

# Les procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en biocarburant

## *i Les substrats*

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

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

De nombreux candidats pour la conversion de biomasse lignocellulosique en bioéthanol sont souvent cités, dont le panic érigé (*Panicum virgatum*), le miscanthus (*Miscanthus x giganteus*), l'alpiste des Canaries, (*Phalaris canariensis*), la canne de Provence (*Arundo donax*), la canne à sucre sauvage (*Saccharum spontaneum*), l'herbe à éléphant (*Pennisetum purpureum*), et la quenouille (*Typha Latifolia*), essentiellement pour leur grande efficacité photosynthétique ou leur grande abondance et leur caractère invasif. Ainsi, dans des conditions pédoclimatiques favorables, certaines de ces plantes sont dotées d'un mécanisme photosynthétique spécifique (dit en C4) qui permet une même concentration en CO<sub>2</sub>, de synthétiser une plus grande quantité de matière organique carbonée, comparativement aux plantes utilisant le mécanisme photosynthétique "classique", dit en C3 [13], pour lequel la concentration en CO<sub>2</sub> est souvent le facteur limitant de leur croissance (la présence de dioxygène diminue l'efficacité de l'enzyme RuBisCo qui catalyse la réduction du CO<sub>2</sub>).

### Les sources forestières

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

### Les résidus agricoles

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

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

### *ii Les technologies de conversion*

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

#### Les voies thermochimiques indirectes

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

- La torréfaction, qui a lieu entre 200 °C et 300 °C en milieu anaérobie, a pour but de densifier le contenu énergétique de la biomasse en vue de sa conversion. La matière est partiellement désoxygénée. Elle est plus friable et demande moins d'énergie pour être broyée sous forme de poudre, facilitant ainsi l'étape suivante.
- La gazéification s'opère à des températures comprises entre 700 et 1400 °C, en présence d'oxygène. Elle casse les molécules et macromolécules de la biomasse torréfiée en une fraction gazeuse constituée majoritairement de dihydrogène et de monoxyde de carbone (plus des impuretés telles que CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, COS, HCN, etc...).
- La synthèse Fischer-Tropsch permet, une fois les gaz nettoyés et rectifiés, de recombinaison le mélange CO + H<sub>2</sub> sous la forme de paraffines linéaires utilisables par la technologie Diesel.

#### Les voies thermochimiques directes

Les voies thermochimiques directes consistent simplement à liquéfier la biomasse lignocellulosique solide pour la rendre plus exploitable (facilité de transport et de stockage, densification énergétique, etc...) en la chauffant à des températures intermédiaires (400 et 600 °C) et sous forte pression, afin d'obtenir une fraction gazeuse (composée majoritairement de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, H<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> et C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>), mais également une bio-huile de pyrolyse rapide, et un solide "char", semblable à un charbon [14]. La bio-huile, fortement oxygénée, n'a pas les qualités requises pour être utilisée directement comme carburant et nécessite une mise à niveau catalytique (*upgrading*) pour la rendre utilisable dans le domaine des transports (essences, kérosènes, gazoles).

#### Les voies hydrothermales

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

#### Les voies biochimiques enzymatiques

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

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

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

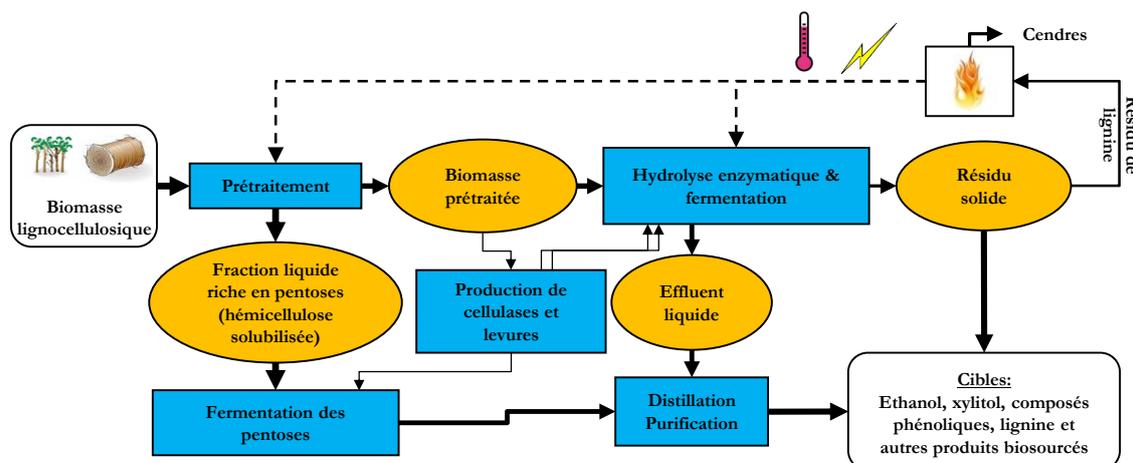


Figure 2 : Un schéma général possible pour la production d'éthanol de 2ème génération à partir de la biomasse lignocellulosique

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

## 2. Description multi-échelle de la paille de blé

### a. La composition chimique en macromolécules

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

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

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

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

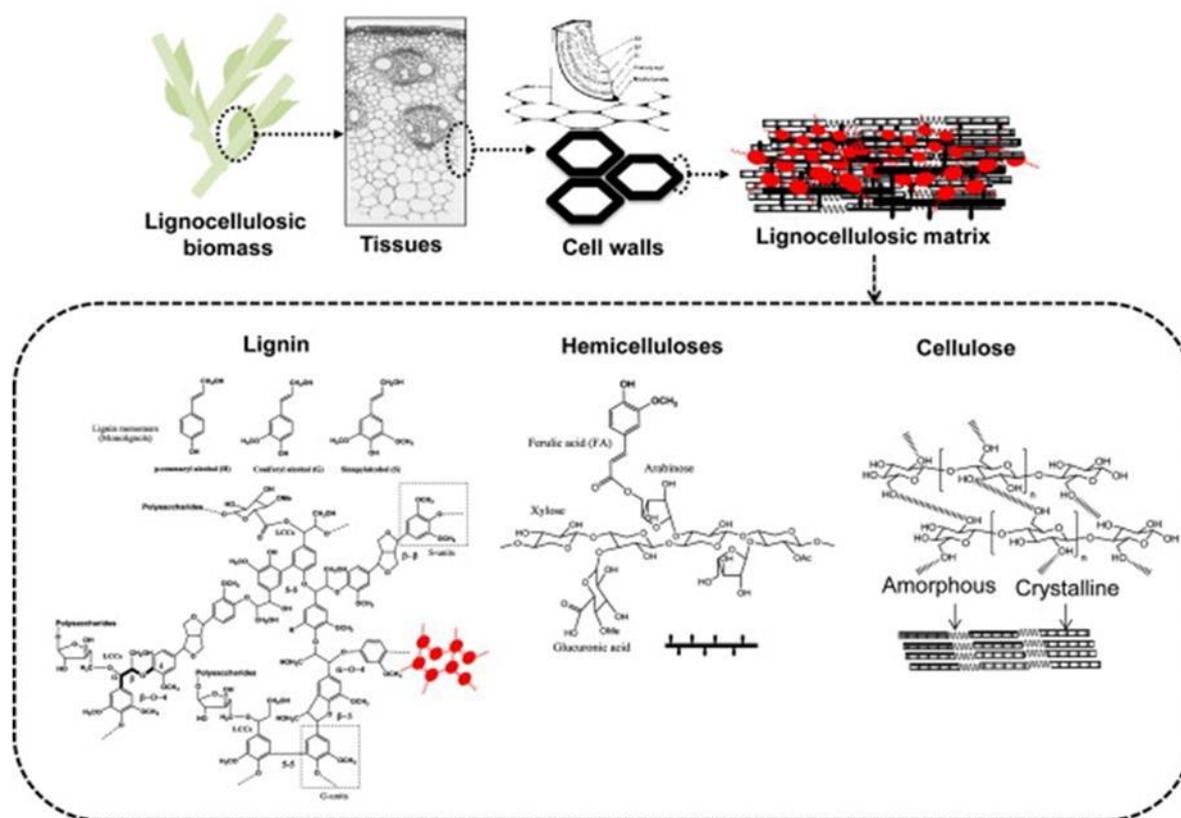


Figure 3 : Structure multi-échelle de la biomasse lignocellulosique. De l'échelle la plus macroscopique à l'échelle moléculaire : biomasse, coupe histologique transversale d'une tige, coupe transversale de cellules, structure lignocellulosique fibrillaire, et enfin la description des trois macromolécules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

### *i Les propriétés générales de la biomasse lignocellulosique*

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

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

### *ii Structure chimique de la cellulose*

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

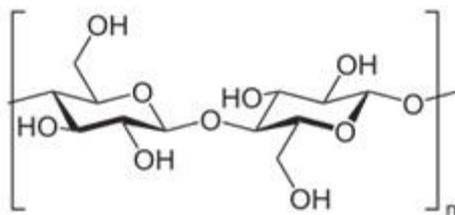


Figure 4 : Unité de cellobiose

### iii Composition des hémicelluloses

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

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

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

### iv Composition des lignines

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

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

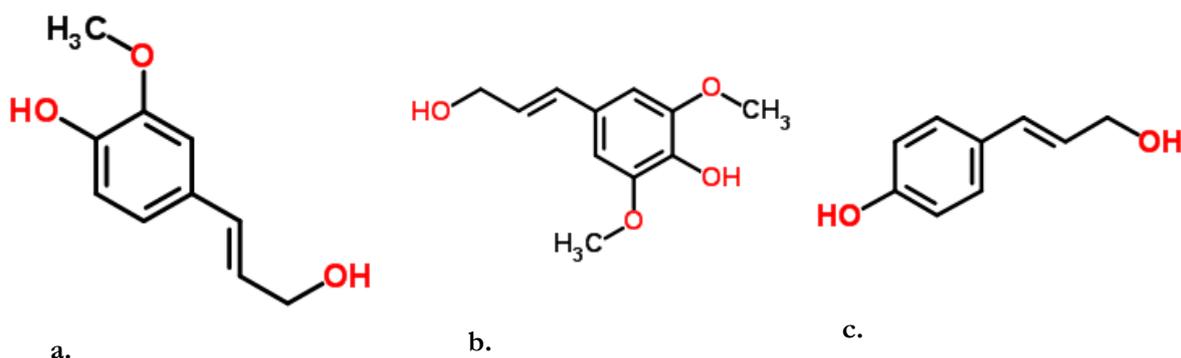


Figure 5 : Unités principales composant les lignines ; a : alcool coniférylique (unité G); b : alcool sinapylique (unité S); c : alcool paracoumarylique (unité H)

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

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

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

#### v Tige

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

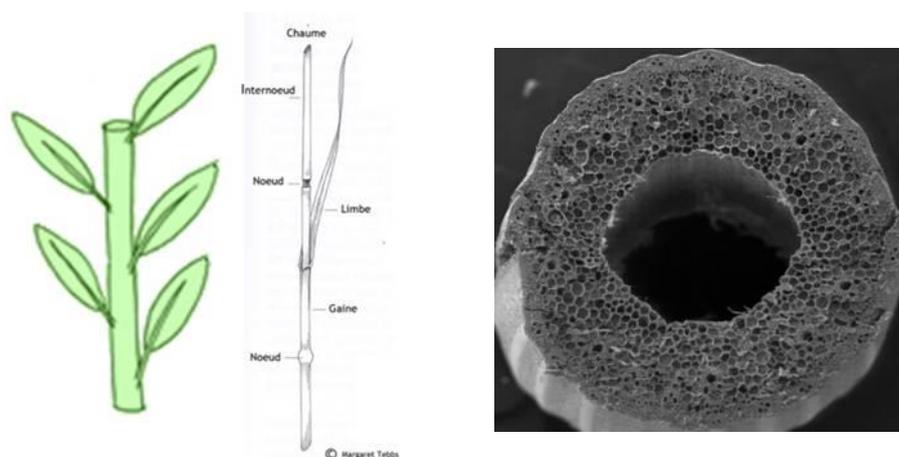


Figure 6 : A gauche, dessins représentant une tige de blé, et la disposition alterne distique des feuilles [21,22]; à droite, coupe transversale d'une paille de riz au microscope électronique à balayage [23]

#### vi Feuilles

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

- Deux épidermes (les deux surfaces externes, couvertes par la cuticule) sur lesquels on observe la présence de stomates. Ces derniers représentent des ouvertures au niveau de l'épiderme par deux cellules qui permettent et régulent l'évaporation de l'eau, de même que les échanges gazeux (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>)
- Une nervure (faisceau vasculaire de la plante) principale et des nervures secondaires, parallèles (spécifiques aux plantes monocotylédones)
- Un parenchyme assimilateur où la photosynthèse a lieu (mésophylle), et qui constitue le corps de la feuille

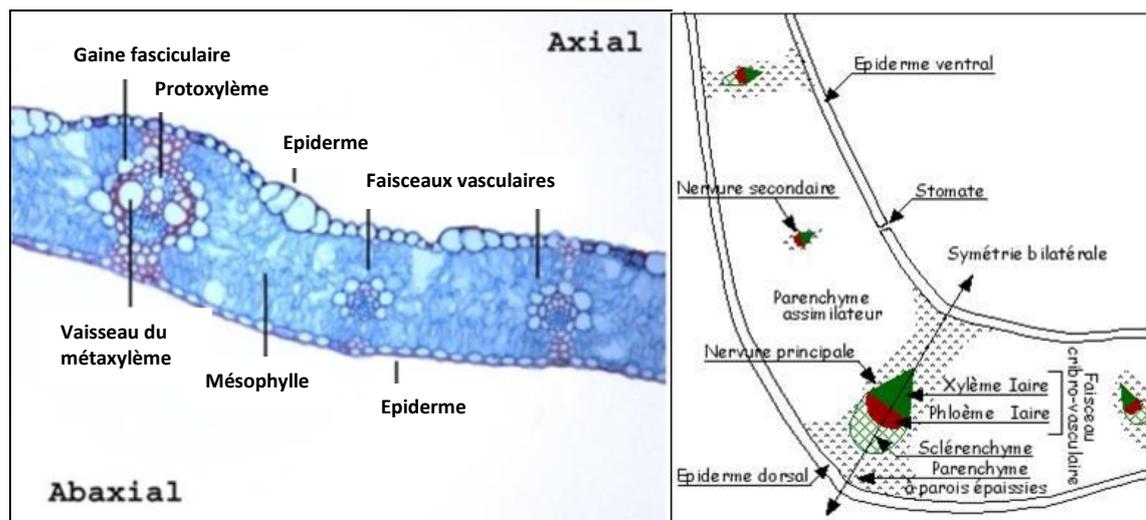


Figure 7 : Coupe transversale d'une feuille de blé à gauche (adapté de [24]), et représentation schématique d'une coupe transversale de feuille de muguet [25]

### vii Composition des organes

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

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

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

## b. L'échelle des tissus

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

### i La genèse méristématique

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

### ii Les tissus fondamentaux

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

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

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

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

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

### *iii Les tissus vasculaires*

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

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

### *iv Tissu dermique*

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

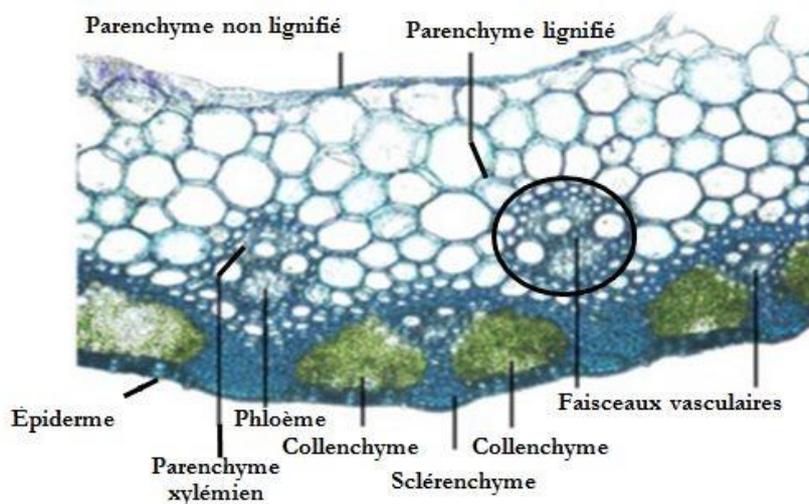


Figure 8 : Observation en microscopie optique d'une paille de blé vue en coupe transversale, adapté de [24]

#### v Abondance des tissus dans le blé

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

## c. Echelle cellulaire et ultrastructure cellulaire

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

#### i Les parois cellulaires

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

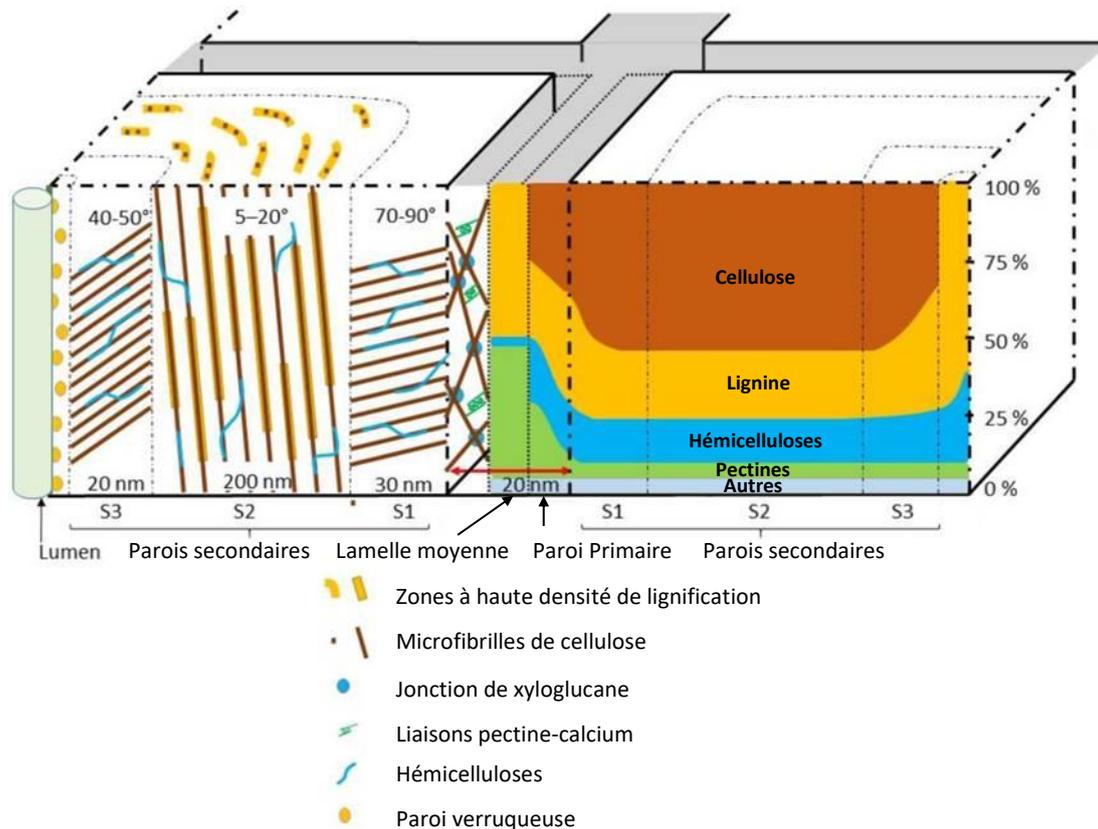


Figure 9 : Représentation schématique des différentes parois cellulaires adapté de [28]

## ii Structure des macromolécules de la paille de blé

### Cellulose

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

## Hémicelluloses

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

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

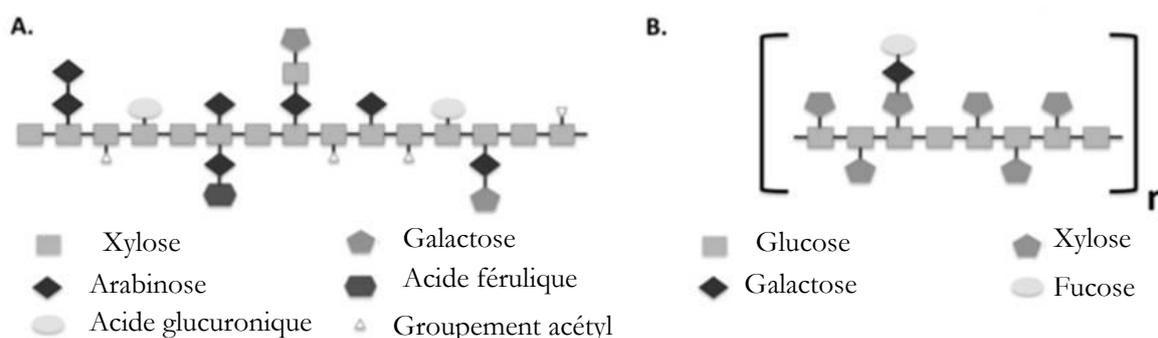


Figure 10 : Exemples de structures d'hémicelluloses : A. Xylane. B. Xyloglucane, adapté de [35]

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

### Lignine

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

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

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

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

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

### Protéines

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

### Pectines

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

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

### *iii Autres composés de la paille de blé*

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

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

## **d. Conclusion sur la structure des biomasses lignocellulosiques**

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

## **e. Digestibilité spécifique des hétérogénéités**

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

*i Digestibilité des organes*

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

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

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

*ii Digestibilité des tissus des végétaux*

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

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

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

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

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

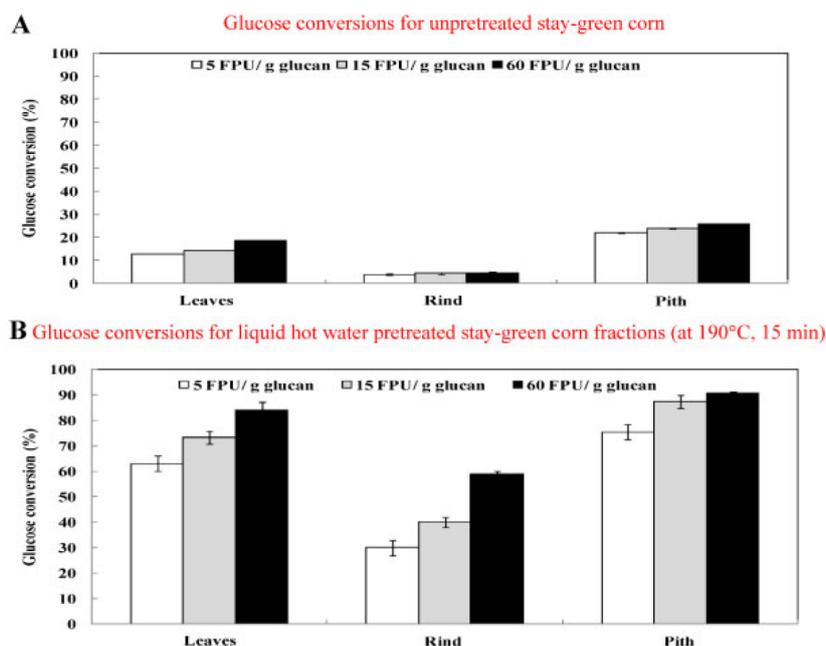


Figure 11 : Conversion du glucose de la feuille, de la couronne de tige et de la moelle, avec (B) et sans (A) prétraitement à l'eau hydrothermale, et à différentes charges enzymatiques [51]

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

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

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

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

Ø : concentration/réactivité quasi nulle

+ : concentration/réactivité limitée

++ : concentration/réactivité modérée

+++ : concentration/réactivité élevée

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

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

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

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

## 3.L'hydrolyse enzymatique

---

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

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

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

### b. Les trois classes d'enzymes cellulolytiques

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

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

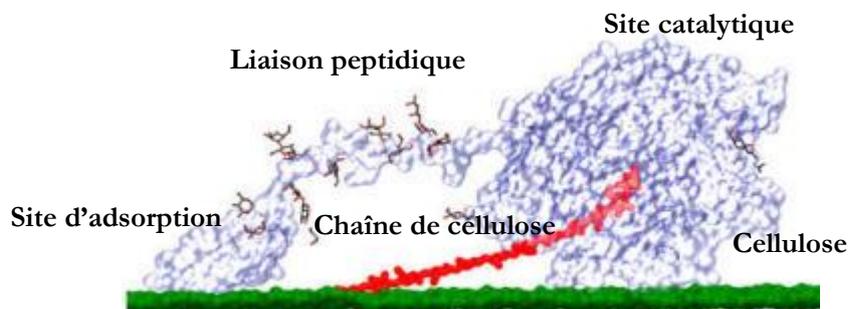


Figure 12 : Structure générale des CBH, adapté de [63]

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

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

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

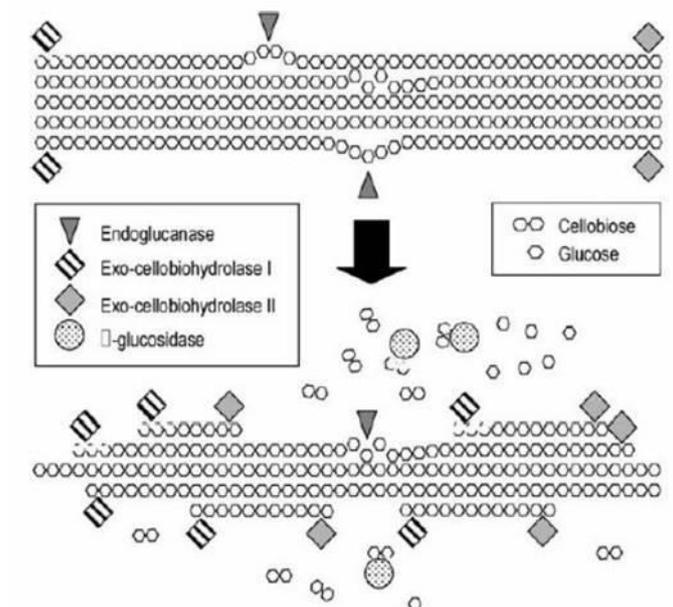


Figure 13 : Représentation schématique des types de clivage suivant les enzymes employées (adapté de [66])

### c. Cas des LPMO et cellulosomes

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

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

## d. Paramètres clefs de l'hydrolyse enzymatique

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

### *i Exploitation des synergies enzymatiques*

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

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

### *ii Autres paramètres impactant la réactivité enzymatique*

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

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

---

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

## a. Cuisson à l'acide dilué

### *i* Principe et domaine des conditions opératoires

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Modifications chimiques

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

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

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

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

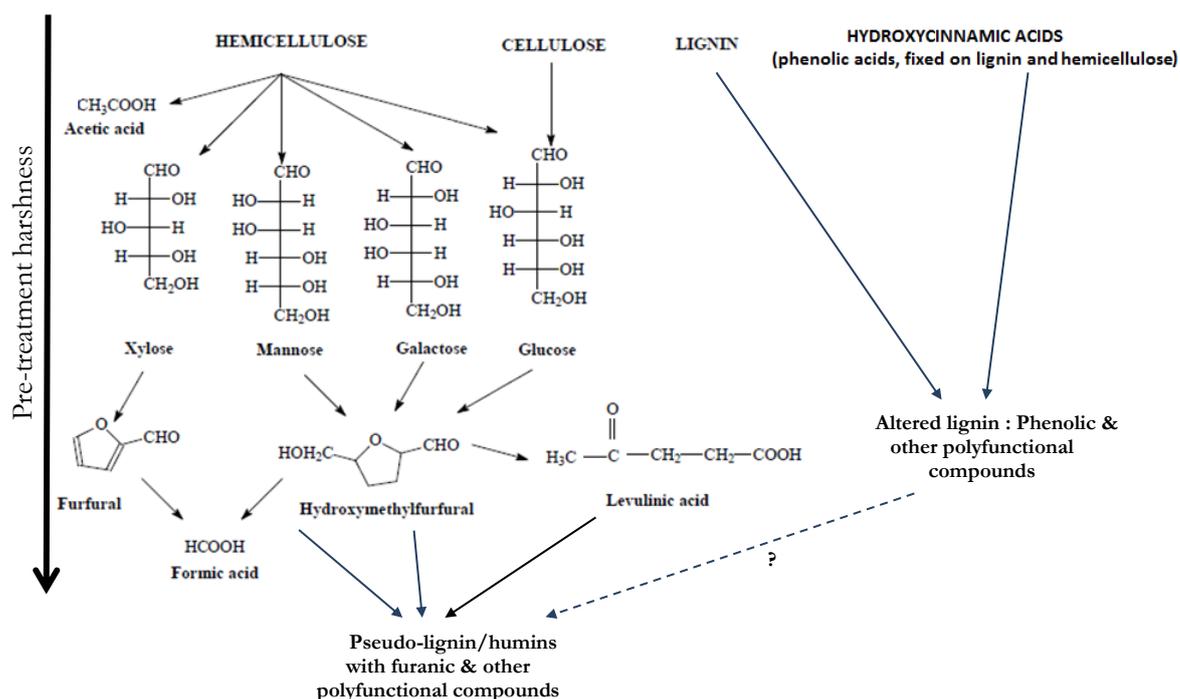


Figure 14 : Mécanismes chimiques de dégradation des trois principales macromolécules de la biomasse lignocellulosique. Adapté de [102]

### Coalescence de la lignine

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

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

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

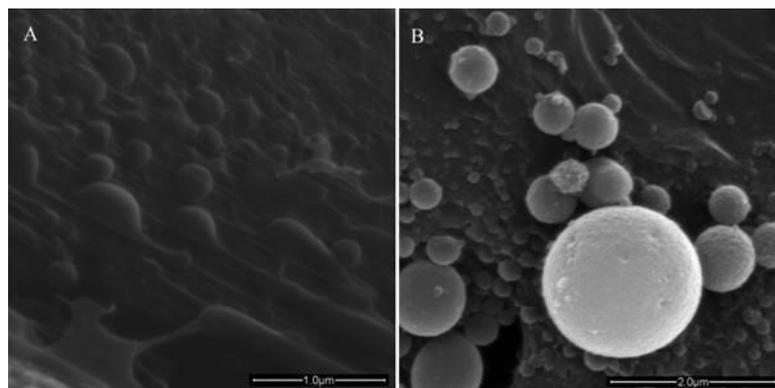


Figure 15 : Observations MEB de gouttelettes de lignine condensée ; a : structures émergeant depuis la surface ; b : gouttes sphériques redéposées [103]

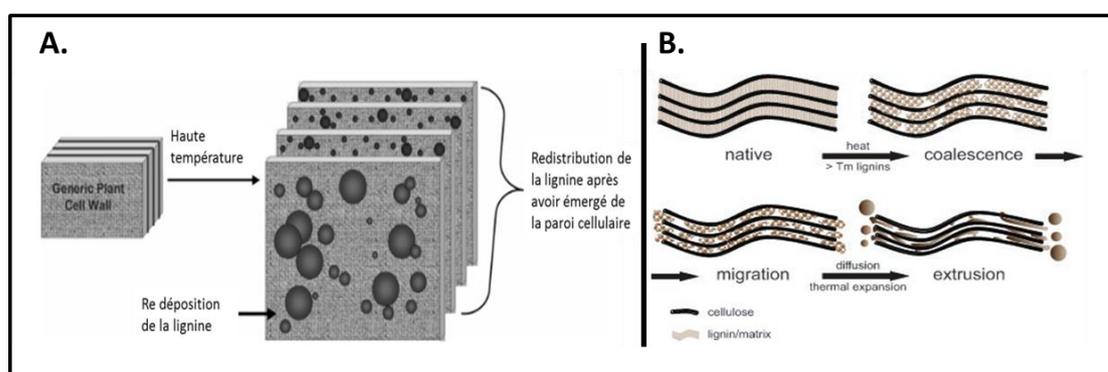


Figure 16 : Modèle simplifié de Selig *et al.* [103] (A) et de Donohoe *et al.*, [105] (B) pour la migration de la lignine durant un prétraitement à l'acide dilué

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

#### Effet de la cuisson acide sur la taille des particules

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

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

#### Effet de la cuisson acide sur la cristallinité

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

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

#### Effet de la cuisson acide sur la surface accessible

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

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

#### *iii Conclusion sur la cuisson acide*

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

## b. Explosion vapeur

### *i Principe et domaine des conditions opératoires*

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

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

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

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

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

### *ii Paramètres affectant l'efficacité du prétraitement par explosion vapeur*

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

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

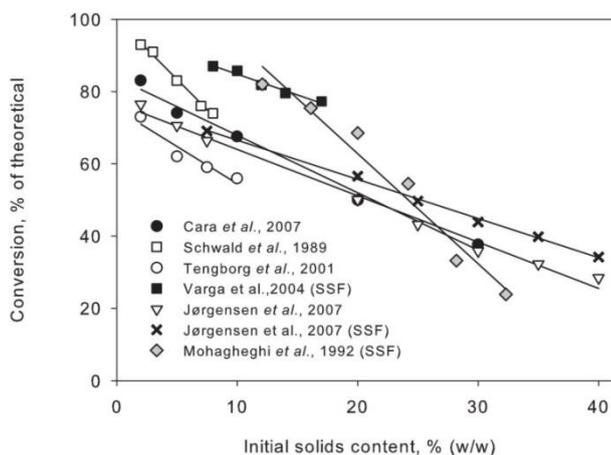


Figure 17 : Taux de conversion de la cellulose suivant de différents substrats lignocellulosiques [124]

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

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

### iii Effets de l'explosion-vapeur

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

#### Influence de l'explosion vapeur sur la morphologie des particules

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

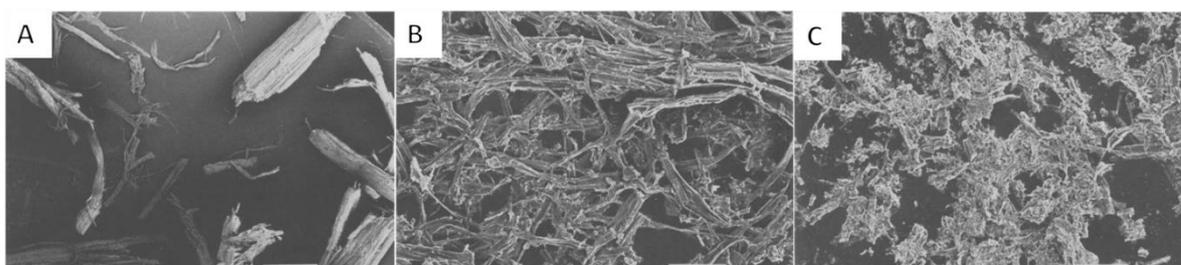


Figure 18 : Microscopie électronique à balayage de paille de chanvre prétraitée à l'explosion vapeur durant 180 seconde (A. 210 °C / B. 220 °C / C. 240 °C) Barre d'échelle 1mm (A), et 100  $\mu$ m (B & C) [93]

### Influence de l'explosion vapeur sur les tissus

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

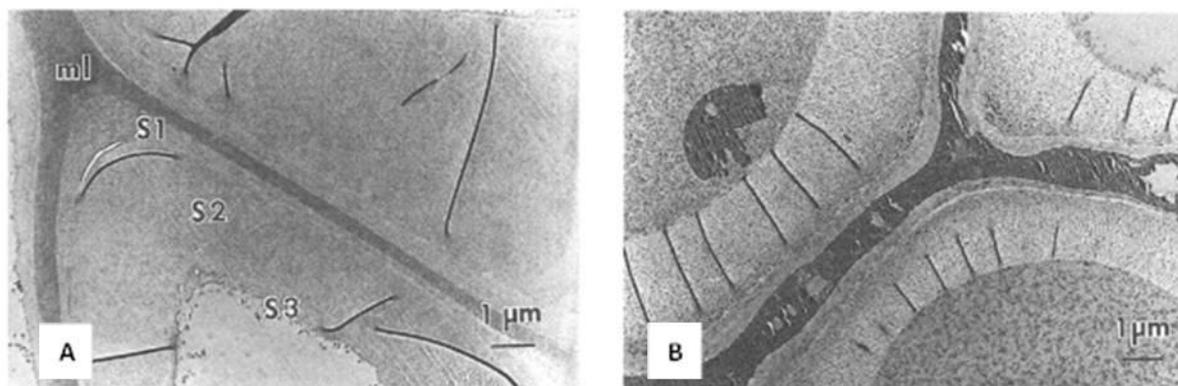


Figure 19 : Coupe transversale de cellules de copeaux de peuplier (A. Non prétraité / B. Prétraité à 227 °C durant 3 min) [128]

### Influence de l'explosion vapeur sur la surface accessible

L'explosion à la vapeur a un effet similaire sur les propriétés texturales de la biomasse lignocellulosique (surface, porosité) à la cuisson acide. Cela provient essentiellement du fait que, d'après Michalowicz *et al.*, l'augmentation de la surface accessible ainsi que celle du volume poreux sont essentiellement liées à l'hydrolyse des hémicelluloses [128]. Pour des conditions plus sévères, la porosité augmenterait de par l'apparition de pores centrés autour de 8 Å (par exclusion stérique) possiblement due à l'hydrolyse partielle de la cellulose et à une réorganisation de la matrice lignocellulosique. Plus précisément, Michalowicz *et al.* étudièrent l'impact du prétraitement par explosion vapeur en absence d'acide sur la surface spécifique et le volume des pores accessibles après prétraitement. La taille théorique d'une cellulase étant de 51 Å pour les plus petites, les auteurs calculent le volume poreux accessible par ces enzymes pour un substrat non traité, puis traité à différentes températures (217 °C et 248 °C). Le volume de pores accessibles est alors respectivement de 30 %, 50 % et 70 %. Enfin, Zoulikha *et al* [116] observèrent une augmentation de la surface BET sur de la paille de blé de 0,77 à 1,68 m<sup>2</sup>/g respectivement pour de la paille native et de la paille prétraitée à 165 °C, 40 min et 2,2 % pds d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

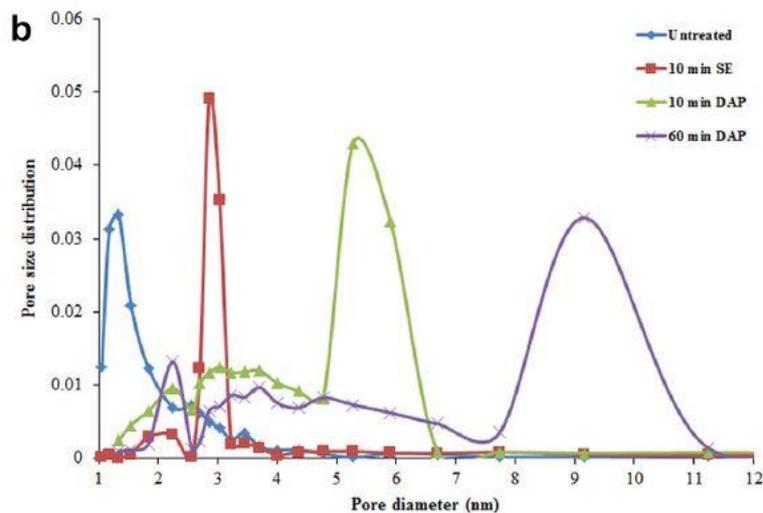


Figure 20 : Distribution en taille de pore déterminée par cryoporométrie RMN sur échantillon non traité (courbe bleue), traitée par explosion vapeur (rouge), cuisson acide pendant 10 min (vert), et cuisson acide pendant 60 min (violet) [113]

#### iv Conclusion sur l'explosion vapeur

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

### c. Conclusion sur les prétraitements

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



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

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

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

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

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

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

#### *ii Moyens de caractérisation*

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

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

## **b. Porosité et surface**

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

#### *i Liens entre état de porosité et digestibilité*

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

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

### *ii Evolution de la surface au cours de l'hydrolyse*

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

### *iii Moyens de caractérisation*

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

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

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

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

### Physisorption de gaz

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

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

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

Piccolo *et al.* (2010) ont étudié l'impact des conditions de séchage sur la porosité mesurée par physisorption d'azote (surface B.E.T et répartition poreuse) de diverses biomasses brutes ou prétraitées sous explosion vapeur en présence d'acide ( $\text{SO}_2$ ) : sapin, cellulose Avicel et paille de blé [147]. Les résultats obtenus montrent une variation de la surface avec les conditions de séchage. Globalement, celle-ci augmente avec la sévérité du séchage (105 °C, 2 jours vs 20 °C, 5 jours). La comparaison des distributions poreuses après les deux types de séchage a permis de montrer que les profils pouvaient être différents selon les conditions de séchage des ressources lignocellulosiques notamment sur les échantillons de pailles de blé. Cette étude illustre le fait que l'étape de séchage est susceptible de modifier les caractéristiques texturales de la biomasse et, potentiellement, conduire à des erreurs d'interprétation.

### Exclusion de soluté

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

### Cryoporométrie RMN bas champ

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

### Coloration de Simon et coloration DR28

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

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

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

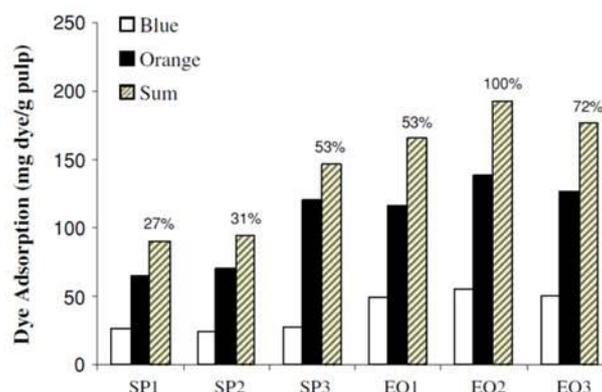


Figure 22. Adsorption de colorant sur le pin tordu ou pin de Murray, suivant les différents prétraitements réalisés : explosion vapeur (SP), ou traitement organosolv avec éthanol (EO). Les pourcentages indiquent les rendements de conversion de la cellulose en glucose des différents substrats à 72h d'hydrolyse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

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

#### Adsorption de protéines

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

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

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

#### Volume de rétention d'eau (WRV)

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

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

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

### **c. Cristallinité de la cellulose**

#### *i Effets de la cristallinité sur la digestibilité*

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

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

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

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

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

### iii Moyens de caractérisation

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

#### Diffraction des rayons X (DRX)

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

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

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

### Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

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

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

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

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

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

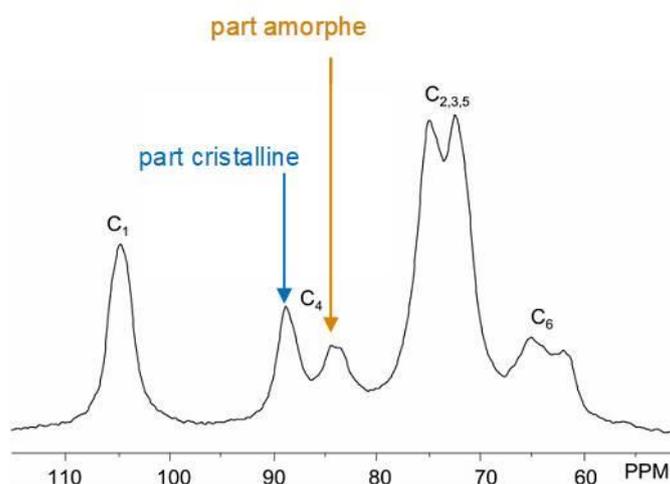


Figure 23 : Exemple d'un spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  de cellulose, position des pics caractéristiques de la part cristalline (pic à 89ppm) et de la part amorphe (pic à 84 ppm), spectre RMN tiré de [140]

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

## **d. Composition, structure et propriétés chimiques**

### *i Liens avec la digestibilité*

#### Lignine

##### **Taux de lignine**

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

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

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

### Récalcitrance et structure et type de lignine

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

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

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

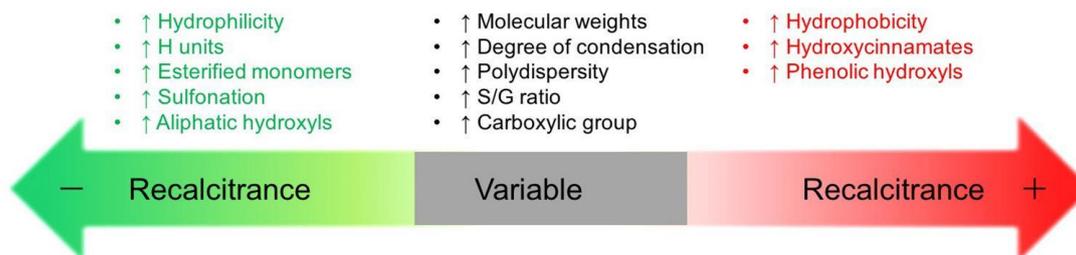


Figure 24 : Représentation schématique du rôle de différentes caractéristiques de la lignine sur la récalcitrance de celle-ci. Adapté de [181]

### Interactions lignine – polysaccharides

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

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

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

#### Taux d'hémicelluloses

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

#### Degré de polymérisation de la cellulose

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

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

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

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

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

### Taux d'acétylation des polysaccharides

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

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

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

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

### *ii Moyens de caractérisation*

#### Spectroscopie IR

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

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

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

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

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

#### Spectroscopie X par émission de photoélectrons

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

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

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

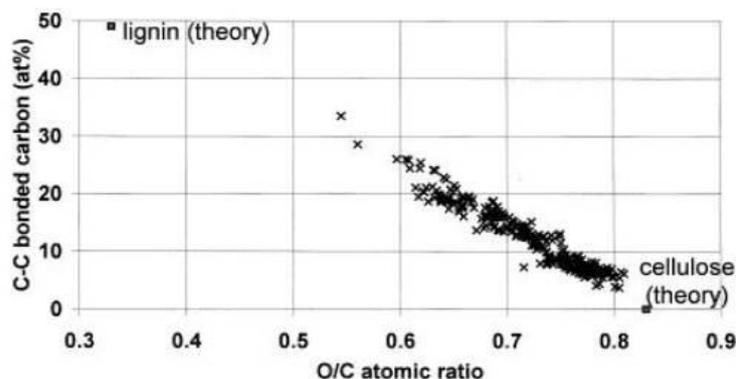


Figure 25 : Corrélation du rapport atomique O/C avec la teneur atomique en carbone aliphatique pour des extraits de pulpe de bois [209]

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

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

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

#### Analyses thermiques : ATG et DSC

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

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

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

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

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

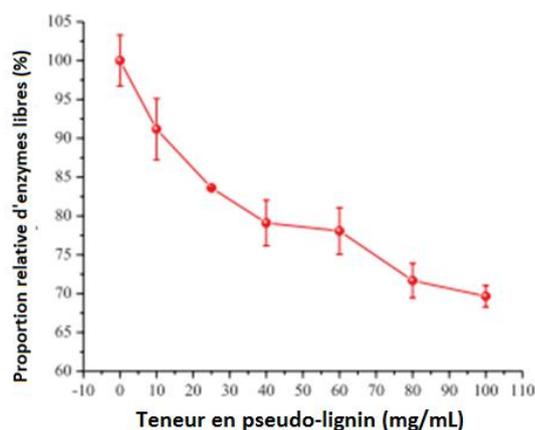


Figure 26 : Evolution de la proportion relative de protéines libres dans le milieu réactionnel en fonction de l'abondance en pseudo-lignine, adapté de [100]

## f. Caractérisation morphologique et chimique combinée

### *i* Microspectroscopie IR

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

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

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

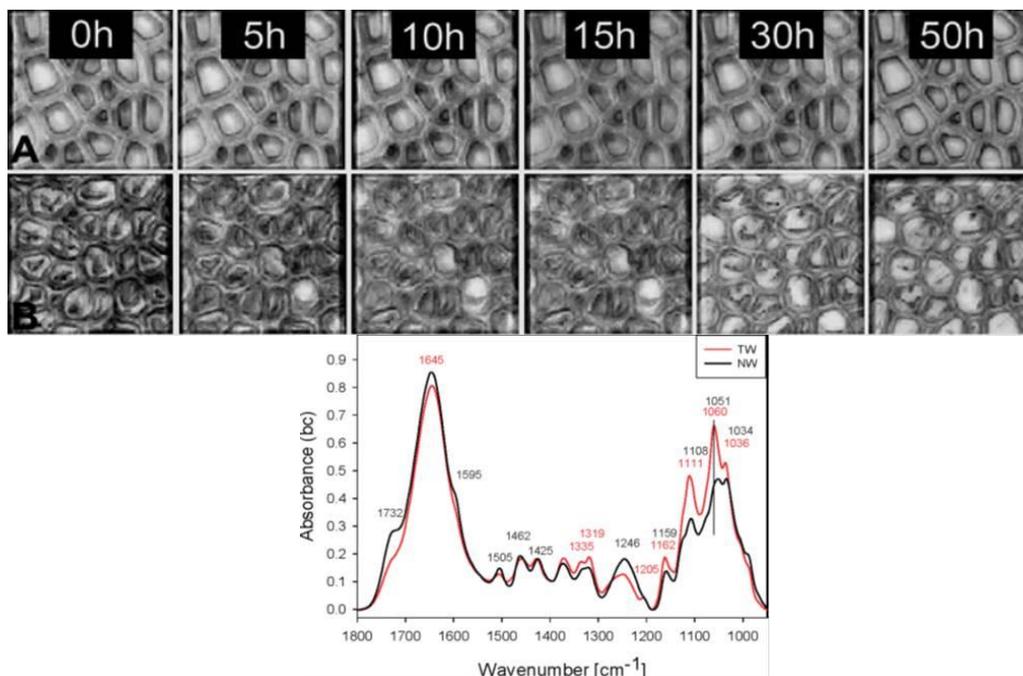


Figure 27 : Evolution morphologique et spectrale du bois normal (A, et NW sur le spectre) et du bois de tension (B, et TW sur le spectre) pendant la dégradation enzymatique

Spectralement, on observe :

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

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

### *ii Microspectroscopie Raman*

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

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

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

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

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

### *iii Imageries de fluorescence*

#### Macroscopie à autofluorescence

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

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

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

### Microscopie à fluorescence

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

### Microscopie à fluorescence par excitation bi-photonique

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

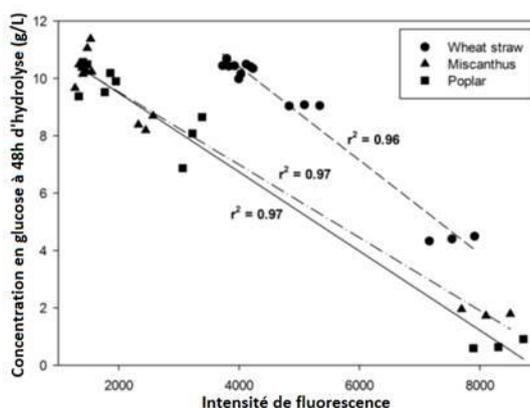


Figure 28 : Concentration en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique à 48h en fonction de l'intensité de fluorescence, pour les substrats de paille de blé, miscanthus et peuplier, traités par explosion vapeur. Adapté de [227]

### Microscopie confocale à balayage laser

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

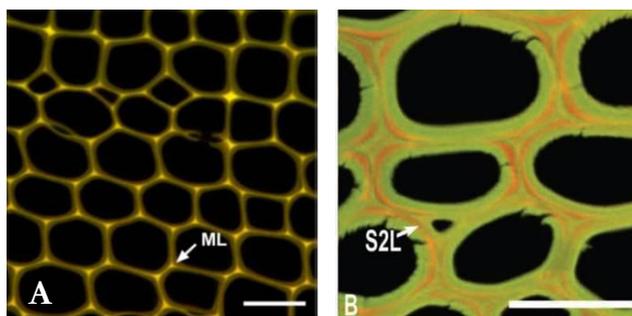


Figure 29 : A. Image en autofluorescence, de pin de Monterey non traité, en coupe transversale (signal de la lignine principalement) ; B. pin de Monterey, marqué à la safranine. La lignine apparaît en rouge, la cellulose en vert. Barre d'échelle de 40  $\mu\text{m}$ . Adapté de [228]

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

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

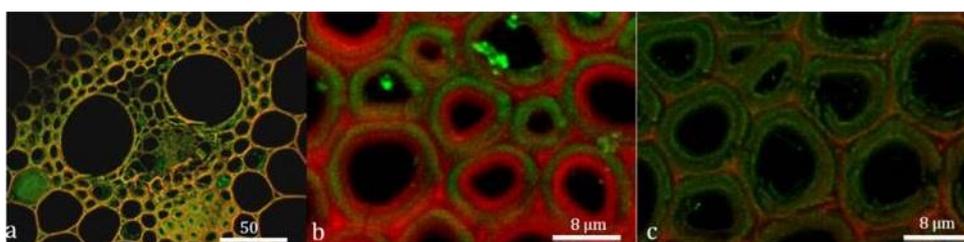


Figure 30 : Images de microscopie confocale de la cellulose (signal vert) et de la lignine (signal rouge) dans des tissus de canne à sucre marqués à la safranine a. échantillon non traité ; b. échantillon non traité – fort grandissement ; c. échantillon traité – fort grandissement [131]

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

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

#### *iv Microscopie par imagerie de temps de fluorescence (FLIM)*

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

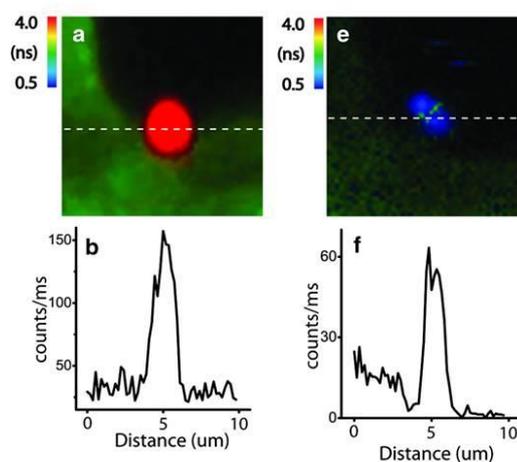


Figure 31 : a. et e., deux gouttes de lignines discriminées par des temps de vie de fluorescence différents ; b. et f., profils spatiaux d'intensité des gouttes observées ; adapté de [108]

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

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

#### v Conclusion sur les couplages

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

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

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

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

Tableau 5. Paramètres pouvant influencer la réactivité des substrats

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

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

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

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

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

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

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

Techniques	Paramètres sondés	Echelle d'information - Résolution	Point fort	Point faible
Physisorption de gaz	Accessibilité de la biomasse (surface BET, forme des pores, distribution en taille de pores)	1,5 à 50 nm	Information texturale à sec	Peu représentatif de la vraie structure poreuse en milieu humide, possible limite de sensibilité dans le cas natif
Cryoporométrie RMN bas champ/ Relaxométrie	Réseau poreux	Du nm à la dizaine de $\mu\text{m}$ au mieux. 1 – 100 nm en pratique avec de l'eau	Analyse de substrats humides	Technique encore peu développée sur ce type de matériaux
MEB	Suivi de l'évolution morphologique, de l'état de surface	50 nm	Possibilité de suivi <i>ex situ</i> de l'évolution d'un substrat en hydrolyse enzymatique, sur zone repérées, en section polie et en observation directe	Choix des zones d'observation – représentativité de l'échantillon
Microscopie confocale à balayage laser	Morphologie des fibres, des tissus.	100 nm	Suivi in situ de la dégradation des tissus envisageable. Distinction de la cellulose et de la lignine potentielle si marquage	Préparation d'échantillon délicate et à optimiser sur coupe, jamais réalisée sur poudre
BlueBox (prototype macrovision INRA)	Morphologie, taille macroscopique des particules/fibres	3,6 $\mu\text{m}$ -cm	Bonne représentativité	Pas de recul sur ces substrats, traitement d'image nécessaire pour une quantification
Réacteur enzymatique	Suivi de morphologie macroscopique, de taille de particules immergée de manière dynamique, et pendant l'hydrolyse enzymatique	4,5 $\mu\text{m}$ -cm	Démonstration de principe déjà existante (INRA)	Jamais corrélé sur nos substrats, traitement d'image nécessaire
MEB	Morphologie et structure des parois cellulaires	$\sim 1$ nm	Marquage possible au $\text{KMnO}_4$ de la lignine, haute résolution	Préparation d'échantillon, sensibilité de la matière au rayonnement
Mesures WRV, et mesure de gonflement	Capacité de rétention d'eau, et capacité au gonflement macroscopique	Multi-échelle (de la centaine de $\mu\text{m}$ à quelques nm <i>a priori</i> )	Simplicité de l'expérience	Reproductibilité médiocre, phénomène à corrélérer avec une multitude de paramètres physico-chimiques
Exclusion de soluté	Microporosité	10-100 nm	Possibilité de travailler en substrat humide	Calibration, versatilité, lenteur des analyses...

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

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

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

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

## 6. Conclusion générale

---

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

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

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

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

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

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

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