

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.

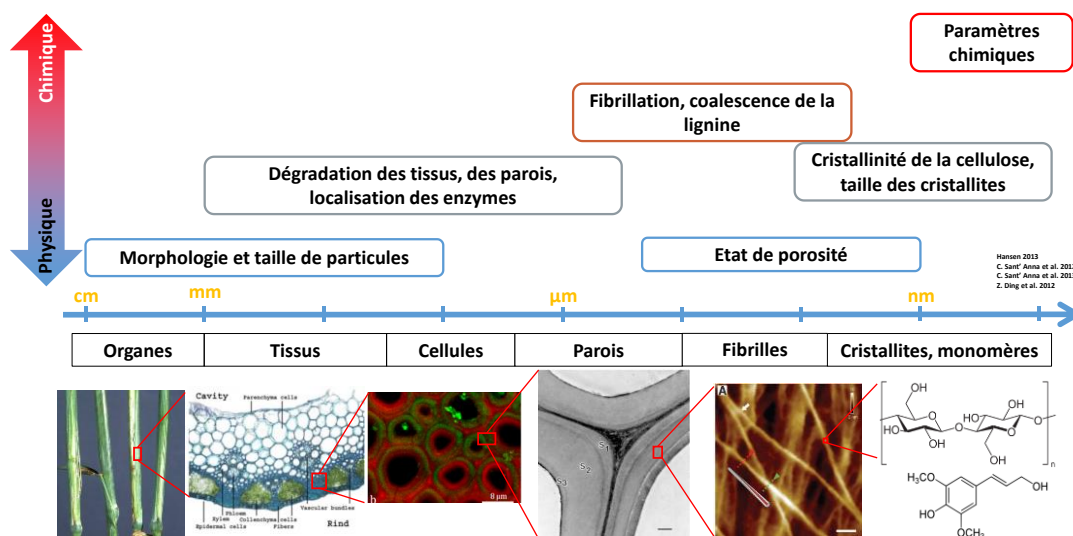


Figure 32 : Principaux paramètres étudiés pour la caractérisation de paille de blé prétraitée. Images tirées de la littérature [24,130,131,232]

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

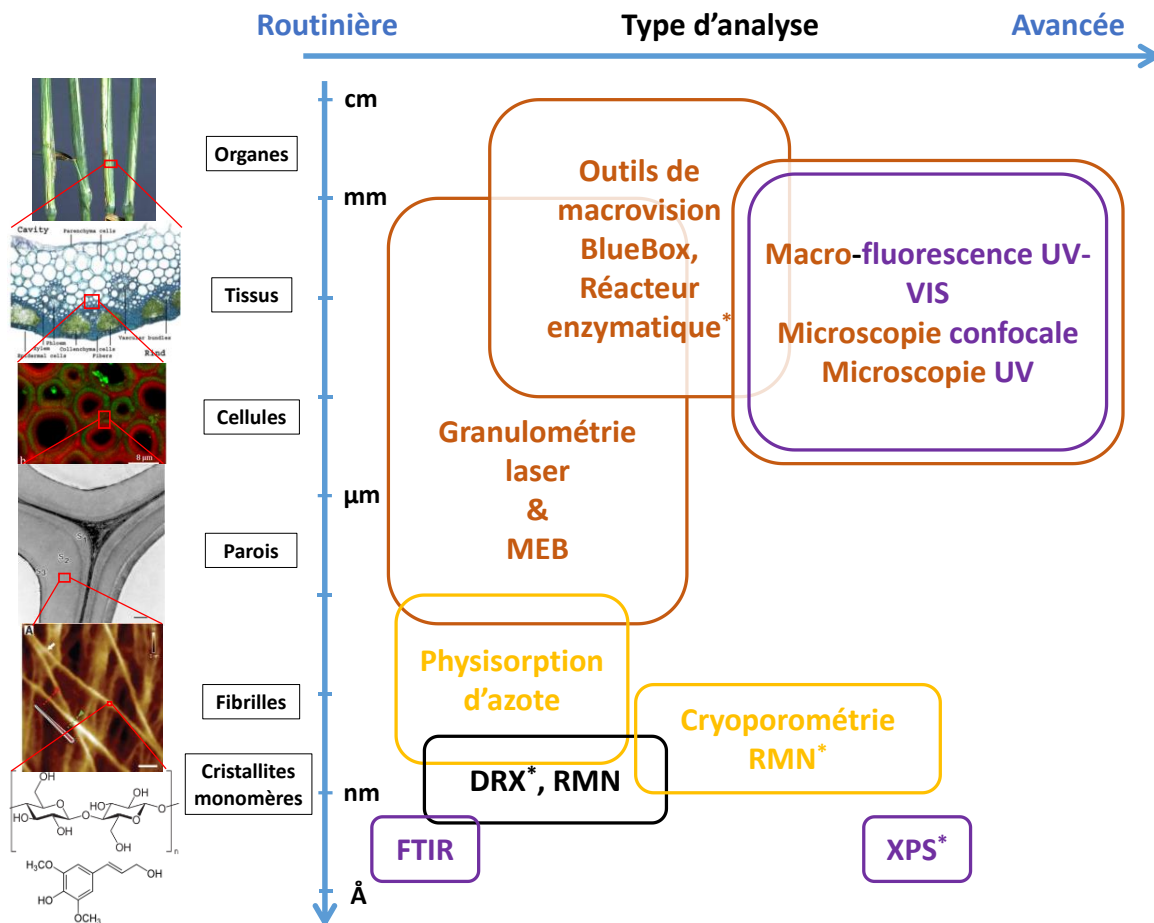
La stratégie de recherche adoptée dans le cadre de ces travaux de recherche s'articule en différentes étapes :

- **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

Etat de porosité
Morphologie, taille particule
Chimie
Structure cristalline

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 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 (μmol.min⁻¹.mg⁻¹)	1,2	0,1
Activité β-glucosidases² (μmol.min⁻¹.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 μ L de cocktail GC220 (6 mg de protéine/g de cellulose).
- 70 μ L 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 μ mol 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 μ mol 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'adsorbé 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.

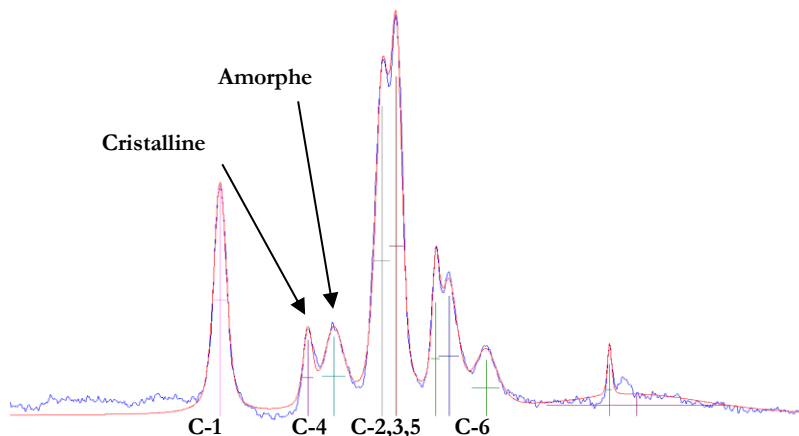


Figure 34 : Attributions des pics du domaine de la cellulose

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'autofluorescence 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'autofluorescence 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.

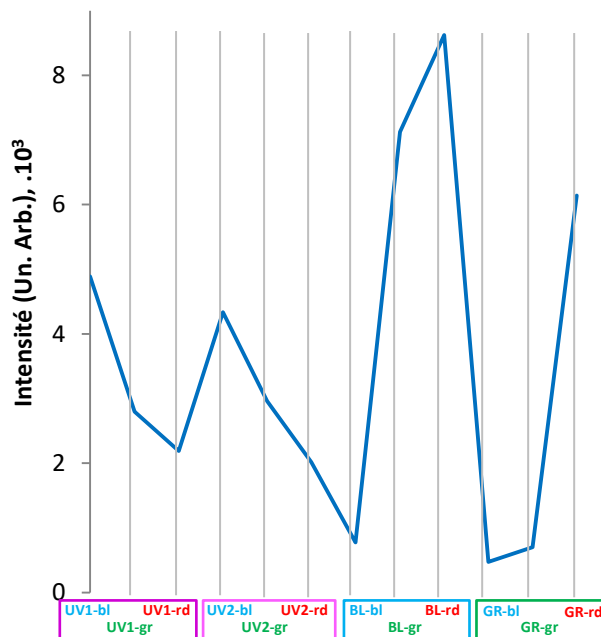


Figure 37 : Profil moyen de fluorescence de l'image multispectrale de l'acquisition de la fluorescence de la pastille de paille native

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'autofluorescence, 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.

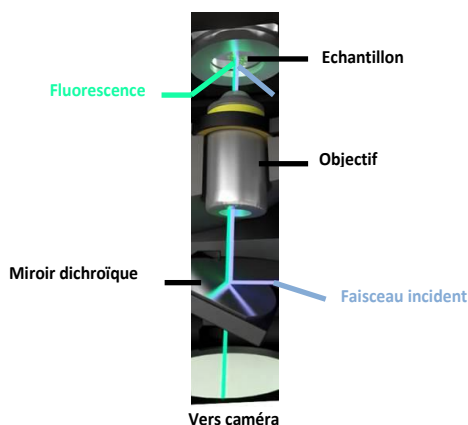


Figure 40 : Représentation du chemin optique au niveau du triplet miroir dichroïque, objectif, échantillon. Adapté d'images de la vidéo de présentation de la ligne de lumière DISCO



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).

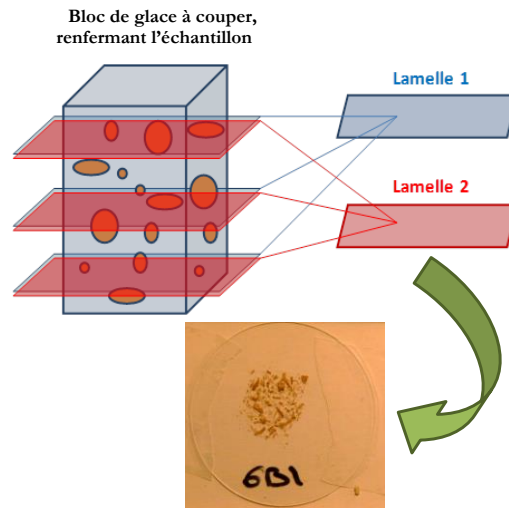


Figure 42 : Coupe en cryo-microtomie déposée sur un lamelle de quartz.

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.

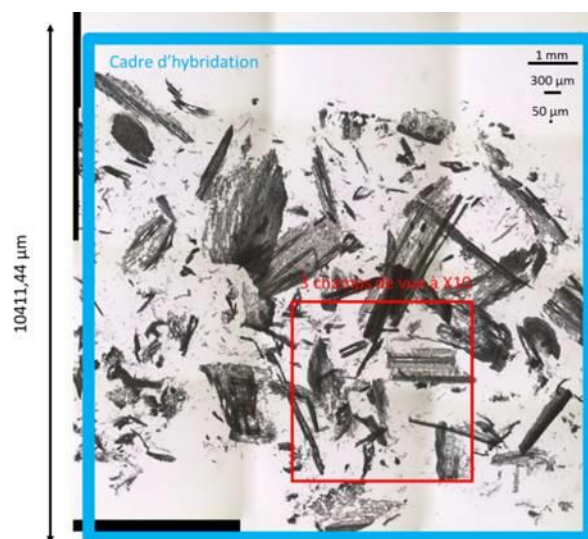


Figure 43 : Coupe cryocoupe observée par macrofluorescence imagerie de type fond clair

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 μ L 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.

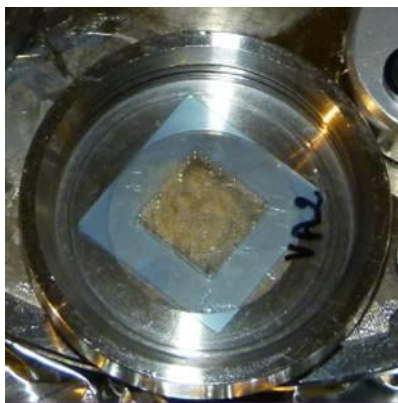


Figure 44 : Photographie de la préparation juste après le dépôt de la goutte et de la deuxième lamelle de quartz

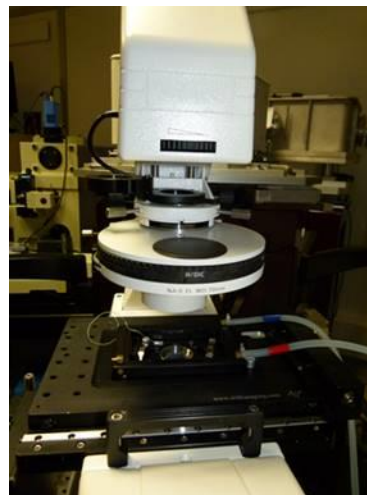


Figure 45 : Photographie de la platine chauffante fixée sur le microscope

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,

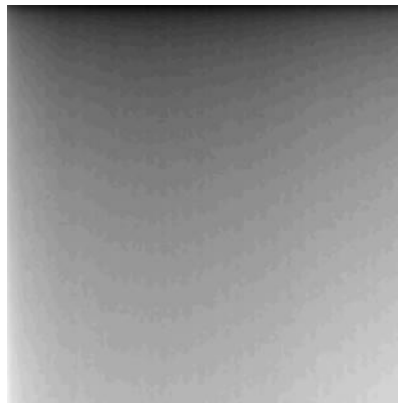


Figure 46 : Fond lié à la caméra modélisé, dont les contrastes sont ici adaptés pour montrer la variabilité spatiale du fond.

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.

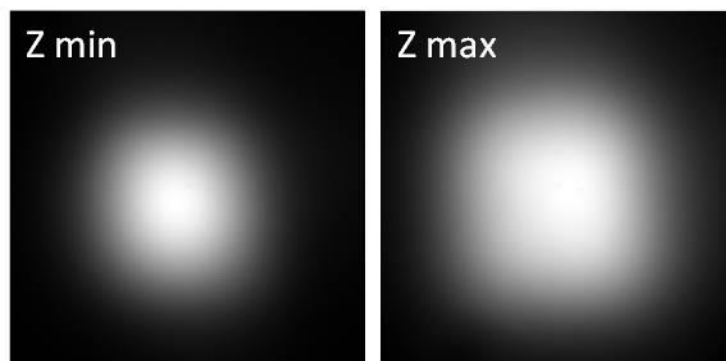


Figure 47 : Première image (gauche) et dernière image (droite) de fonds blancs, parmi les différents fonds acquis à des profondeurs de focalisation différentes.

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).

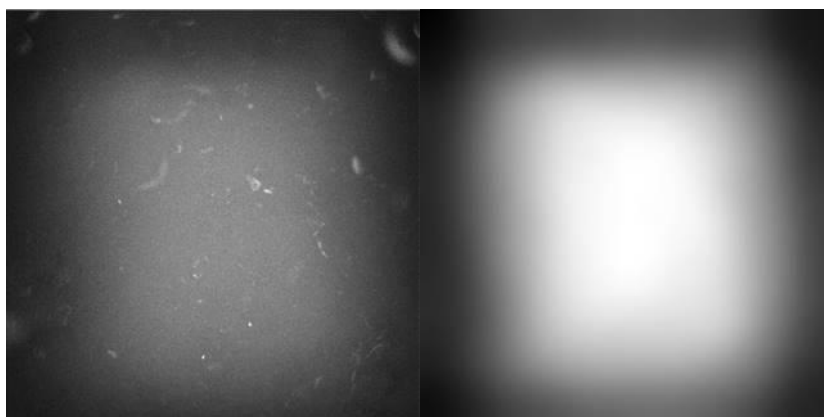


Figure 48 : A gauche, image reconstituée à partir d'une sélection pertinente d'images issue de la série d'images à corriger, en sélectionnant pour chaque pixel, le maximum en intensité obtenu sur les différentes images sélectionnées ; à droite, le fond blanc modélisé sur la base de l'image de gauche.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

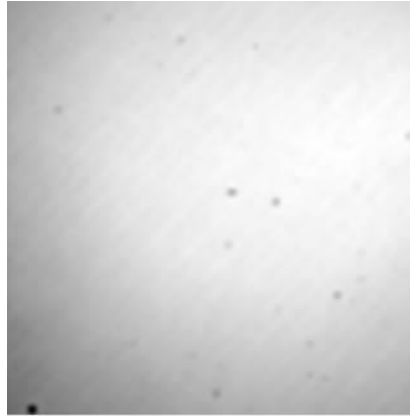


Figure 49 : Fond blanc d'imagerie de type fond clair, reconstitué en considérant pour chaque pixel le maximum d'intensité des différentes images de la série

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.

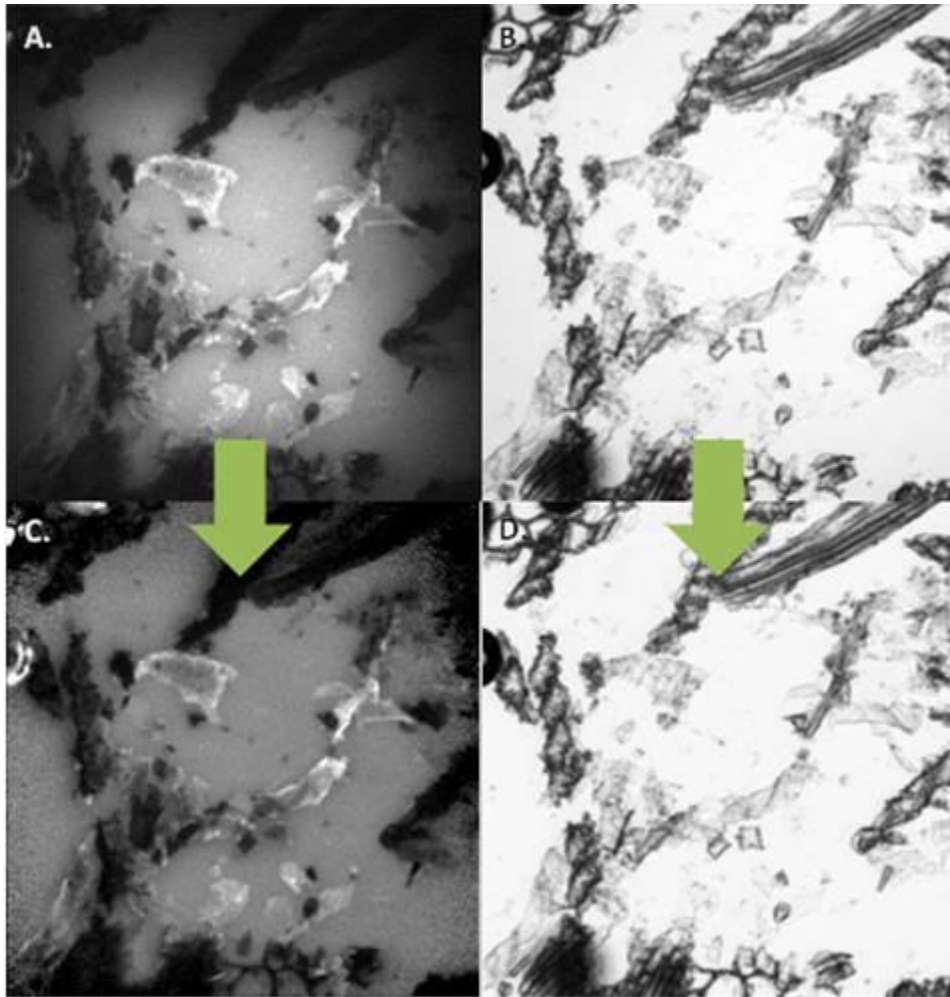


Figure 50 : Exemple de correction d'une image multispectrale individuelle. A gauche, images de fluorescence d'enzymes ; à droite imagerie de type fond clair ; en haut, images brutes ; en bas, images corrigées

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.

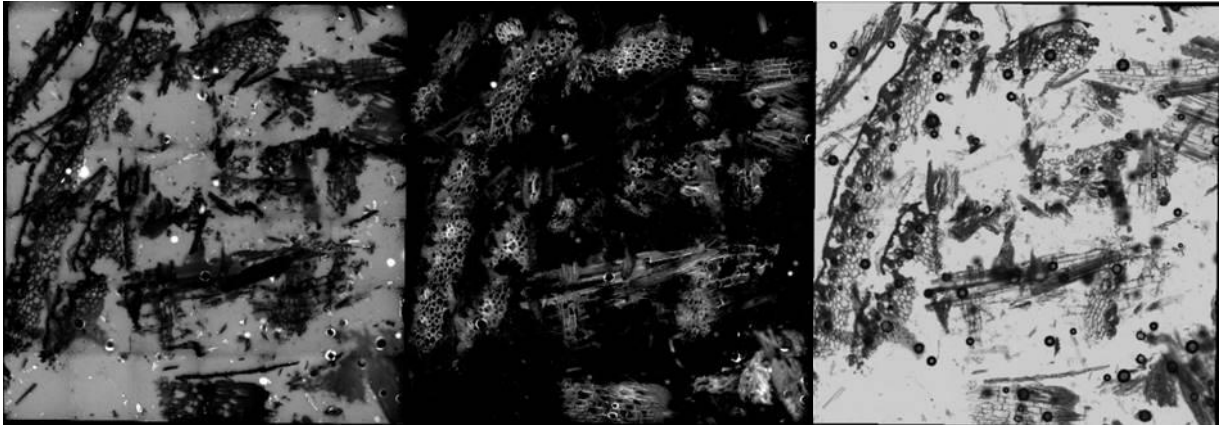


Figure 51 : Première mosaïque de la coupe cryo-micro-tome A020C observée en dégradation enzymatique, dans les canaux de fluorescence d'enzyme (à gauche), de paroi (au centre), et mode fond clair (à droite)

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.

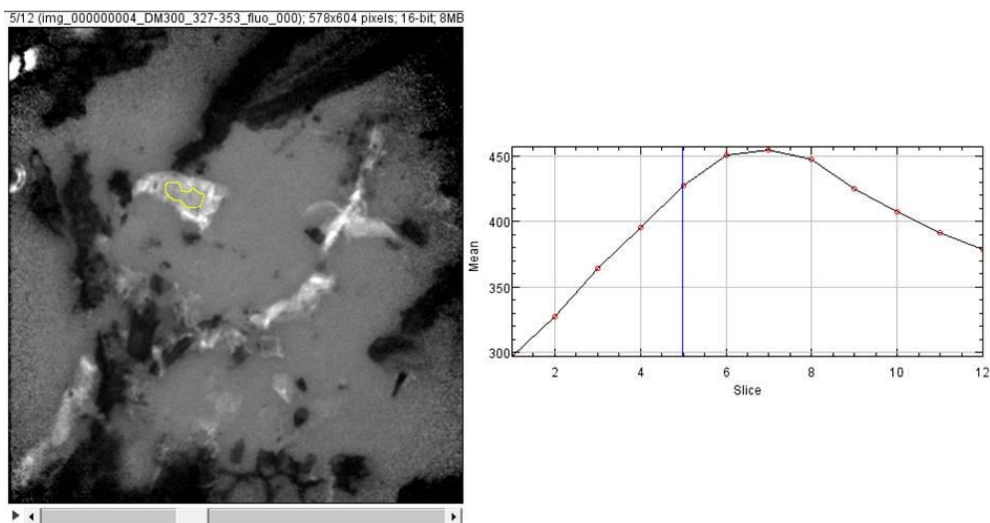


Figure 52 : A gauche, image de fluorescence d'enzymes ; à droite, profil temporel d'intensité de fluorescence associé à la zone délimitée en jaune

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.

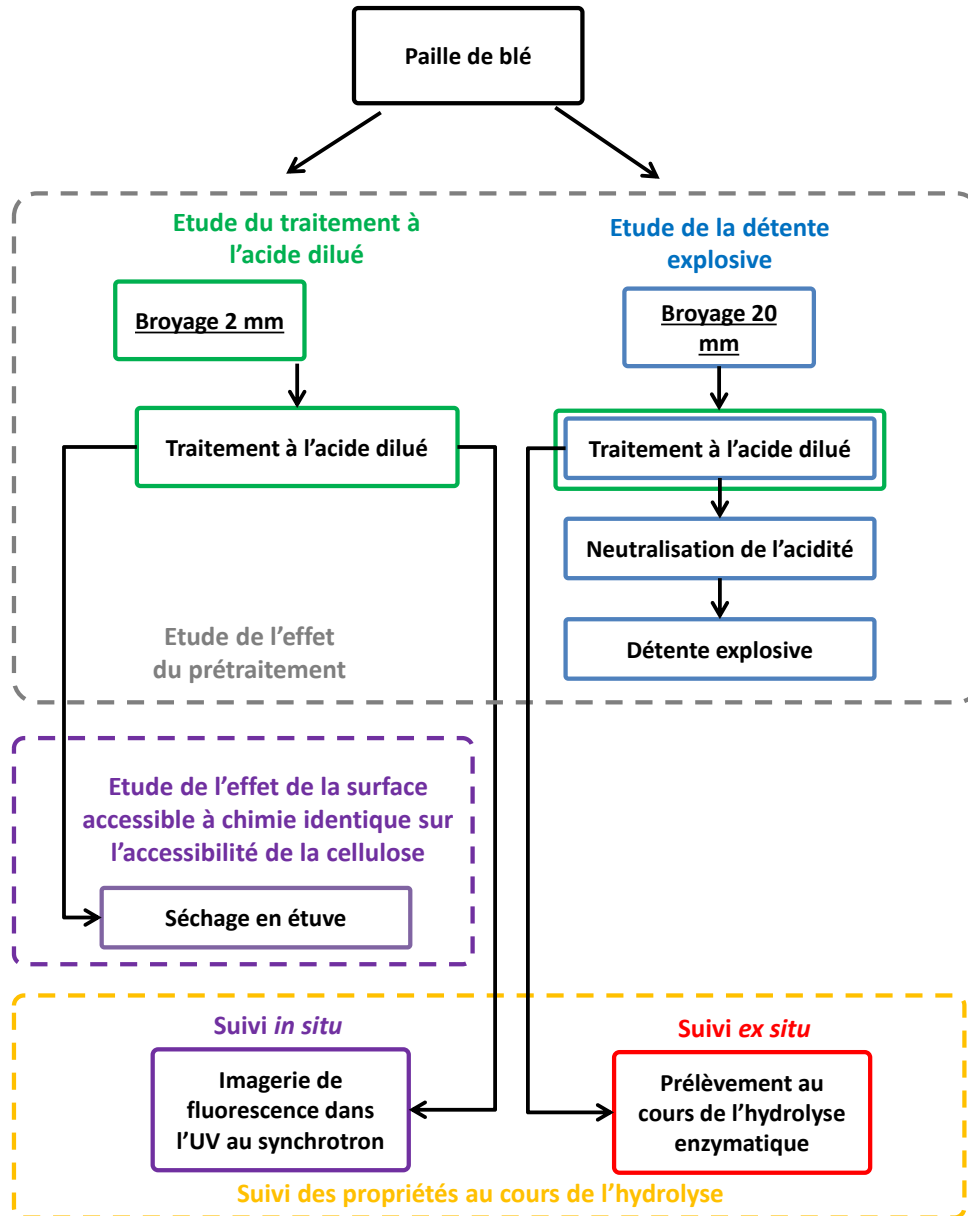


Figure 53 : Représentation schématique de l'organisation des principales études conduites dans cette thèse

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.

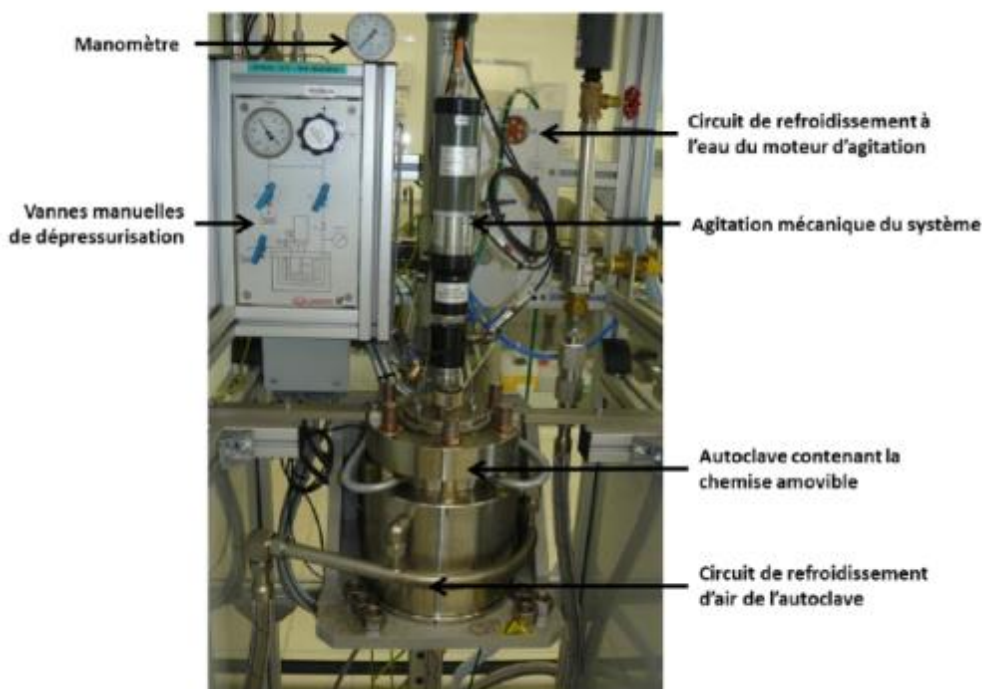


Figure 54 : Photographie de l'unité de prétraitement U868, du manuscrit de C. Loustau Cazalet, 2018

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.

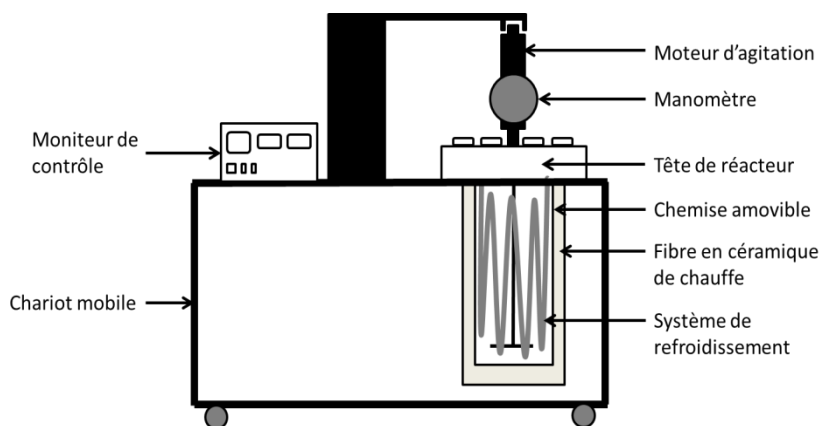


Figure 55 : Représentation schématique de l'unité Parr 4530, du manuscrit de C. Loustau Cazale, 2018

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