

# Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

---

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

## 1. Effets du traitement à l'acide dilué

---

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

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

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

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

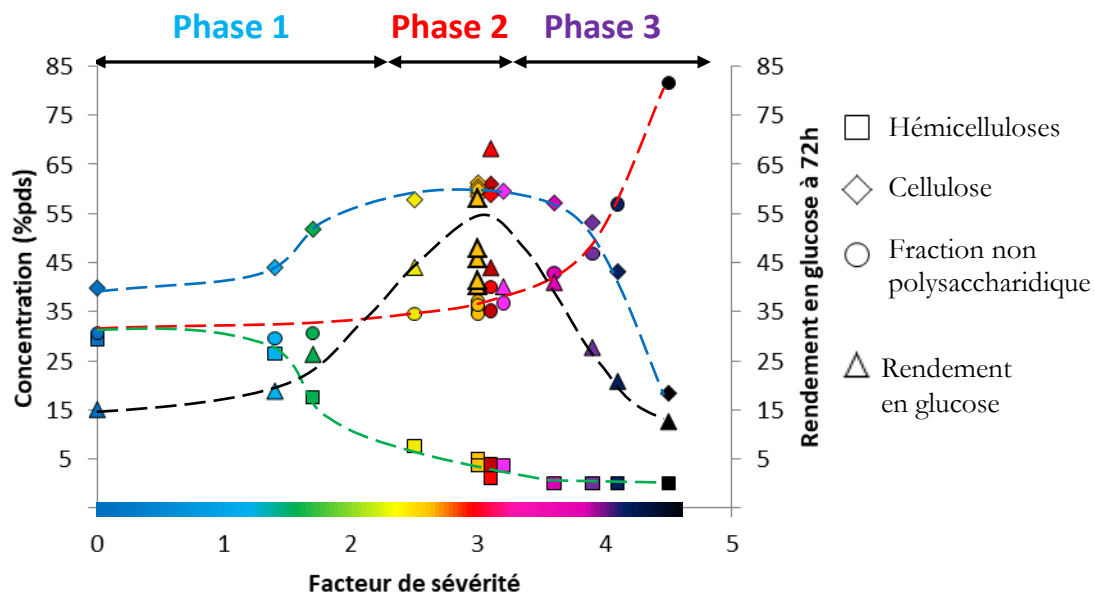


Figure 56 : Evolution de la composition chimique et du rendement en glucose en fonction de la sévérité du prétraitement

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

## b. Propriétés physiques et morphologiques

### *i Modifications macroscopiques : taille de particule et morphologie*

Par imagerie en macrovision de type fond noir :

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

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

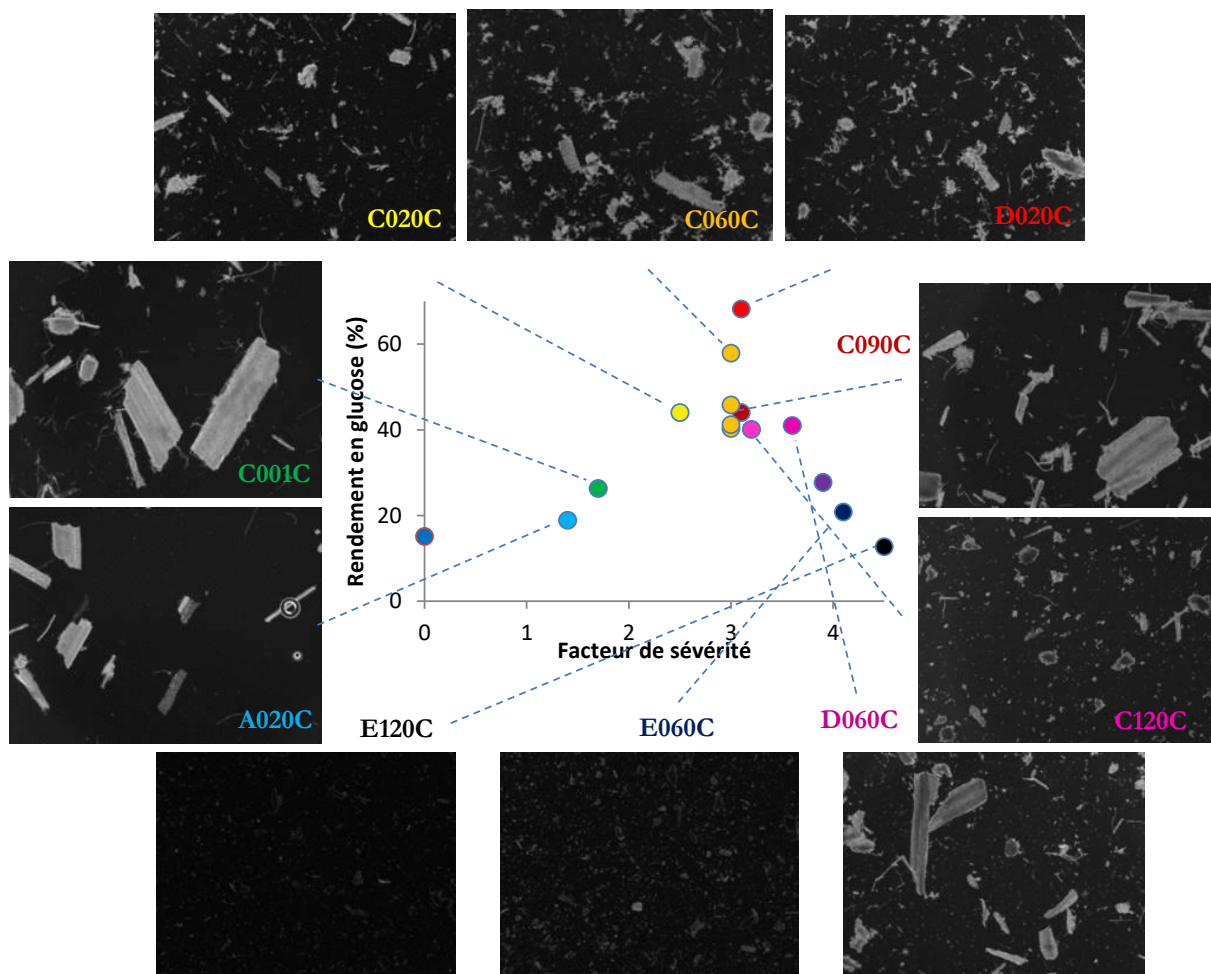


Figure 57 : Images BlueBox permettant de visualiser l'effet morphologique macroscopique du prétraitement sur le substrat. Champ de vue de 5,89x4,429 mm<sup>2</sup>

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

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

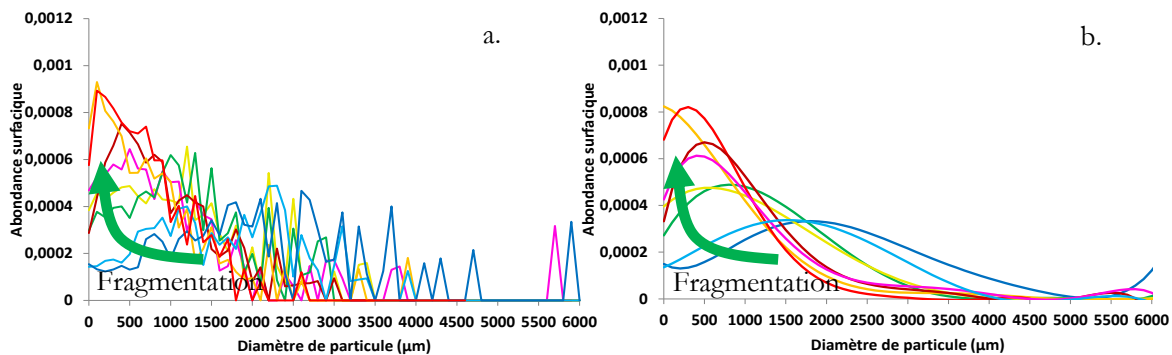


Figure 58. Distribution surfacique en taille de particule (a), interpolations polynomiales de degré 6 des distributions (b)

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

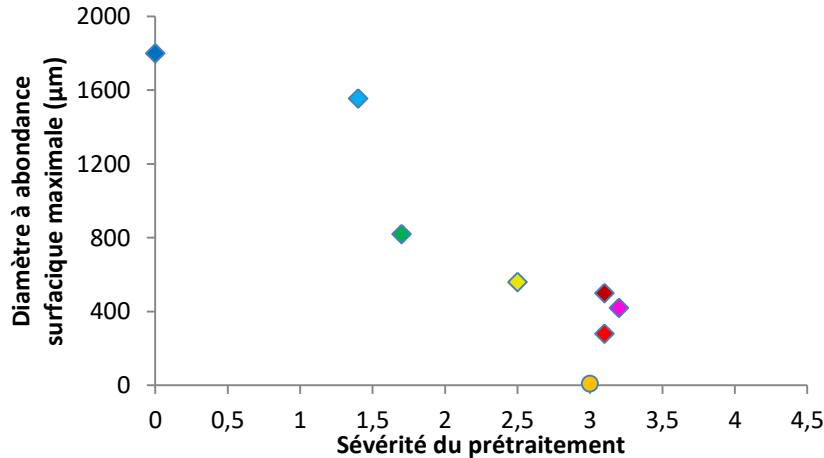


Figure 59 : Evolution du diamètre moyen de particules au maximum d'abondance surfacique, pour les différentes distributions des échantillons analysés

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

### Par granulométrie à diffraction laser

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

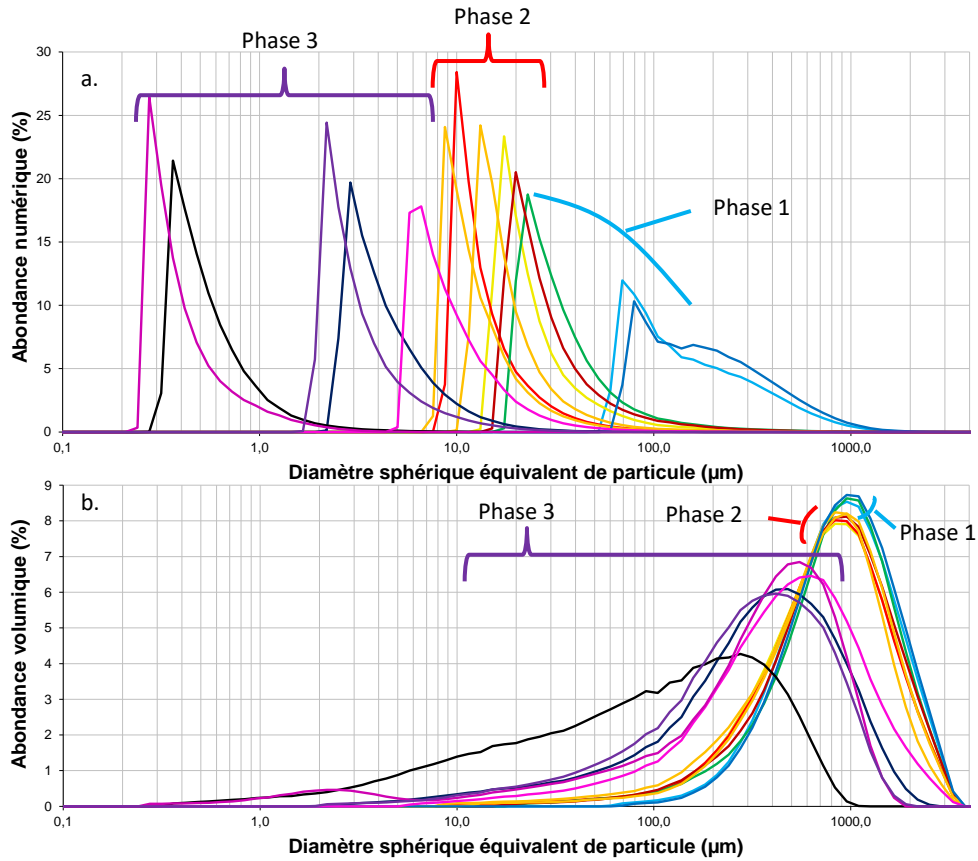


Figure 60 : Distributions granulométriques en abondance numérique (a) et en abondance volumique (b) des échantillons traités à l'acide dilué

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

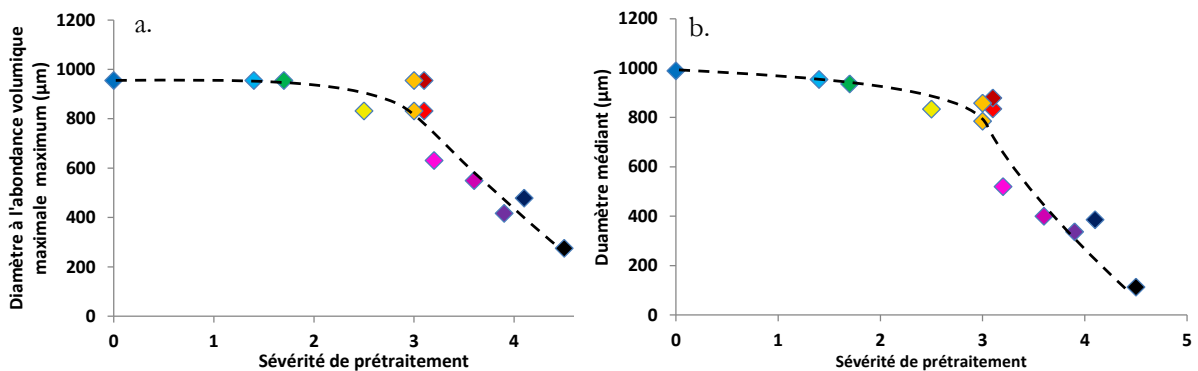


Figure 61 : Evolution du diamètre de particule au maximum d'abondance volumique (a) et du diamètre médian (b) en fonction du facteur de sévérité

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

### Morphologie à l'échelle microscopique par microscopie électronique à balayage

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

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

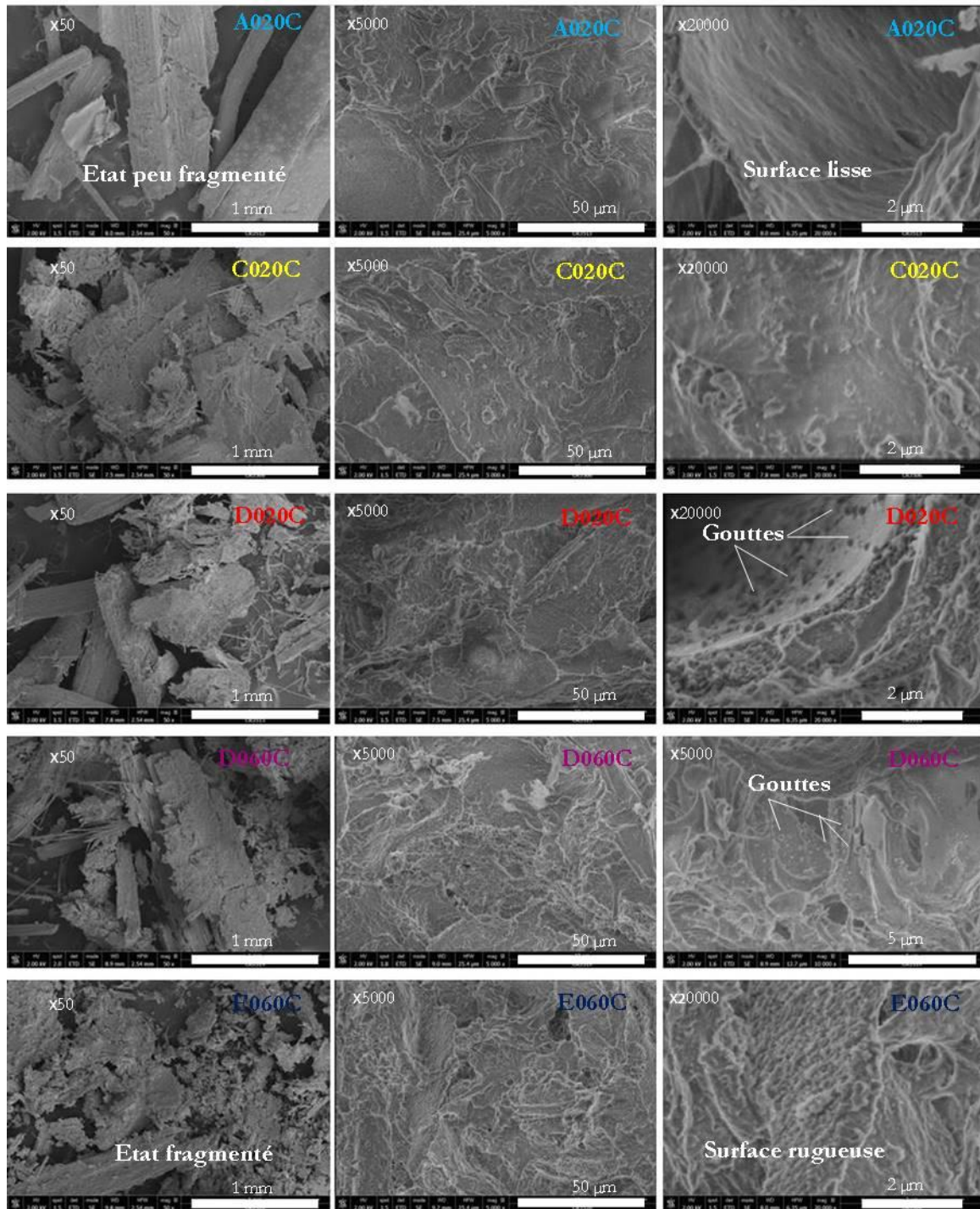


Figure 62 : Clichés MEB des échantillons A020C (A), C020C (B), D020C (C), D060C (D), et E060C (E)

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

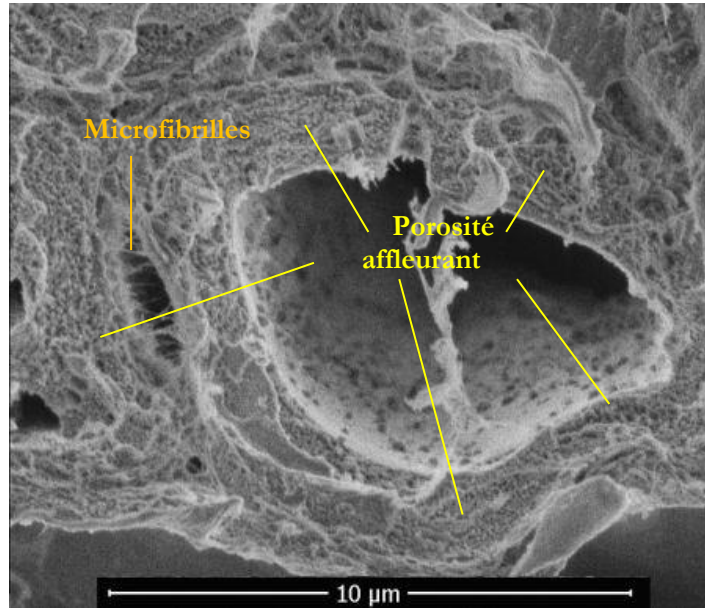


Figure 63 : Exemple de cliché montrant une porosité visible pour l'échantillon D020C dans une paroi secondaire

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

### c. L'état de porosité

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

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

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

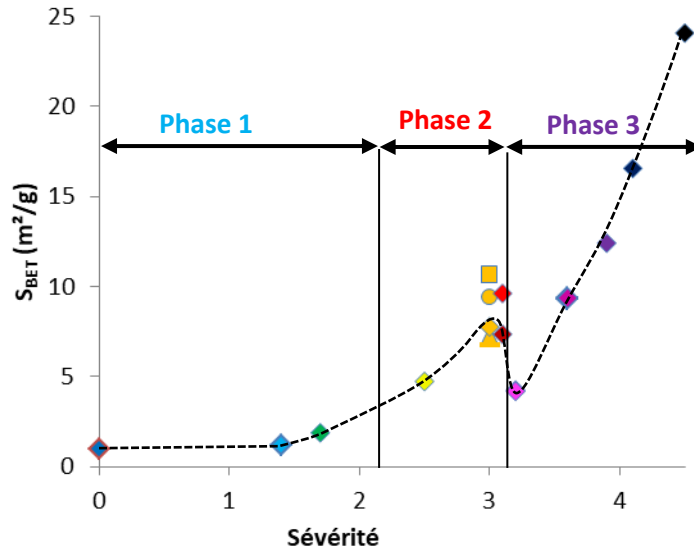


Figure 64 : Evolution de la surface BET en fonction de la sévérité du prétraitement

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

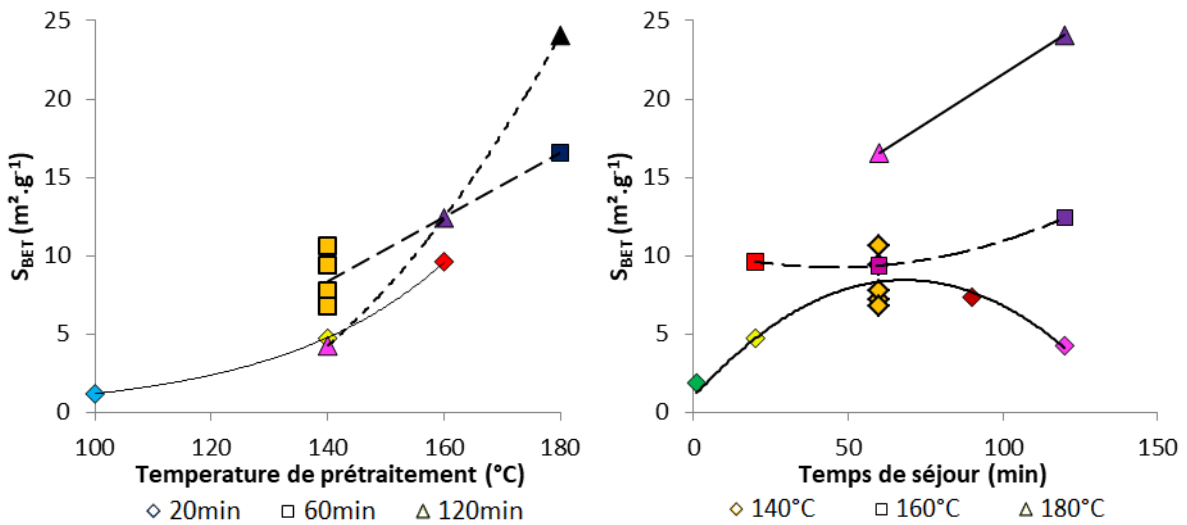


Figure 65 : Evolution de la surface BET en fonction de la température (à gauche) de prétraitement et du temps de séjour (à droite)

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

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

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

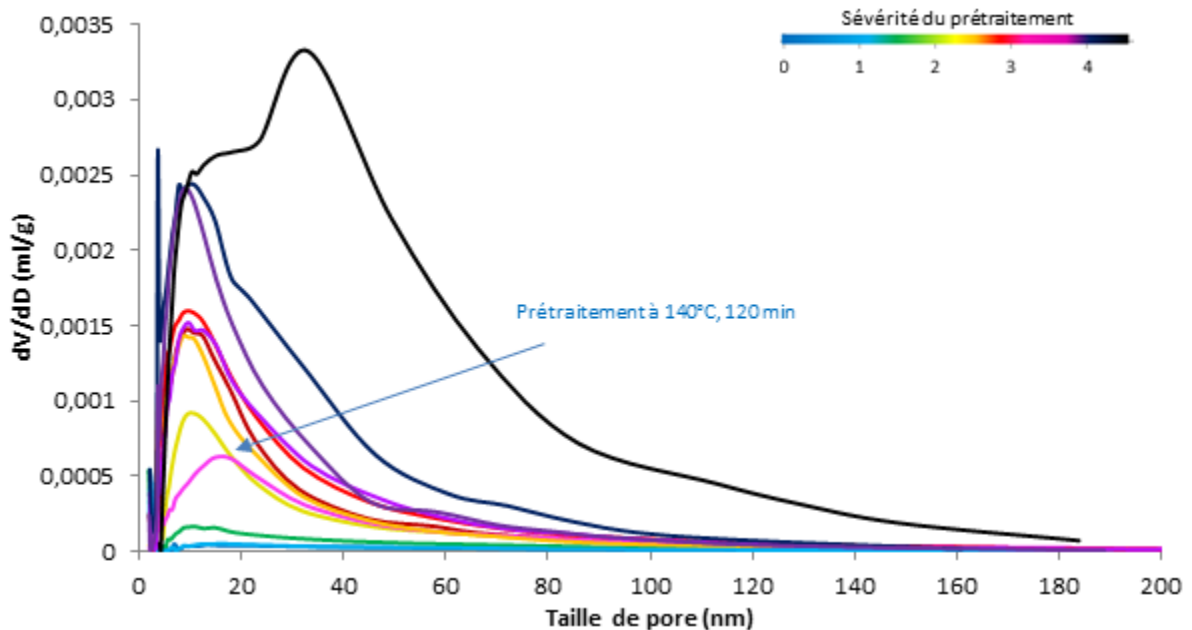


Figure 66 : Distributions en taille moyennes de pores, sur le modèle BJH en désorption

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

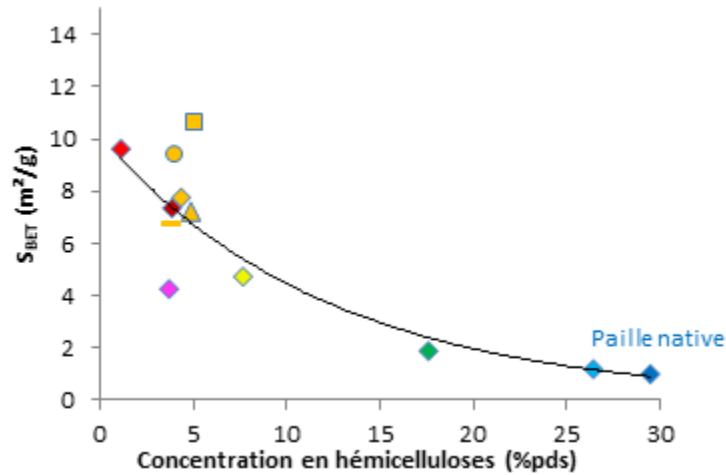


Figure 67 : Evolution de la surface BET en fonction du taux d'hémicelluloses

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

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

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

### d. Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

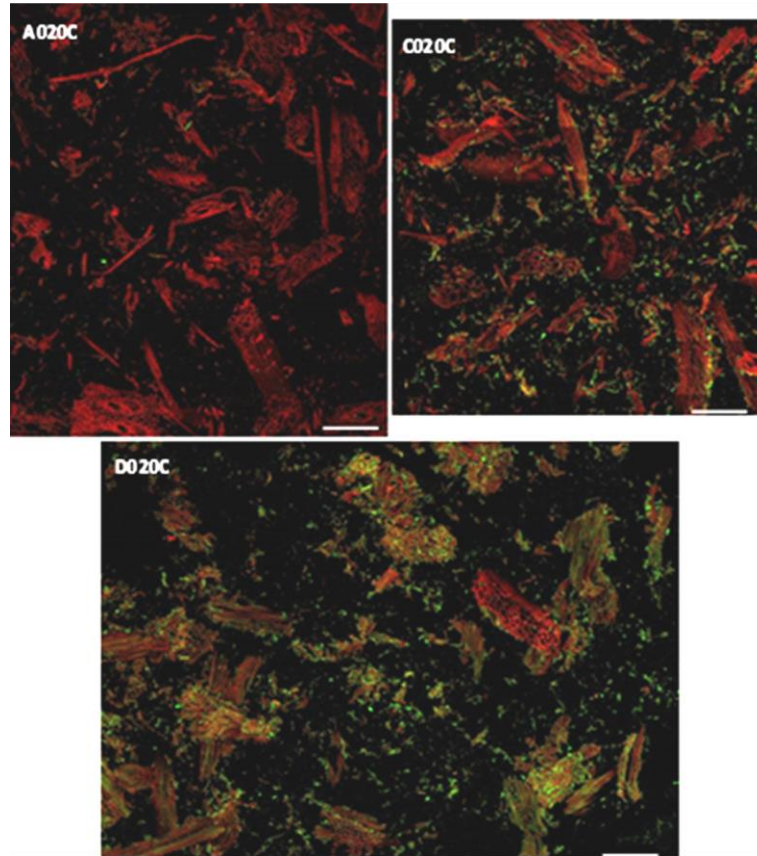


Figure 68 : Exemple de mosaïques d'image des 3 échantillons A020C, C020C, et D020C, en microscopie confocale à balayage laser, avec marquage à la safranine. La couleur rouge revient à la lignine marquée, et la couleur verte revient à la cellulose marquée. Fluorescence de la lignine : 640-700 nm (avec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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

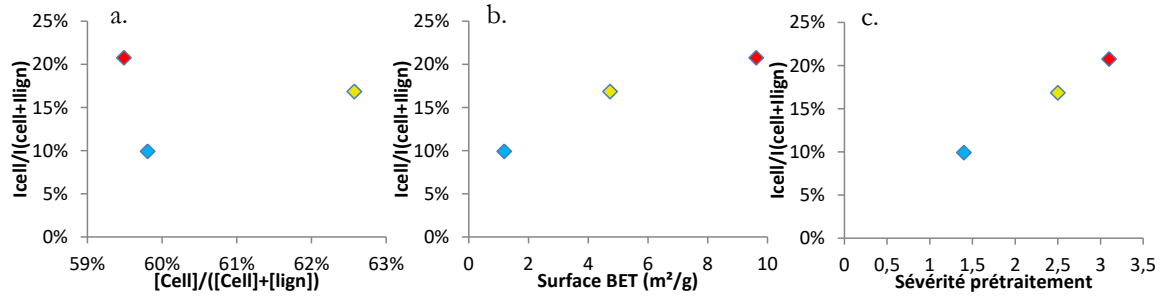


Figure 69 : Intensité moyenne et relative de la fluorescence de la cellulose (marquée), en fonction de la teneur relative en cellulose (a, à partir des analyses chimiques), de la surface BET (b), et de la sévérité(c)

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

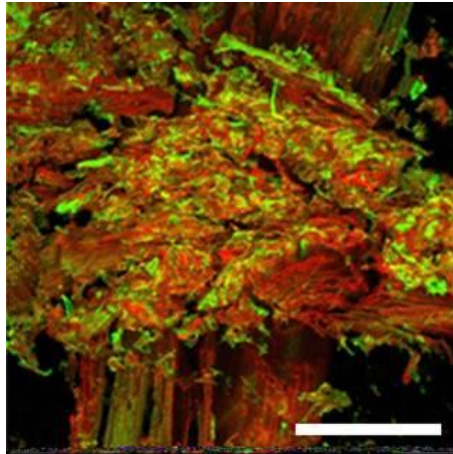


Figure 70 : Caractéristiques physicochimiques mesurées, sur un lot réduit d'échantillons

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

## e. Les modifications des propriétés chimiques

### i La composition chimique par analyse chimique et spectroscopie infrarouge

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

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

### Analyse qualitative des spectres IR

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

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

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

- La bande à  $1510\text{ cm}^{-1}$  qui est attribuée à l'élongation de la liaison C=C dans le cycle phénolique
- Les bandes à  $1457$  et  $1420\text{ cm}^{-1}$  sont attribuées aux déformations CH et CH<sub>2</sub> dans les cycles phénoliques

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

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

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

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

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

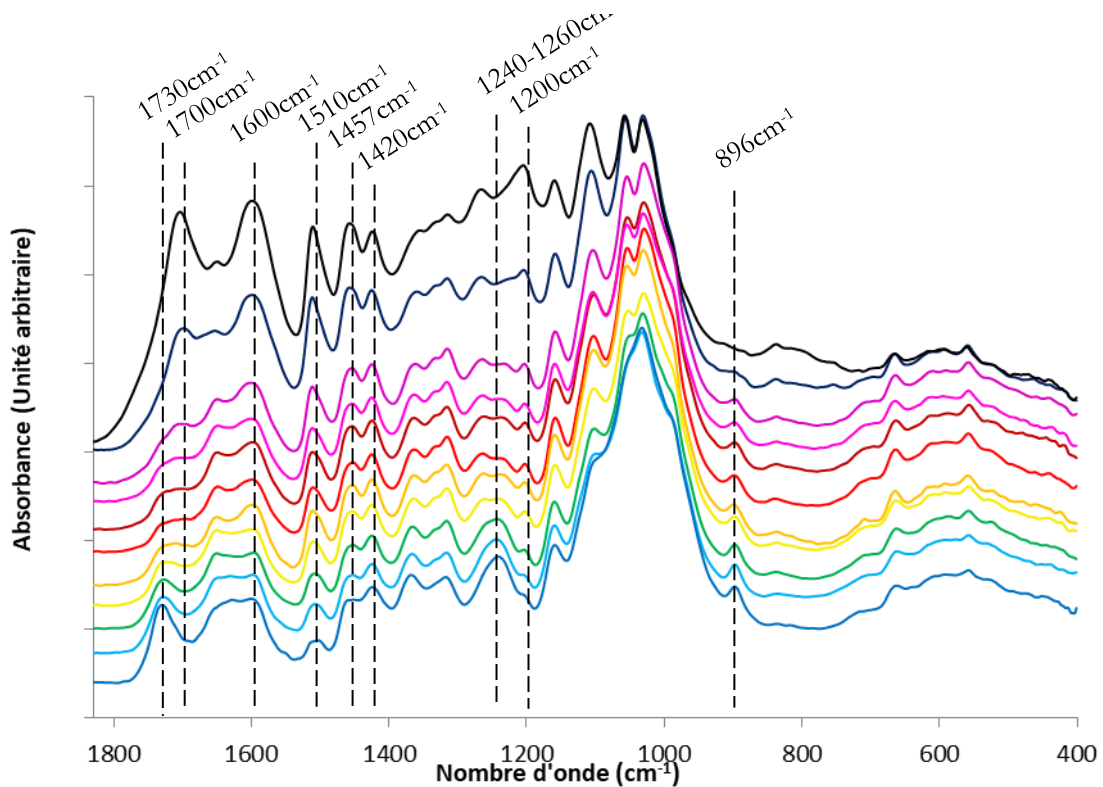


Figure 71 : Spectres moyens IR sur la zone 1850-400 $cm^{-1}$  des échantillons de l'étude du prétraitement à l'acide dilué

### Classement des échantillons par Analyse en Composantes Principales

Une ACP centrée a été réalisée sur les spectres FTIR, après un prétraitement de type SNV (*Standard Normal Variate*) et une dérivation première des spectres corrigés *via* OMNIC® du fond atmosphérique, du signal du CO<sub>2</sub> et de l'eau, ainsi que d'une correction ATR. Les zones spectrales 4000-3800  $cm^{-1}$ , 2700-1800  $cm^{-1}$ , et 500-400  $cm^{-1}$ , ont été retirées de l'exploration, car elles contiennent une variabilité résiduelle liée à l'atmosphère (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O notamment). Le prétraitement SNV est utilisé pour réduire d'une part les variations de l'intensité générale des spectres, et d'autre part pour réduire la variabilité due à des phénomènes physiques tels que la diffusion. La projection des spectres individuels des différents échantillons sur les deux premières composantes principales est présentée sur la Figure 72 (à gauche). Vu les chevauchements présents, on représente sur la Figure 72b (à droite) les projections des spectres moyens, pour plus de clarté. La CP1 exprime 55 % de la variance, et la deuxième composante exprime 13 % de la variance.

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

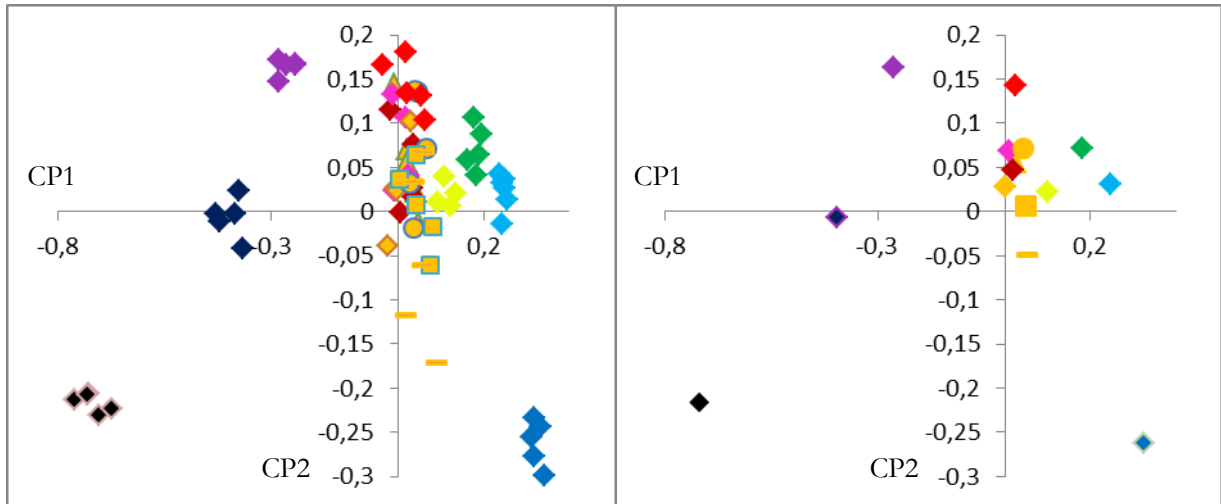


Figure 72 : Projection des différents spectres des échantillons sur les deux premières composantes principales (gauche), et projection des moyennes sur ces mêmes composantes (droite)

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

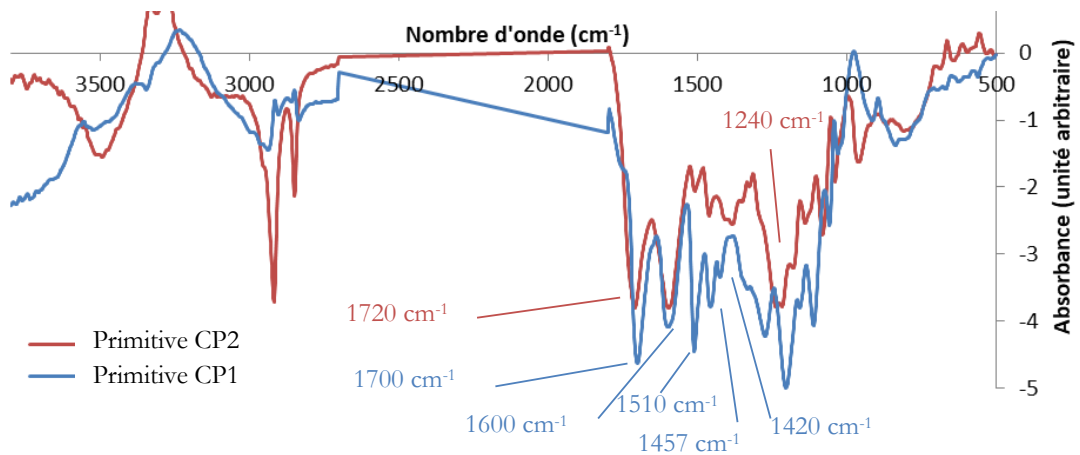


Figure 73 : Coordonnées des deux premières composantes principales

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

### Composition chimique à partir des spectres FTIR par régression PLS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

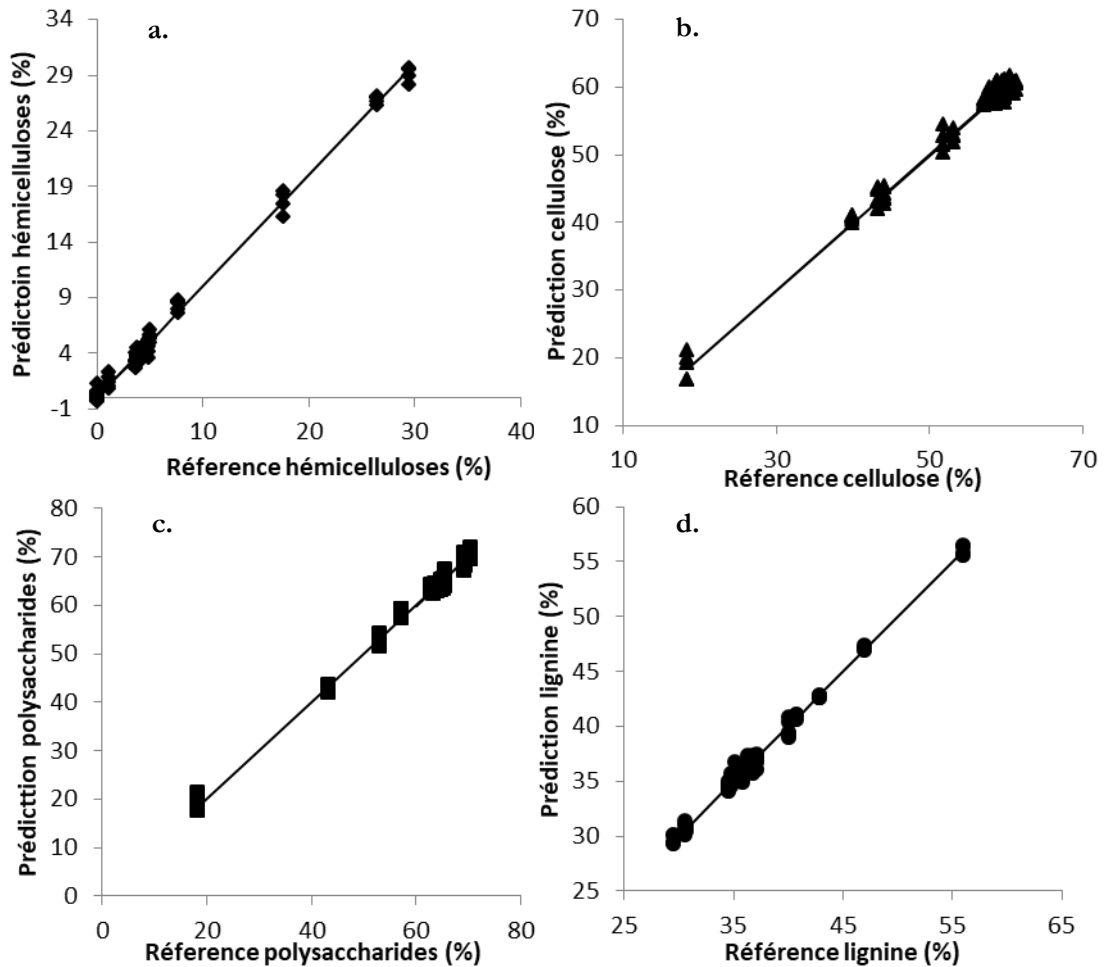


Figure 74 : Graphes de parité pour les 4 régressions effectuées sur les hémicelluloses (a), la cellulose (b), les polysaccharides (c), et la lignine

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

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

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

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

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

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

définis de 1680 à 1726  $\text{cm}^{-1}$ ), et l'aire du massif défini par l'intervalle 400-1836  $\text{cm}^{-1}$  (ligne de base locale et intervalle d'intégration). Les spectres considérés sont corrigés d'un fond atmosphérique,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , et d'une correction ATR. La Figure 75 illustre un exemple d'intégration sur la bande à 1700  $\text{cm}^{-1}$ .

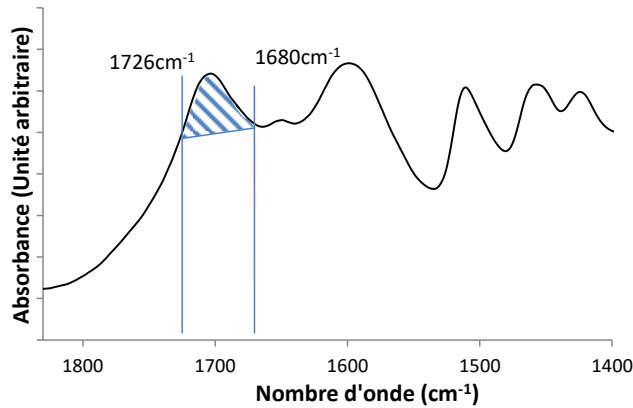


Figure 75 : Intégration de la bande à 1700  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des humines

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

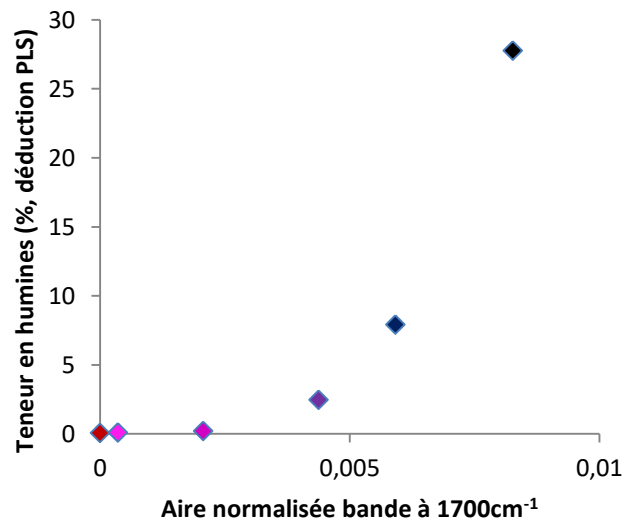


Figure 76 : Teneur en humines déduite par régression PLS en fonction de l'aire normalisée de la bande d'absorption à 1700  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique des humines

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

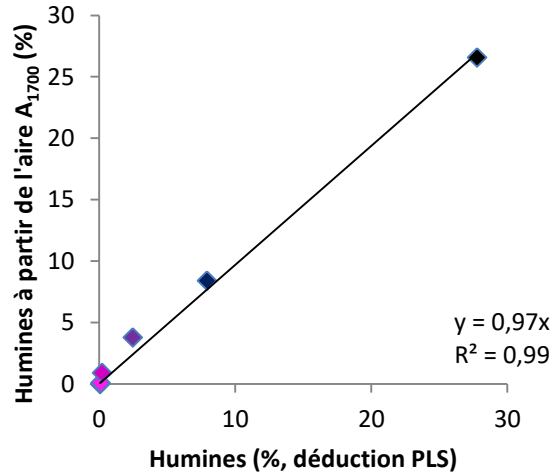


Figure 77 : Teneur en humines prédite à partir de l'aire normalisée en fonction de la teneur en humines déduite par PLS

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

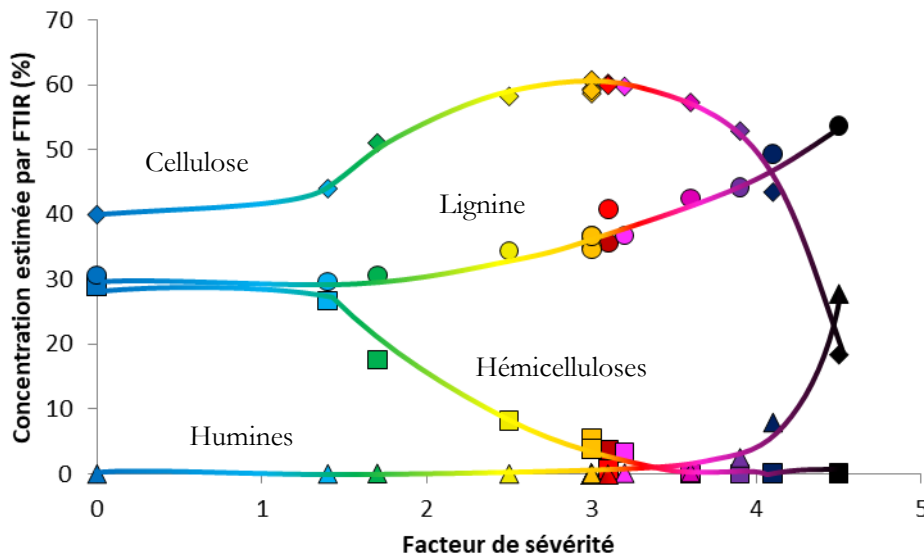


Figure 78 : Evolution de la composition chimique déterminée par FTIR en fonction du facteur de sévérité

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

### *ii L'altération des propriétés d'autofluorescence*

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

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

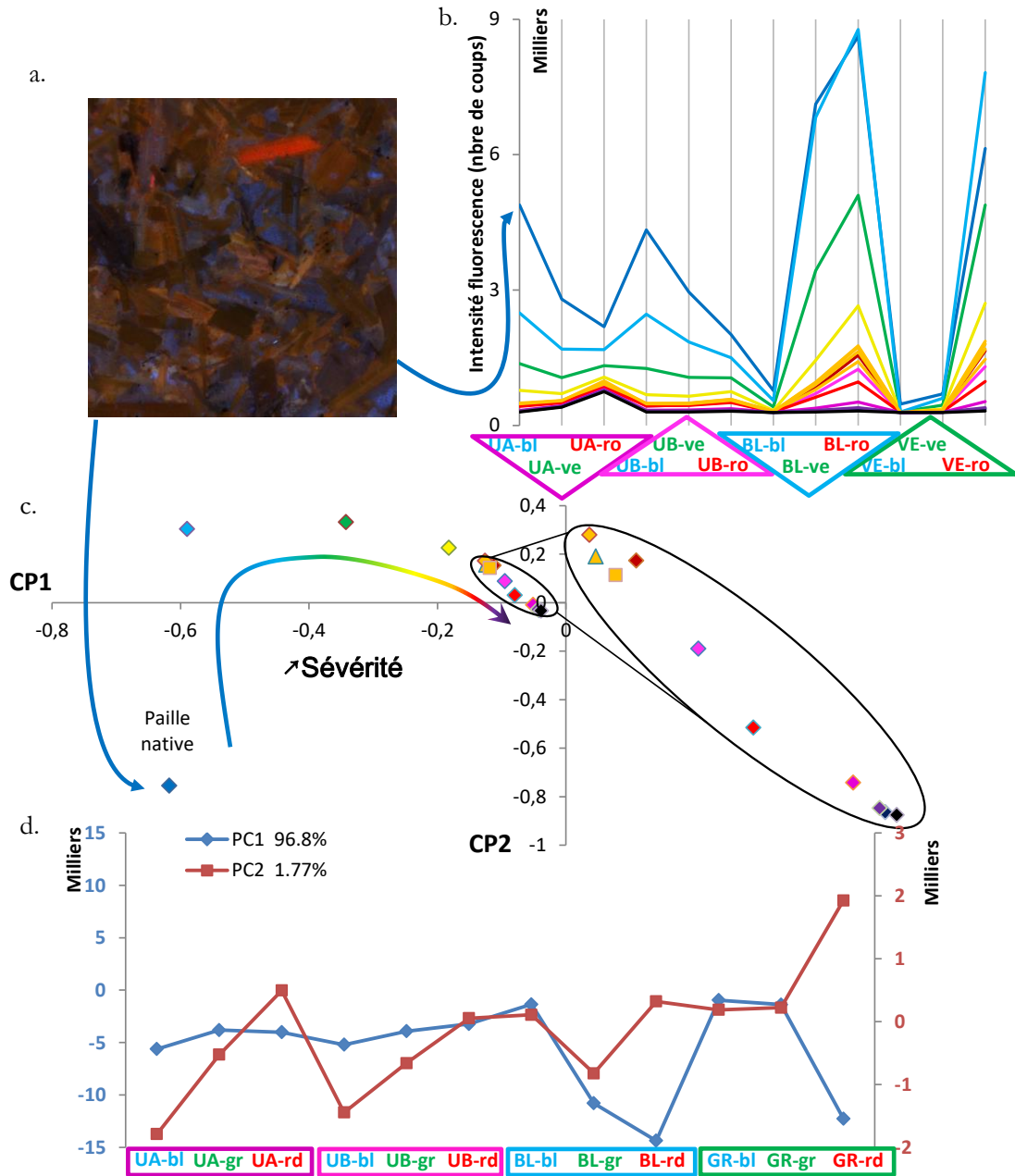


Figure 79 : a : Image multispectrale d'une acquisition sur paille native (superposition des 12 canaux) ; b : profils moyens de fluorescence par excitation (UVA, UVB, Bleue et Verte) et par canal d'émission (bleu, vert, rouge) ; c : positionnement des profils spectraux moyens des différents échantillons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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

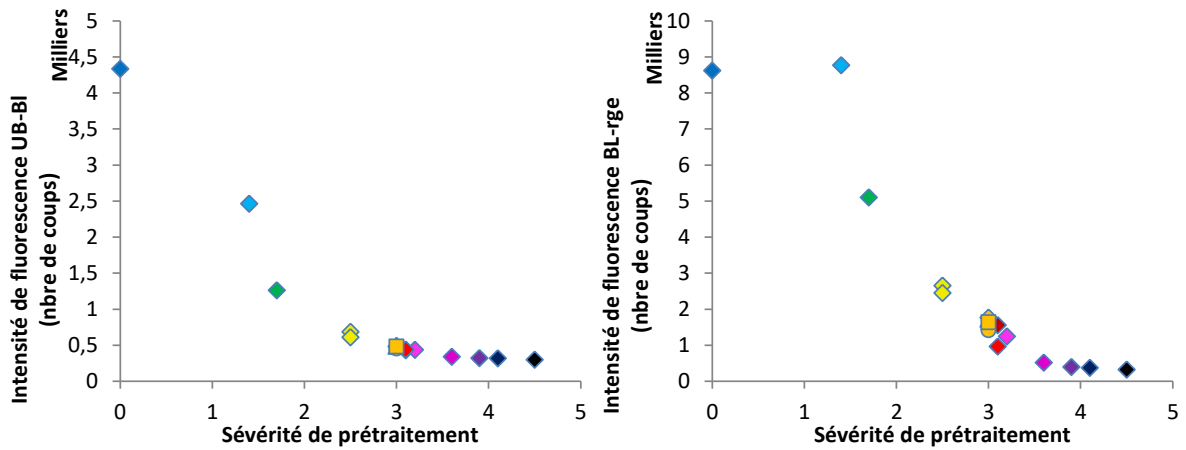


Figure 80 : Evolution de la fluorescence bleue par excitation UVB (gauche) et de la fluorescence rouge par excitation Bleue (droite), en fonction du facteur de sévérité du prétraitement

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

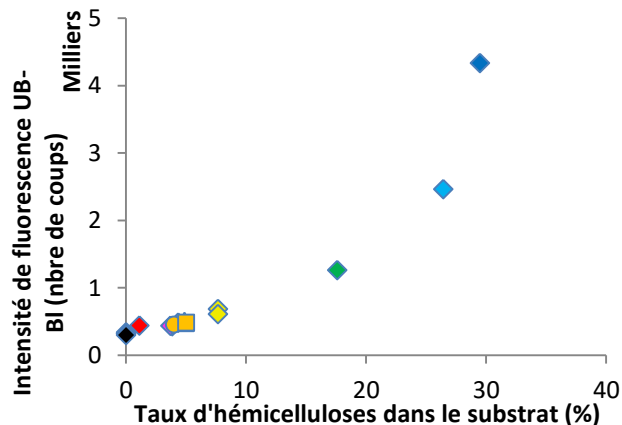


Figure 81 : Evolution de l'intensité de fluorescence bleue par excitation UVB, en fonction du taux d'hémicelluloses

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

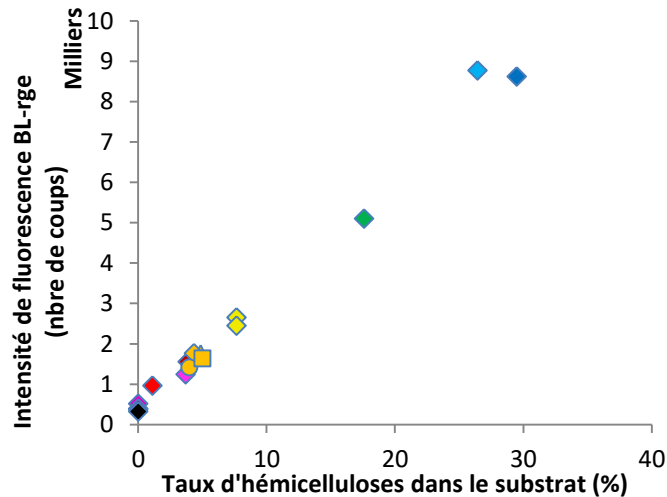


Figure 82 : Evolution de l'intensité de fluorescence rouge par excitation Bleue, en fonction du taux d'hémicelluloses

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

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

### Perspectives sur l'analyse des images multispectrales

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

### *iii L'indice de cristallinité de la cellulose*

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

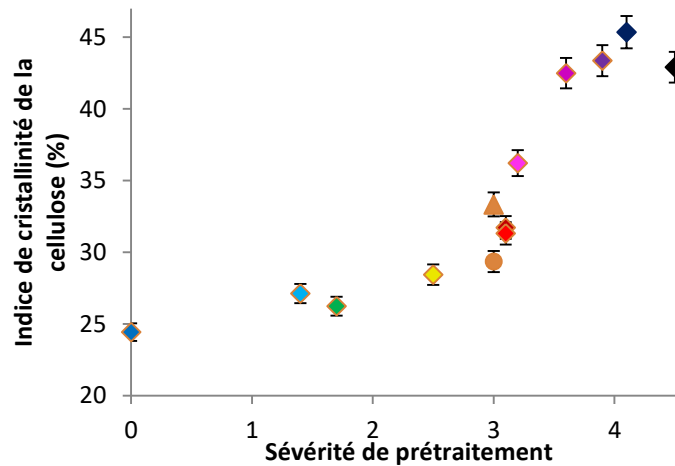


Figure 83 : Evolution de la cristallinité de la cellulose de la paille de blé en fonction de la sévérité combinée

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Effets de la détente explosive

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

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

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

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

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

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

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

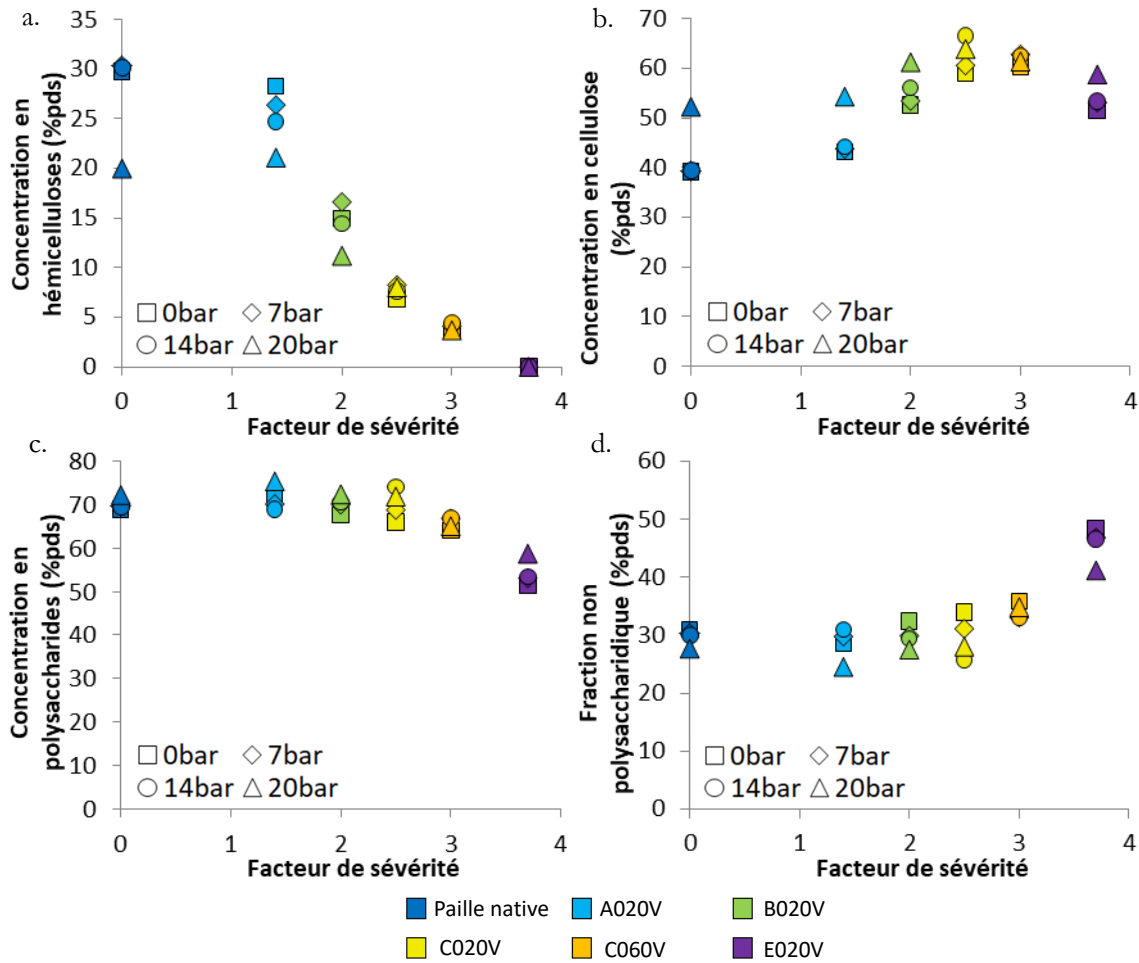


Figure 84 : Evolution de la teneur en hémicelluloses (a), cellulose (b), polysaccharides (c), et fraction non polysaccharidique (d), en fonction du facteur de sévérité (du traitement à l'acide dilué) et de l'amplitude de la dépressurisation

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

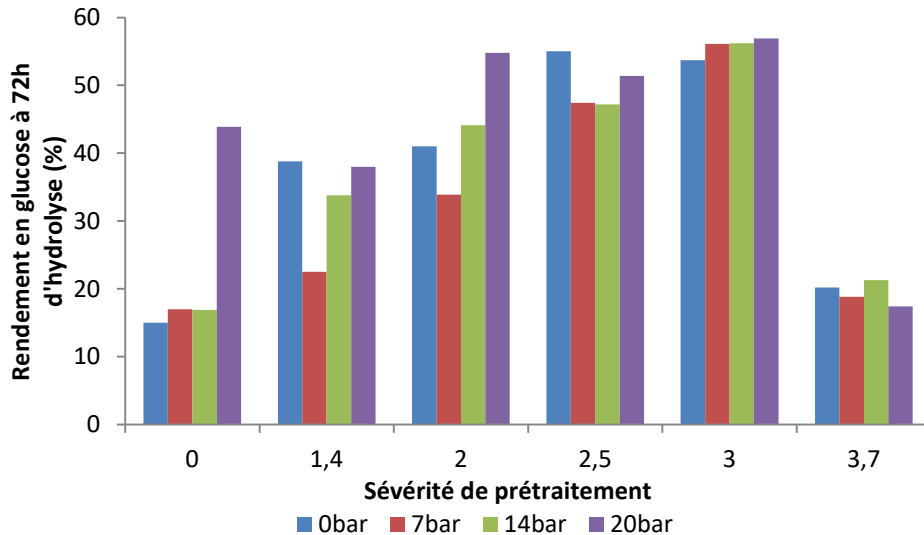


Figure 85 : Rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique dépendamment de la sévérité du traitement à l'acide dilué, et de la variation de pression subie lors de la détente explosive

### b. Evolution de la granulométrie

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

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

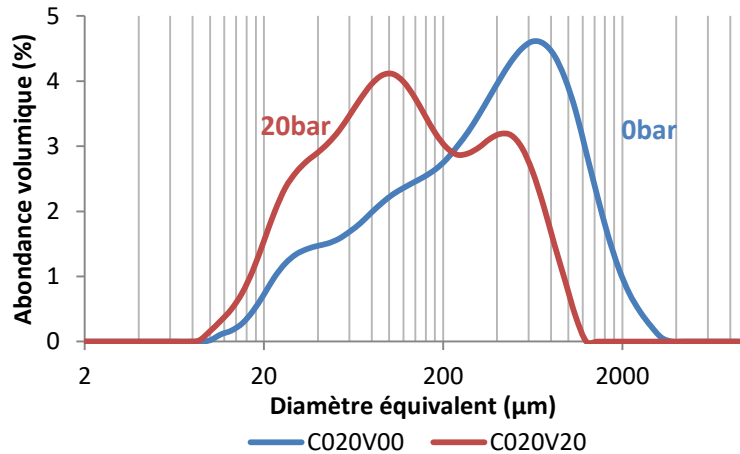


Figure 86 : Distributions granulométriques en abondance volumique des échantillons C020V00 et C020V20, traité à l'acide dilué à 140 °C pendant 20 min puis détendu à 0 et 20 bar

### c. Evolutions morphologiques

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

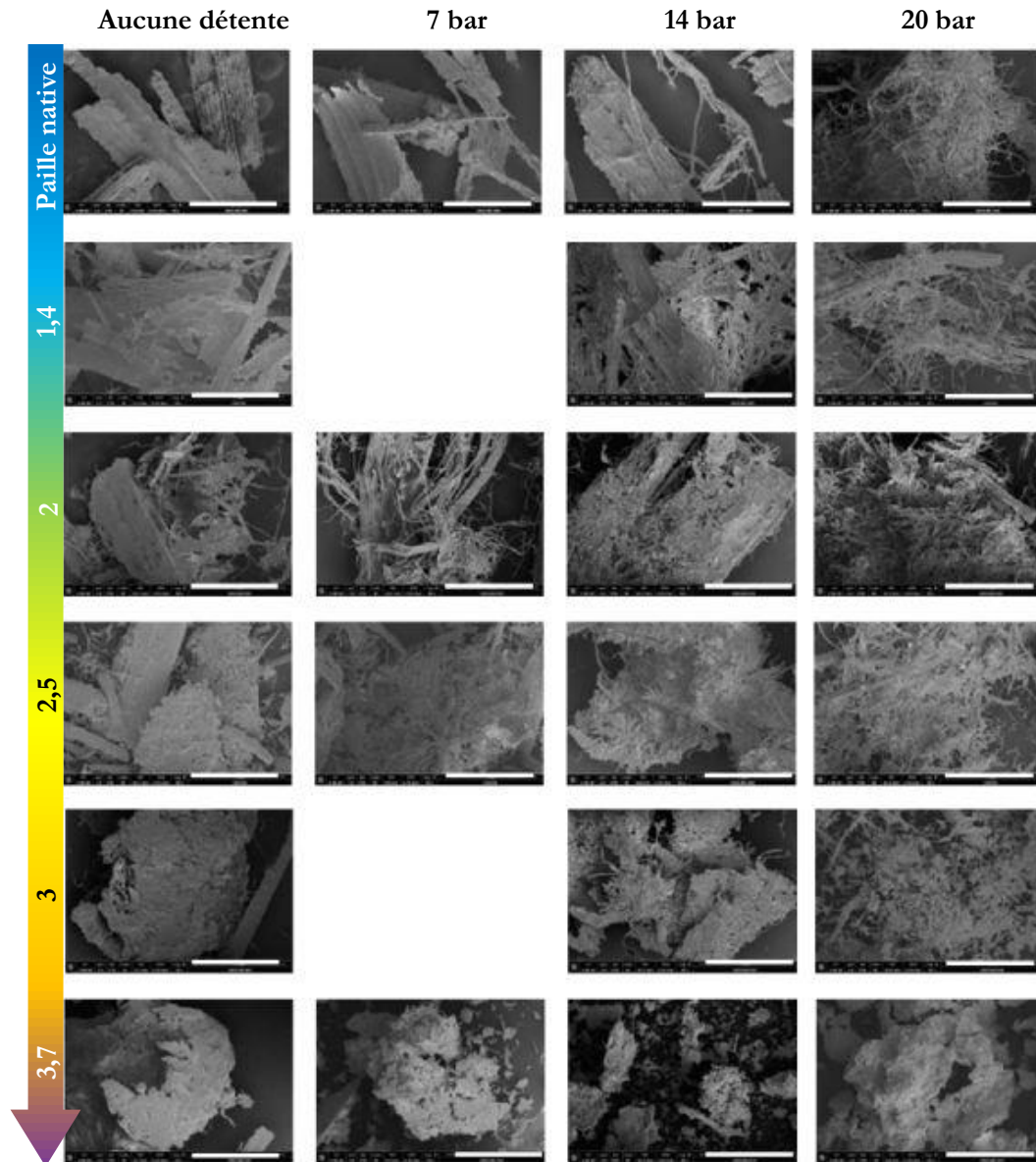


Figure 87 : Morphologie générale de la paille de blé dépendamment de la sévérité du prétraitement et de la pression de relâchement lors de la détente explosive. Barre d'échelle : 1 mm. Figure adaptée du manuscrit de Charlotte Loustau-Cazalet [241]

#### d. Etat de porosité

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

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



## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

que sur l'échantillon E020V20, l'augmentation de surface est particulièrement importante, passant de 9,3 m<sup>2</sup>/g sans explosion à 15,7 m<sup>2</sup>/g avec une détente de 20 bar.

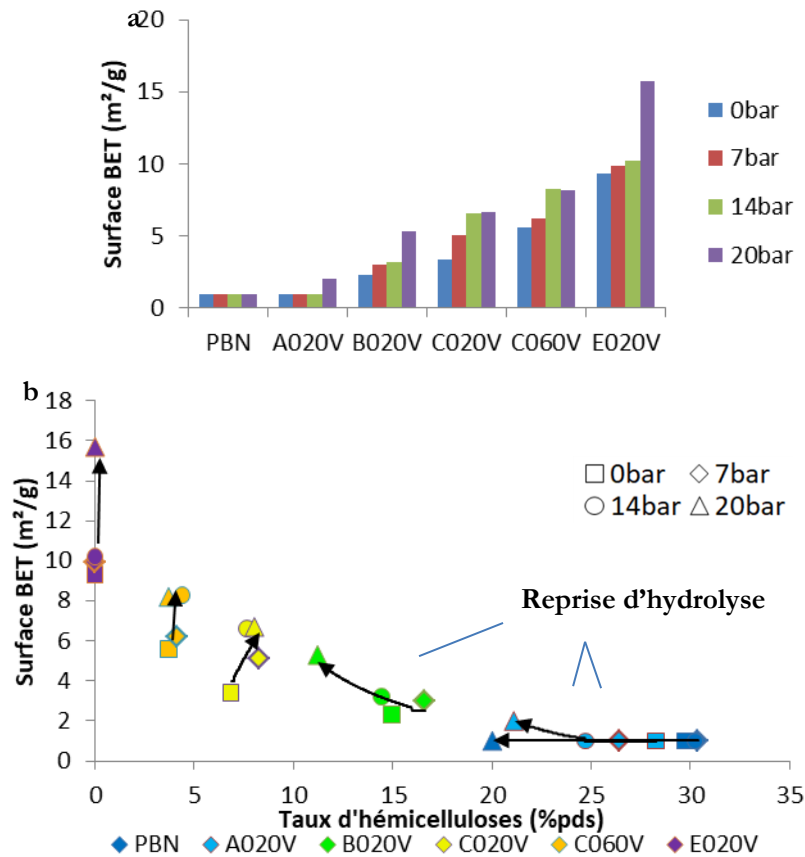


Figure 88 : Surface BET en fonction de la sévérité du prétraitement (a) et du taux d'hémicelluloses (b), pour différentes variations de pression lors de la détente explosive (0, 7, 14 et 20 bar)

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

## e. Physicochimie en microscopie confocale avec marquage spécifique

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

## Impact du prétraitement sur la matrice lignocellulosique

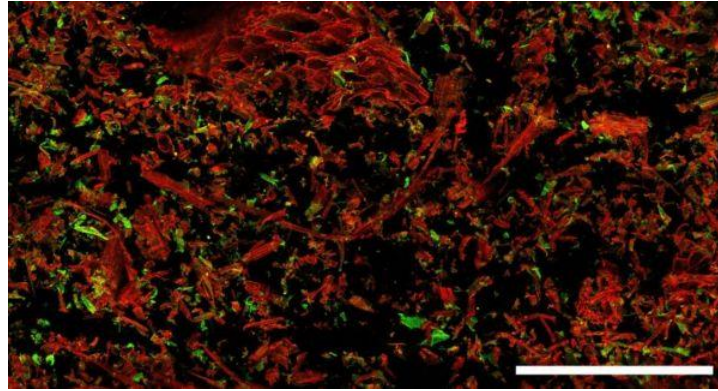


Figure 89 : Image en microscopie confocale de l'échantillon C020V20, avec marquage à la safranine. La couleur rouge revient à la lignine marquée, et la couleur verte revient à la cellulose marquée. Fluorescence de la lignine : 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm), Fluorescence de la cellulose :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

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

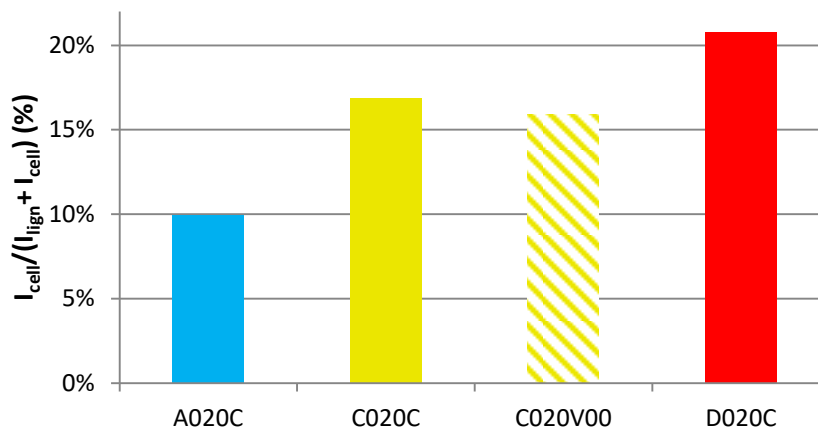


Figure 90 : Ratio de l'intensité moyenne de l'intensité de fluorescence de la cellulose et de la lignine, pour les 4 échantillons analysés

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

### f. Cristallinité de la cellulose

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

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

### g. Conclusion sur l'effet de la détente explosive

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

## 3. Conclusion

---

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

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

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