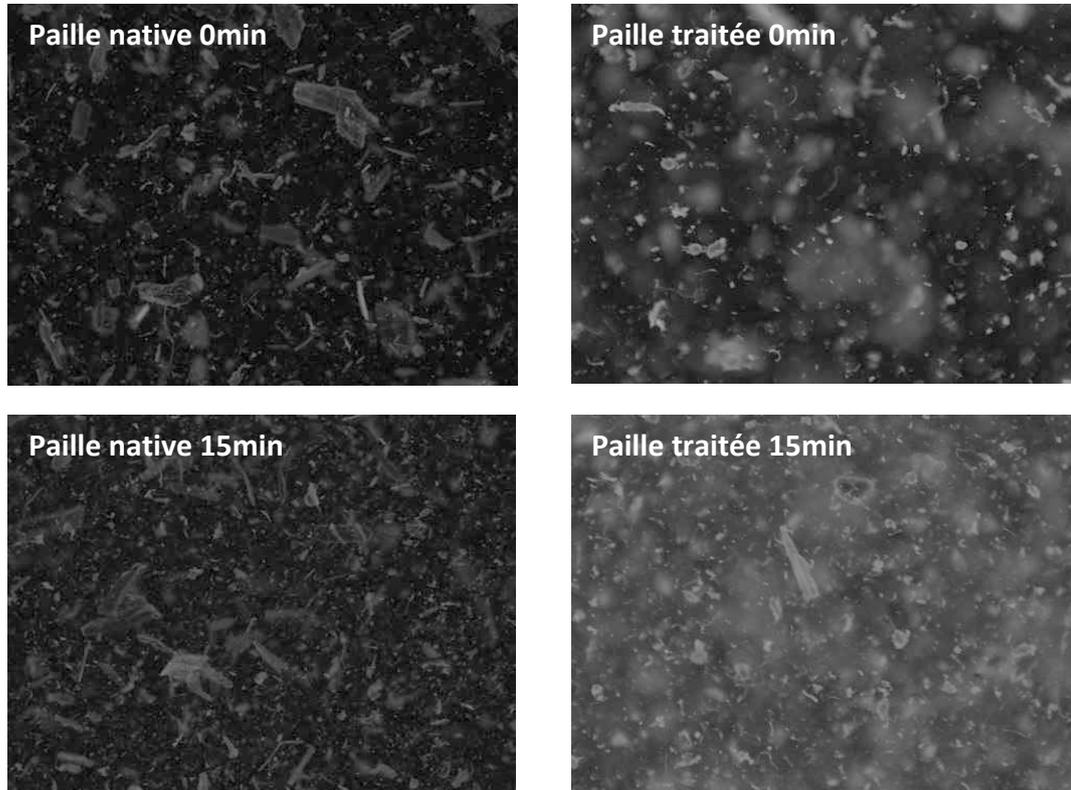


Figure 182 : Exemple d'image au temps 0 (haut) et à 15 min (bas) d'immersion de paille native (gauche) et traitée (droite), en l'absence d'enzymes. Champs de vue : 10X13,3 mm (paille native) et 5,3X7 mm (paille traitée)

Pour suivre plus quantitativement ces évolutions, on considère les histogrammes moyens des 10 images par temps d'acquisition (niveaux de gris codés sur 256 valeurs, 0 étant le noir, et 255 le blanc), pour chaque temps et pour les deux substrats. En effet, l'évolution des niveaux de gris est un bon indicateur de la dispersion de la matière, et donc indirectement, de la granulométrie (plus l'image devient blanche, plus il y a de particules fines présentes). La Figure 183 montre l'évolution de ces histogrammes au cours du temps. On constate effectivement une dégradation physique du substrat traité, pour lequel la distribution des niveaux de gris s'étale (phénomène dispersif), et se décale vers les hauts niveaux de gris, c'est-à-dire témoigne de l'augmentation du nombre de particules fines dans le milieu. Chez la paille native, ce phénomène est beaucoup moins observé, ce qui montre que la paille native est beaucoup plus stable structurellement que son homologue traité.

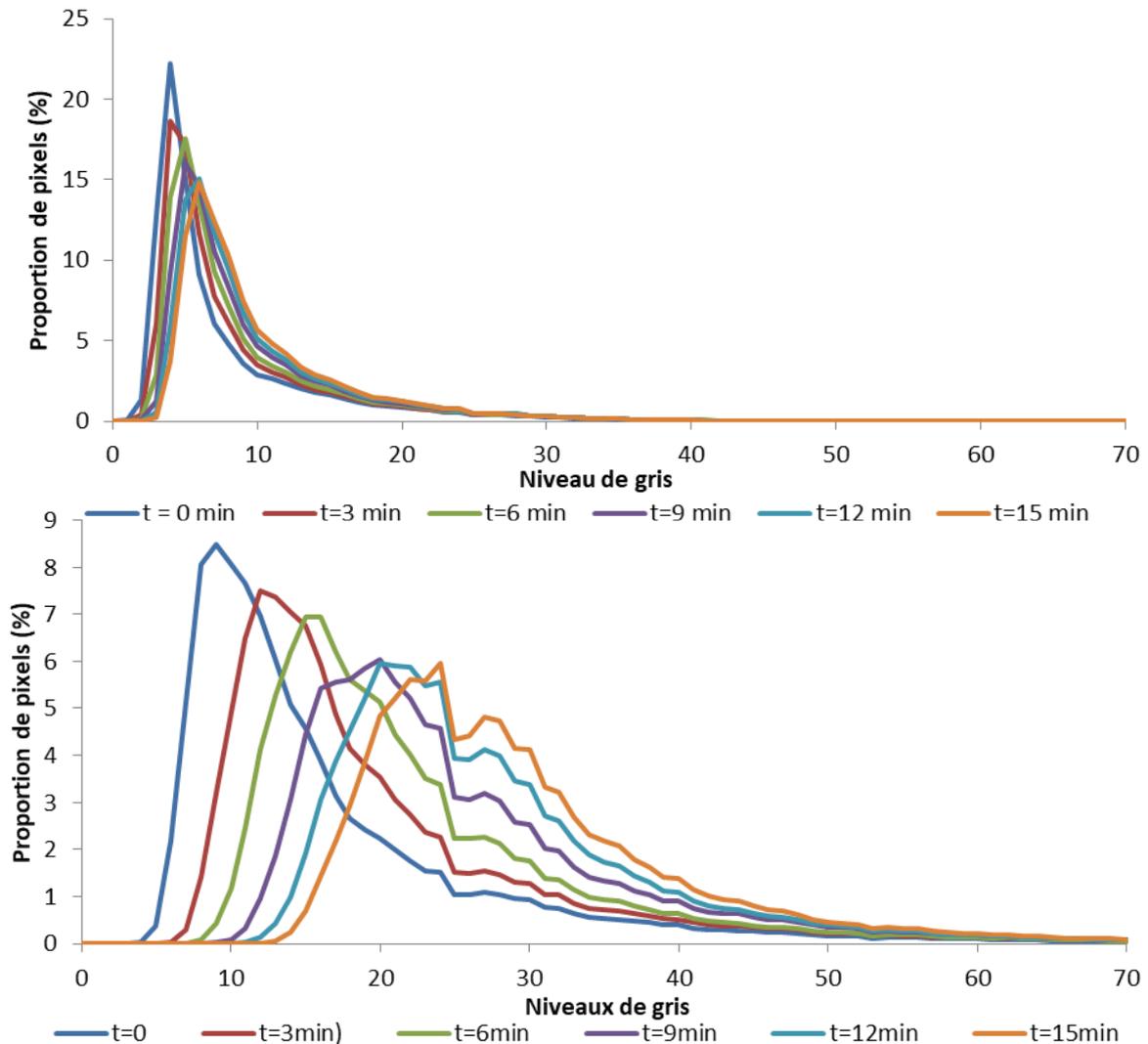


Figure 183 : Histogrammes de la paille native (haut) et de la paille traitée (bas) au cours du temps

5. L'autofluorescence UV-VIS des stomates

Les stomates présentent une fluorescence bleue (par excitation UV, associée à la présence d'acides hydroxycinnamiques) plus intense au niveau des cellules de garde que sur le reste de l'épiderme. On montre en Figure 184 un fragment d'analyse observé au microscope à autofluorescence UV-VIS de l'échantillon A020C. Ces orifices étant le siège des échanges gazeux avec le milieu extérieur, on peut supposer que la présence des acides hydroxycinnamiques participe à contrôler l'entrée de microorganismes pathogènes sous formes d'aérosols (spores).

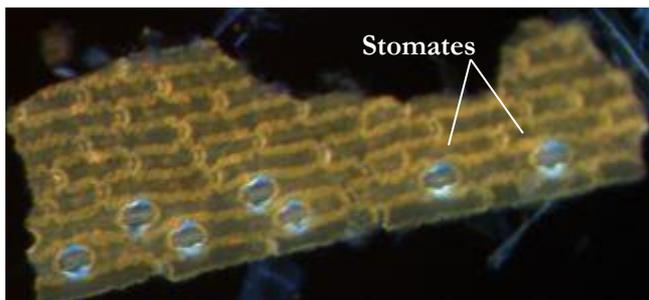


Figure 184 : Image d'autofluorescence d'un fragment d'épiderme, avec ses stomates en bleu. L'image est la somme des contributions émises dans les canaux rouge, vert, et bleu, pour les quatre excitations utilisées : UA, UB, bleue, et verte. Pour rendre les couleurs un peu plus comparables, la somme du canal bleu est divisée par 2 (l'émission bleue n'est possible que pour 2 des 4 excitations), la somme du canal vert est divisée par 3 (l'émission verte n'est possible que pour 3 des 4 excitations), et la somme du canal rouge est divisée par 4 (l'émission rouge est possible pour les 4 excitations)

6. La contribution des tissus non lignifiés dans le rendement en glucose

La biomasse est connue pour présenter des tissus cellulosiques digestes et des tissus ligneux indigestes à l'état natif. Pour estimer la part du rendement en glucose qui est attribuée à la digestion des tissus cellulosiques, une hydrolyse enzymatique d'une coupe transversale de tige de blé non traitée a été réalisée en observation macroscopique (imagerie de type fond clair). Les images au temps initial et au temps final (environ 2 h de dégradation avec une concentration en enzymes élevée, 80 fois supérieure à celle réalisée en hydrolyse standard) ont ensuite été segmentées de manière binaire à l'aide d'une seuillage de type moyenne, effectué *via* le gratuiciel ImageJ.

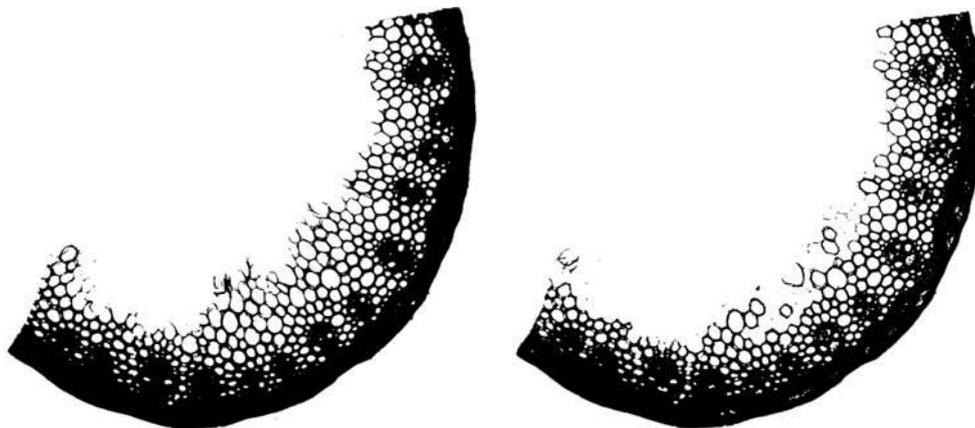


Figure 185 : Segmentation d'une image de macrovision, avec un seuillage moyen, sur une coupe transversale de paille de blé, observée avant et après hydrolyse enzymatique

Le rapport du nombre de pixels de ce fragment entre avant et après hydrolyse enzymatique indique une perte de surface de 5 %. En supposant que l'entrecœur soit représentatif de la paille dans son entièreté (sachant que de manière moins abondante mais tout de même significative, la tige de blé présente une proportion de nœuds plus lignifiés, et de feuilles portées par une gaine foliaire, moins lignifiées dans une proportion moyenne de 40 % pour le blé), et connaissant la proportion de cellulose de la paille native, cela correspond à une perte en cellulose (c'est-à-dire à un rendement en glucose) d'environ 12 %. Sachant que le rendement maximal (quand $t \rightarrow +\infty$) de conversion de la paille native en hydrolyse standard est de 15 %, la conversion des tissus cellulosiques explique à elle seule la quasi-totalité du rendement glucose de la paille native. Cela suggère que seuls les tissus réputés non lignifiés sont digérés dans les premières heures de saccharification à forte charge enzymatique.

Visuellement, les tissus non ligneux ne semblent absolument pas modifiés au niveau de leur aspect, forme etc., ce qui rend cette hypothèse d'autant plus crédible. Par le fait que les tissus lignifiés, en particulier le sclérenchyme, sont très denses et hydrophobes, on peut se demander si l'eau arrive à imprégner l'intérieur des parois, voire même simplement le lumen.

7. Expérimentations synchrotrons : analyse des tissus minoritaires des échantillons C020C et D020C

Les épidermes

Les profils d'intensités de fluorescence d'enzymes et l'évolution de l'amincissement sont reportés sur la Figure 186. Pour chaque profil, on note une phase d'adsorption suivie d'une phase de désorption, même lorsque les intensités mesurées sont faibles. Le signal de l'imagerie en transmission confirme l'efficacité des enzymes, par l'augmentation de l'intensité de transmission mesurée au cours du temps (Figure 186b). L'évolution de l'amincissement relatif A_r , en fonction des sommes des intensités de fluorescence d'enzymes dynamiques ΣI_{dynam} , est indiquée en Figure 186c.

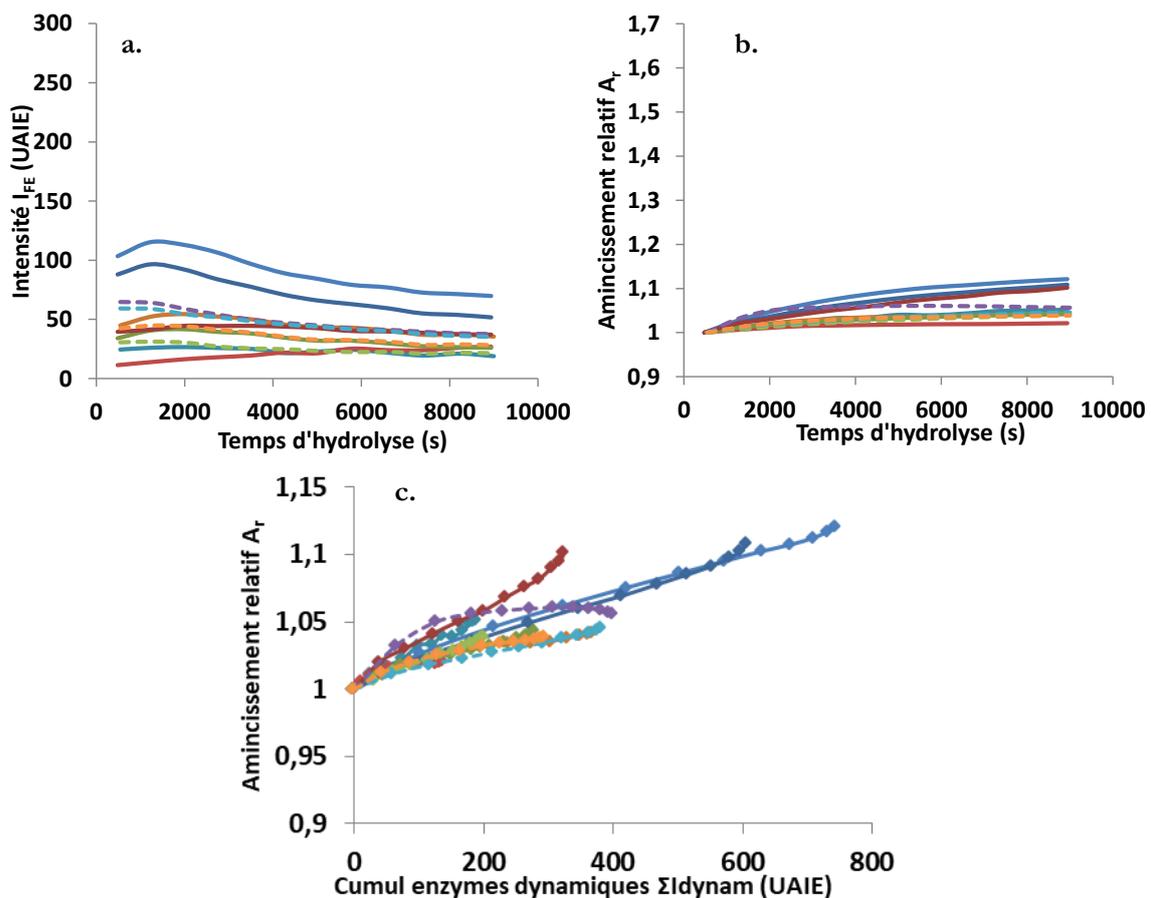


Figure 186 : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents épidermes observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et en amincissement A_r (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C. Evolutions des amincissements relatifs en fonction des sommes ΣI_{dynam} pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments d'épiderme de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des t_i , compris entre t_1 et t_{12}

Cette évolution met en évidence la digestibilité partielle de ces fragments d'épiderme mesurés. Les pentes de ces courbes sont du même ordre de grandeur (de 1,1 à $2,8 \cdot 10^{-4}$ UAIE⁻¹), ce qui traduit *a priori* une efficacité similaire des enzymes à l'hydrolyse de ces tissus (pour une même quantité d'enzymes adsorbées).

Les parenchymes non lignifiés

Les parenchymes non lignifiés des coupes des échantillons C020C et D020C ont été analysés. Etant moins présents que dans le cas de l'échantillon A020C, ils ne comptent pas comme une proportion significative du matériel lignocellulosique des deux échantillons (ils étaient déjà présents en minorité dans l'échantillon A020C). Les profils de fluorescence d'enzyme et de transmission des différentes mesures sont représentés dans la Figure 187a et b. Le premier constat est que la plupart de ces fragments voient leur pic d'adsorption avant que ne démarre la série d'acquisition. Les évolutions des I_T corrigées au cours de l'adsorption efficace d'enzyme (Figure 187c) sont très rapides, ce qui signifie qualitativement qu'à adsorption égale d'enzymes, la conversion de cellulose est importante pour une durée donnée de saccharification.

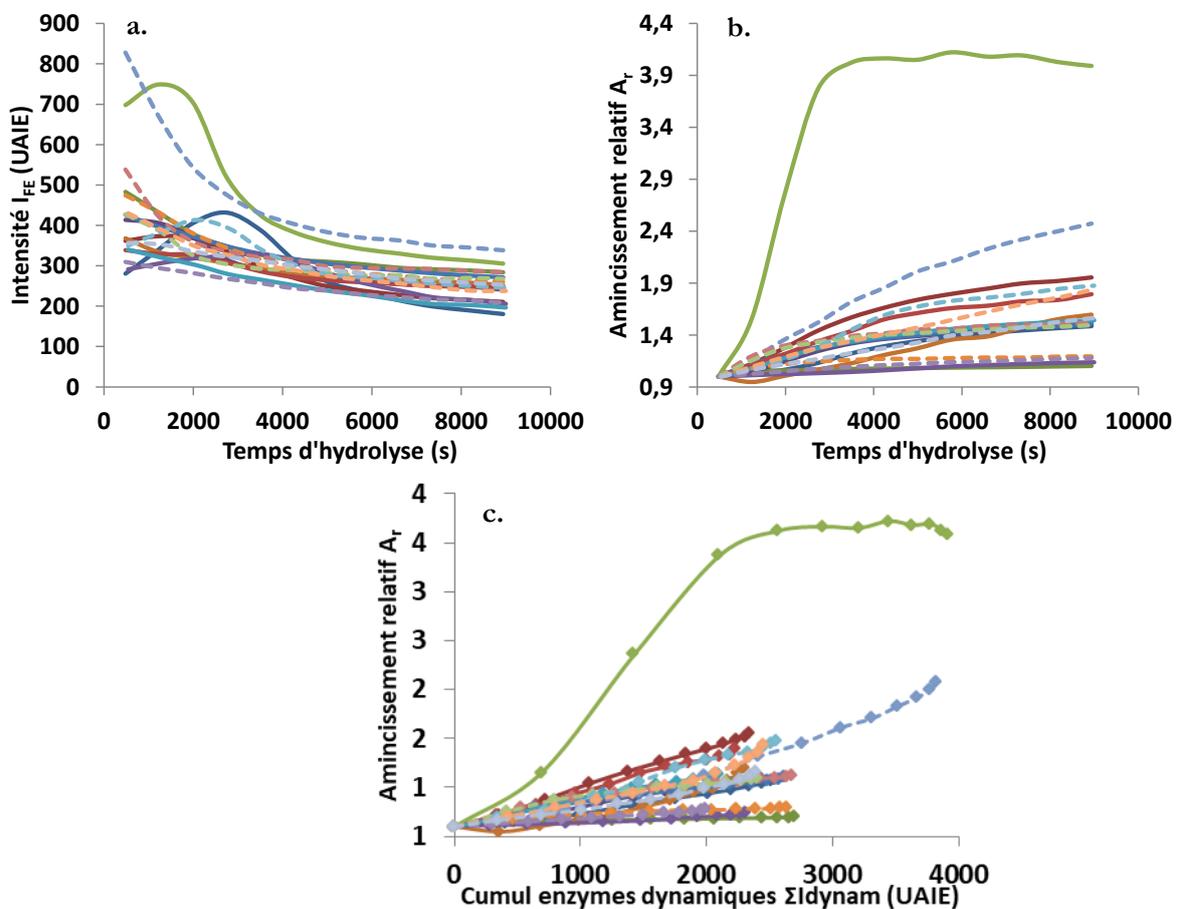


Figure 187 : a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents fragments de parenchymes non lignifiés observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et en amincissement relatif A_r (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des amincissements relatifs A_r en fonction du cumul des enzymes productives ΣI_{dynam} , pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments de parenchymes non lignifiés de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des t_b , compris entre t_1 et t_{12}

Title :

Physico-chemical descriptors of lignocellulosic biomass in enzymatic hydrolysis: towards an in situ characterisation

Keywords :

Physicochemical characterisation, lignocellulosic biomass, dilute-acid pretreatment, steam explosion, enzymatic hydrolysis

Abstract :

One of the paths that are envisioned to reduce the environmental footprint of human's activities in the field of the transportation is about ethanol production from lignocellulosic biomass. Amongst all the different processes that are projected to convert such substrates made of cellulose, hemicelluloses, and lignin, the bioconversion process into ethanol represents a promising option since it is quite mature, and ethanol is readily usable in the current gas-cars fleet. The pretreatment step that aims at making cellulose more accessible and more digestible to the enzymatic hydrolysis still needs improvements in order to make this process economically viable.

To study the relations between operating conditions, physicochemical modifications, and their effects on substrates' digestibility, a wide range of samples with a high variability of their physicochemical parameters was needed. Samples were produced from a wheat straw that was dilute-acid and steam exploded with a wide range of operating conditions. Multi-technique and multi-scale analyses led to a precise characterisation of the physicochemical effects provoked by the pretreatment. These results also allowed identifying key substrate parameters that are responsible for the substrate enzymatic digestibility. Based on the observations, an empirical model was proposed to express the substrate digestibility as a function of these critical parameters. Finally, in situ monitoring of tissue degradation and enzyme adsorption-desorption on plant tissues during saccharification was carried using UV-autofluorescence microscopy. Thanks to these experiments, hydrolysis mechanisms on pretreated matrices are now better understood, and depend upon pretreatment operating conditions.

Titre :

Descripteurs physicochimiques de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in-situ

Mots-clés :

Caractérisation physico-chimique, biomasse lignocellulosique, prétraitement à l'acide dilué, explosion à la vapeur, hydrolyse enzymatique.

Résumé :

Une des pistes envisagées pour réduire l'impact environnemental des activités humaines dans le secteur des transports est la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Parmi les différentes technologies envisagées pour ces substrats constitués majoritairement de cellulose, d'hémicelluloses, et de lignine, le procédé de conversion biochimique en éthanol représente une voie prometteuse, par la maturité relative de la filière, et la faisabilité immédiate de l'incorporation d'éthanol dans l'essence pour le parc automobile actuel. L'étape de prétraitement qui a pour but de rendre la cellulose plus accessible et plus digeste à l'étape d'hydrolyse enzymatique doit encore être optimisée afin de rendre économiquement viable ce procédé.

Afin d'étudier les liens entre les conditions opératoires de prétraitement, les modifications physicochimiques apportées, et leurs effets sur la digestibilité des substrats, une palette d'échantillons avec une forte variabilité de paramètres physicochimiques était nécessaire. Ils ont été produits à partir d'une paille de blé prétraitée par cuisson acide et explosion vapeur avec une large gamme de paramètres opératoires. Une caractérisation multi-échelle et multi-technique a permis de connaître précisément les modifications physicochimiques opérées par le prétraitement. Ces résultats ont permis d'identifier les descripteurs pertinents permettant d'expliquer la réactivité d'un substrat en hydrolyse enzymatique. Un modèle empirique a ainsi pu être proposé pour traduire la réactivité de ces substrats prétraités en fonction des paramètres clés identifiés. Enfin, le suivi in situ au cours de l'hydrolyse enzymatique de la dégradation de la matrice et de l'adsorption des enzymes sur les tissus par microscopie à autofluorescence UV a permis de mieux appréhender les mécanismes d'hydrolyse de la biomasse prétraitée, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement.