Etude de la bioconversion de la chènevotte (cannabis sativa) et de l'alfa (stipa tenacissima) par prétraitement thermomécanique en présence d'un catalyseur acide ou alcalin

Imane Semhaoui

▶ **To cite this version:**

Imane Semhaoui. Etude de la bioconversion de la chènevotte (cannabis sativa) et de l'alfa (stipa tenacissima) par prétraitement thermomécanique en présence d'un catalyseur acide ou alcalin. Autre. Université de La Rochelle; Université Sidi Mohamed ben Abdellah (Fès, Maroc), 2019. Français. NNT : 2019LAROS018 . tel-02517352

HAL Id: tel-02517352
https://theses.hal.science/tel-02517352

Submitted on 24 Mar 2020

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

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

Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques Fès, Maroc
Laboratoire Chimie de la Matière Condensée
Equipe des Procédés pour l'Energie et l'Environnement (EP2E)
Et
Université de La Rochelle, France
Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE-UMR CNRS 7356)

THESE DE DOCTORAT
(Co-tutelle)

Présentée par :

Semhaoui Imane

Pour l'obtention des grades de :
Docteur en Sciences et Techniques (Maroc)
Et
Docteur de l'Université de La Rochelle (France)
Spécialité : Génie des procédés

Etude de la bioconversion de la chènevotte (*cannabis sativa*) et de l'alfa (*stipa tenacissima*) par prétraitement thermomécanique en présence d'un catalyseur acide ou alcalin

Thèse présentée et soutenue le 23 Septembre 2019

Maugard Thierry	Professeur des Universités	Université de La Rochelle, France	Président
Hammani Khalil	Professeur de l'enseignement supérieur	Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc	Rapporteur
Durastanti Jean-Félix	Professeur des Universités	Université Paris-Est Créteil, France	Rapporteur
Rezzoug Sid-Ahmed	Maître de conférences, HDR	Université de La Rochelle, France	Examinateur
Nawdali Mostafa	Professeur Habilité	Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc	Examinateur
Maache-Rezzoug Zoulikha	Maître de conférences, HDR	Université de La Rochelle, France	Directrice de thèse
Zarguili Ikbal	Professeur Habilité	Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Maroc	Co-directeur de thèse
Toyir Jamil	Professeur de l'enseignement supérieur	Faculté Polydisciplinaire de Taza, Maroc	Co-directeur de thèse
Sablé Sophie	Maître de conférences, HDR	Université de La Rochelle, France	Invitée

A ma chère mère et mon cher père
A mon mari
A mes sœurs et mon frère
A ma famille et tous les gens que j'aime…

Remerciements

Ce travail de thèse est le fruit d'un projet de collaboration entre mes directeurs de thèse d'une part de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès au Maroc et d'autre part de l'Université de La Rochelle en France.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à M. Xavier Feaugas directeur du Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE) et M. Karim Ait-Mokhtar directeur adjoint du LaSIE de l'Université de La Rochelle pour leur accueil et de m'avoir accordé l'occasion de travailler dans de bonnes conditions. Je remercie également M. Aziz Zeroual directeur du Laboratoire Chimie de la Matière Condensée (CMC) de l'Université Sidi Modamed Ben Abdellah de m'avoir accueilli et me permettre de réaliser ce travail de thèse.

J'exprime également mes remerciements aux membres de jury, M. Thierry Maugard, M. Sid-Ahmed Rezzoug et Mme Sophie Sablé, professeurs de l'Université de La Rochelle, et M. Jean-Félix Durastanti, professeur de l'Université Paris-Est Créteil et M. Khalil Hammani et M. Mostafa Nawdali, professeurs de la Faculté Polydisciplinaire de Taza, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, accorder de leur temps et accepter la lourde tâche de lire et évaluer l'intégralité de ce manuscrit.

J'exprime mes remerciements les plus profonds à mes directeurs de thèse M. Jamil Toyir et M. Ikbal Zarguili de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, pour m'avoir fait confiance et m'accorder le soutien nécessaire dans la réalisation de ce travail de thèse. Leur disponibilité à répondre à mes questions, à analyser et discuter le travail m'ont permis d'élargir mes connaissances et développer mon esprit analytique dans la recherche scientifique. Je remercie particulièrement M. Ikbal Zarguili pour ses déplacements dans le cadre de ma thèse, son aide et ses conseils ont été bénéfiques dans l'avancement de ce travail. Je remercie également M. Mostafa Nawdali de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, membre de l'équipe de ce projet de collaboration pour sa participation et contribution dans ce travail.

J'adresse mes sincères sentiments de gratitudes et remerciements à ma directrice de thèse Mme Zoulikha Maache-Rezzoug de l'Université de La Rochelle, de m'avoir fait confiance et accepter cette collaboration. Mme Maache-Rezzoug m'a fait découvrir la recherche scientifique, m'a guidé, encouragé tout en partageant avec moi la rigueur à mener un travail scientifique. Grace à son suivi et ses conseils, nous avons pu aboutir à des résultats encourageants dans notre travail. Mes remerciements sont aussi adressés à M. Sid-Ahmed Rezzoug de l'Université de La Rochelle, membre de l'équipe du projet. M. Rezzoug a partagé avec moi des connaissances techniques et du savoir théorique qui ont été essentiels pour le développement de ce travail.

J'adresse ma reconnaissance et mes remerciements à M. Thierry Maugard du Laboratoire LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) de l'Université de La Rochelle pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein du LIENSs et la mise à disposition des moyens nécessaires au développement d'une partie cruciale de ce travail de thèse qu'est l'hydrolyse enzymatique. Je serais toujours reconnaissante à son soutien et conseils enrichissants. Je remercie également M.

Jean Michel Qiuyu Zhao ingénieur du Laboratoire LIENSs d'avoir partagé avec moi les connaissances pratiques nécessaires dans les domaines d'enzymologie et biochimie.

Je remercie énormément Mme Sophie Sablé du Laboratoire LIENSs pour son aimable contribution dans la partie de fermentation. Mme Sablé a été très patiente pour m'initier dans le domaine de microbiologie. Sa disponibilité, son aide et ses conseils ont permis d'enrichir davantage ce travail de thèse.

Je remercie profondément Abdelali pour son aide, ses conseils et sa disponibilité pour contribuer dans ce travail, notamment dans la partie analyse microscopique.

Je remercie tout membre du LaSIE ou LIENSs qui a contribué d'une manière ou d'une autre dans l'accomplissement de ce travail de thèse : Zaid pour son soutien, ses encouragements et les discussions scientifiques, Anas pour son écoute et ses conseils, Anthony, Armelle, Jana, Rama, Ahmed, Ahmed, Mourad, Tita, Mariem, Maroua, Manon, Thomas, Guillaume, Mathilde…

Je remercie également mes collègues du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée pour leur aide et partage du savoir : Ismaïl, Imane, Hafs…

Je tiens à remercier chaleureusement mon mari Otmane de m'avoir soutenu, encouragé et partagé avec moi ses recommandations et conseils pertinents. Tes relectures ont été très utiles lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ta confiance et la force que tu m'as apporté pour continuer à réaliser mes rêves.

J'exprime profondément mon amour et remerciements à mes chers parents, qui ont toujours eu confiance en moi, encouragé et soutenu pour aller au bout de mes rêves. J'adresse mon affection et remerciements à mes sœurs et mon frère, pour leur amour, soutien, et leur aide précieux sur lequel je peux toujours compter. Je remercie également ma respectueuse belle-famille pour l'amour qu'ils ont témoigné à mon égard. Je remercie finalement toute ma famille pour les sentiments positifs et la joie qu'on partage.

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leurs adresse mes remerciements les plus sincères.

Résumé

Dans un contexte d'une prise de conscience en matière de consommation énergétique et de préservation de l'environnement, cette thèse vise à répondre à cette problématique à travers l'étude d'un procédé de production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (BLC). La BLC qui représente une source importante en cellulose, constitue un polymère hydrolysable par action enzymatique en fournissant des sucres monomères fermentescibles en éthanol. La structure complexe et récalcitrante de la matrice lignocellulosique (cellulose, hémicellulose, lignine) constitue un frein majeur à l'attaque enzymatique, d'où la nécessité d'une étape de prétraitement afin de perturber les barrières physico-chimiques devant l'accessibilité des enzymes aux polymères cellulosiques.

L'étude d'un prétraitement hydrothermomécanique combiné à un catalyseur acide ou basique en faible concentration a été réalisée sur deux substrats ; chènevotte (sous-produit du chanvre industriel) et l'alfa (plante endémique au Maroc). La caractérisation des deux substrats a montré leur potentiel intéressant en holocellulose pour le procédé de bioconversion et les résultats d'analyse après prétraitement ont montré des modifications importantes de la structure interne (FTIR, DRX), de la morphologie (MEB), des propriétés d'adsorption (BET) et de composition chimique par rapport à l'état natif. L'augmentation de la surface spécifique des deux substrats prétraités a permis d'améliorer les rendements d'hydrolyse grâce à une meilleure accessibilité des enzymes aux polymères cellulosiques. D'un point de vue environnemental, l'imprégnation par aspersion, en limitant la génération de fractions liquides résiduelles, reste plus avantageuse que l'imprégnation par immersion de la matière. La structure de la chènevotte, s'apparentant à celle du bois dur, a manifesté une certaine capacité de neutralisation exigeant une consommation supplémentaire en acide comparée à l'alfa. L'étude par la méthode des plans d'expériences visant à la détermination des conditions optimales du prétraitement qui maximise le rendement en sucres récupérés a été réalisée en milieu acide et alcalin. Les conditions d'hydrolyse enzymatique ont également été étudiées et optimisées par cette méthode. Des rendements maximums en sucres de 90 et 83,2% pour le prétraitement à l'acide sulfurique et l'hydroxyde de sodium ont été respectivement obtenus. Des essais de fermentation de l'hydrolysat enrichi en glucose ont permis d'atteindre des rendements de 54,1 et 46,4% en éthanol.

Mots clés : Chènevotte, alfa, prétraitement thermomécanique, H_2SO_4, NaOH, aspersion, hydrolyse enzymatique, éthanol

Abstract

In a context of an awareness of energy consumption and environmental preservation, this thesis aims to respond through the study of a process of bioethanol fuel production from lignocellulosic biomass (LCB). LCB, which is an important source of cellulose, is a hydrolyzable polymer by enzymatic action and provides monomer sugars fermentable into ethanol. The complex and recalcitrant structure of the lignocellulosic matrix (cellulose, hemicellulose, lignin) is a major obstacle to enzymatic attack and requires a pretreatment step to disrupt the physico-chemical barriers facing the accessibility of enzymes to the cellulosic polymers.

The study of a hydrothermomechanical pretreatment combined with acid or alkali catalyst in low concentrations was carried out on two materials: hemp hurds (by-product of industrial hemp) and alfa (endemic plant in Morocco). The characterization of the two substrates showed the interesting potential in holocellulose for the bioconversion process and the analysis of pretreatment step results showed significant changes in the internal structure (FTIR, DRX), morphology (MEB), adsorption properties (BET) and chemical composition compared to the native raw materials. Increasing the specific surface area allowed improved hydrolysis yields due to better accessibility of enzymes to cellulosic polymers. From an environmental point of view, impregnation by spraying, by limiting the generation of residual liquid fractions, is more advantageous than impregnating by immersion. Hemp hurds, with its hardwood structure, showed a neutralizing capacity and required more quantities of acid catalyst compared to alfa.

The experimental design aimed for the determination of pretreatment optimal conditions that maximize sugar yield and was carried out in both acid and alkali conditions. This method was also used for studying and optimisation of enzymatic hydrolysis conditions. Sugar yields of 90 and 83.2% for sulphuric acid pretreatment and sodium hydroxide were respectively achieved. Fermentation tests of the glucose enriched hydrolysate produced yields of 54.1 and 46.4% in ethanol.

Keywords: Hemp hurds, Moroccan alfa, thermomechanical pretreatment, H_2SO_4, NaOH, aspersion, enzymatic hydrolysis, ethanol.

Abréviations

BLC	Biomasse lignocellulosique
NDF	Neutral detergent fiber
ADF	Acid detergent fiber
ADL	Acid detergent lignin
NREL	National Renewable Energy Laboratory
FTIR	Fourier Transform InfraRed spectroscopy
DRX	Diffractométrie de rayons X
MEB	Microscopie électronique à balayage
BET	Brunauer, Emmett et Teller
ASAP	Accelerated surface area and porosymetry analyzer
HTST	Haute température/haute pression-courte durée
DIC	Détente instantanée contrôlée
RP-HMT	Reduced-Pressurized Heat Moisture Treatment
DV-HMT	Direct Vapor-Heat Moisture Treatment
MP	Matière première
MS	Matière sèche
MM	Matière minérale
MO	Matière organique
ESEM	Environmental scanning elctron microscope
HPLC	High performance liquid chromatography
HMF	Hydroxyméthylfurfural
DNS	acide 3,5-dinitrosalicylique
RGS	Rendement global en sucres
RCC	Rendement de conversion cellulosique
IMP	Imprégnation
ASP	Aspersion
IMM	Immersion

Table de matières

INTRODUCTION GENERALE 1
Chapitre 1 : Etude bibliographique 5
1. INTRODUCTION 9
2. CONTEXTE ENERGETIQUE ET ENVIRONNEMENTALE 9
3. BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE, ENERGIE RENOUVELABLE 13
3.1 Généralités sur la biomasse végétale 13
3.2 Origine, composition et structure de la biomasse lignocellulosique 14
3.3 Propriétés de la biomasse lignocellulosique influençant le procédé de bioconversion 22
3.4 Matières lignocellulosiques candidates pour cette étude 24
4. PROCEDE DE BIOCONVERSION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE PAR VOIE BIOCHIMIQUE 30
4.1 Généralités sur le procédé de bioconversion 30
4.2 Procédés de prétraitements conventionnels 31
4.3 Procédés de prétraitements émergents 48
4.4 Hydrolyse enzymatique du substrat prétraité 54
4.5 Fermentation alcoolique en éthanol 57
4.6 Distillation 60
5. VALORISATION DU BIOETHANOL EN HYDROGENE 61
6. CONCLUSION 62
Chapitre 2 : Matériels et méthodes 64
1. MATIERES PREMIERES LIGNOCELLULOSIQUES 68
1.1 Origine 68
1.2 Conditionnement 68
2. REACTIFS 68
3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE CARACTERISATION DU SUBSTRAT 69
3.1 Analyse de la composition chimique 69
3.2 Analyse du pH 74
3.3 Détermination de la capacité d'absorption d'eau 76
4. METHODES D'ANALYSE DE LA STRUCTURE 76
4.1 Caractérisation par approche microscopique 76
4.2 Caractérisation de la structure 77
5. ANALYSE STATISTIQUE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES . 81
5.1 Principe de base 82
5.2 Modélisation mathématique 84
5.3 Choix du plan centré composite 84
6. METHODE DE PRETRAITEMENT COMBINE DE LA MATIERE PREMIERE 85
6.1 Imprégnation du catalyseur chimique 86
6.2 Traitement thermomécanique par le procédé DIC « Détente Instantanée Contrôlée » 87
6.3 Conditions du plan d'expériences 92

6.4 Calcul de l'indice de sévérité : ... 93
6.5 Calcul de la charge en catalyseur chimique ... 94
7. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA MATIERE PRETRAITEE ... 94
7.1 Préparation des réactifs ... 94
7.2 Les enzymes ... 94
7.3 Protocole de l'hydrolyse enzymatique ... 95
7.4 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS ... 95
7.5 Analyse de l'hydrolysat par Chromatographie Liquide à Haute Performance ... 96
7.6 Calcul du rendement global en sucres réducteurs ... 98
7.7 Calcul du rendement de conversion cellulosique ... 98
8. FERMENTATION DES HYDROLYSATS ... 98
8.1 Conditionnement de l'hydrolysat avant fermentation ... 98
8.2 Protocole de fermentation ... 99
8.3 Analyse du taux de croissance des cellules de levure ... 99
8.4 Dosage de l'éthanol ... 99
8.5 Calcul du rendement en éthanol ... 99
9. SCHEMA GLOBAL DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE DU PROCEDE DE BIOCONVERSION ETUDIE ... 100
Chapitre 3 : Caractérisation physique et chimique et impact du prétraitement combiné sur la modification structurale de la biomasse lignocellulosique ... 101
1. INTRODUCTION ... 105
2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA MATIERE ... 105
2.1 Caractérisation microscopique ... 105
2.2 Caractérisation structurale et texturale ... 106
2.3 Détermination de la composition chimique ... 109
2.4 Détermination de la capacité d'absorption ... 111
3. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR LA CHENEVOTTE ... 112
3.1 Prétraitement du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion 112
3.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion ou immersion ... 125
4. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR L'ALFA ... 136
4.1 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion ... 137
4.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion et immersion ... 146
5. CONCLUSION ... 153
Chapitre 4 : Hydrolyse enzymatique de la biomasse prétraitée. Essais de fermentation ... 156
1. INTRODUCTION ... 160
2. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE ... 160
2.1 Effet du prétraitement en conditions acides ... 161

2.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines 172
2.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de la chènevotte prétraitée en conditions acides et alcalines 180
3. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'ALFA 184
3.1 Effet du prétraitement en conditions acides 184
3.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines 189
3.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de l'alfa prétraitée en conditions acides et alcalines 193
4. EFFET D'AUTRES PARAMETRES SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE 195
4.1 Effet de la granulométrie 195
4.2 Effet de la teneur en eau en solution d'imprégnation 196
4.3 Effet de la détente vers le vide lors du traitement thermomécanique 198
5. OPTIMISATION DE LA BIOCONVERSION DE LA CHENEVOTTE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES 200
5.1 Optimisation des conditions de prétraitement 200
5.2 Optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique 207
6. ESSAIS DE FERMENTATION ALCOOLIQUE 211
6.1 Essais préliminaires 211
6.2 Fermentation des hydrolysats de la chènevotte 212
7. CONCLUSION 215
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 218
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 223
Valorisation scientifique des travaux réalisés 244
Annexes 245

INTRODUCTION GENERALE

À l'échelle mondiale, la situation énergétique et environnementale actuelle présente plusieurs problématiques émergentes. La croissance constante de la demande énergétique, l'appauvrissement des ressources fossiles, la pollution atmosphérique et ses répercussions sur le réchauffement climatique et la santé humaine, constituent des facteurs majeurs pour une prise de conscience générale en matière de consommation énergétique et de préservation de l'environnement. Cette volonté s'est traduite par des actions engagées dans une politique de développement durable, qui passe par l'optimisation des technologies existantes, mais également par la diversification et le développement de nouveaux procédés. Le développement de carburant alternatifs « biocarburants » présente alors une solution parmi d'autres dans le cadre de l'offre globale des énergies renouvelables. Le bioéthanol est un carburant liquide obtenu à partir de la transformation de la matière organique. Celle-ci est de nature saccharifère ou amylacée dans la production du bioéthanol dit de première génération, ou de nature cellulosique pour celui dit de deuxième génération. Cette dernière génération vient répondre aux problèmes de concurrence avec la chaine alimentaire rencontrés par la première génération. Le bioéthanol de deuxième génération suscite alors un intérêt grandissant surtout de la part du secteur du transport, car il présente plusieurs avantages ; adapté aux systèmes de motorisation des véhicules existants, sa combustion est moins polluante que celle des carburants fossiles et il peut provenir de la ressource renouvelable la plus abondante, qui est la biomasse lignocellulosique. L'optimisation du procédé de bioconversion de la matière lignocellulosique en bioéthanol présente alors un défi majeur à relever.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de Partenariat Hubert Curien (PHC) « TOUBKAL (N°TBK/15/13-Campus France :32486SD) » qui est un programme de coopération scientifique bilatéral porté par les Ministères français des Affaires Etrangères et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'une part et les Ministères marocains de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de l'Agriculture et du Développement rural d'autre part. Il a été réalisé grâce à une collaboration entre le Laboratoire des Sciences de l'ingénieur pour l'Environnement (LaSIE-UMR CNRS 7356) de l'Université de La Rochelle et l'Equipe des Procédés pour l'Energie et l'Environnement (EP2E) de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdelah de Fès.

Le travail de cette thèse a pour objectif principal l'exploration du potentiel de bioconversion en bioéthanol de deux substrats lignocellulosiques appartenant à deux classes différentes. Dans le contexte de bioraffinerie, le processus de bioconversion est basé sur quatre étapes principales distinctes : le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique, la fermentation et la séparation. Ce travail de thèse s'est particulièrement focalisé sur l'étude de l'étape de prétraitement de la biomasse lignocellulosique, étape cruciale d'un point de vue de la viabilité du procédé de bioconversion qui représente la source de molécules fermentescibles. La biomasse lignocellulosique est composée principalement de trois fractions liées entre elles : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La cellulose est un polymère hydrolysable par action enzymatique fournissant des sucres monomères fermentescibles en éthanol. Or, la structure

complexe et récalcitrante de la cellulose rend son accessibilité aux enzymes difficile, ce qui diminue le rendement en sucres récupérés. Le procédé de prétraitement permet alors la déstructuration de la matrice lignocellulosique afin d'exposer les polymères cellulosiques à l'action des enzymes. Par ailleurs, des réactions de dégradation des monomères de sucres peuvent avoir lieu pendant le prétraitement avec un risque réel d'inhibition des réactions de fermentation, en aval du processus de bioconversion. Par conséquent, la compréhension des mécanismes qui contribuent à la transformation de la matière lignocellulosique lors de l'étape de prétraitement est alors indispensable. Les modifications structurales produites au sein de la matière lignocellulosique, leur influence sur le rendement d'hydrolyse enzymatique constituent des éléments déterminants pour la maîtrise des connaissances du processus de bioconversion.

L'alfa (plantes herbacée) et la chènevotte (coproduit en bois du procédé de défibrage du chanvre industriel) sont les deux substrats étudiés dans le cadre de ces travaux. Dans la littérature, le panel des matières lignocellulosiques étudié est très large, principalement la paille de blé, la bagasse de canne à sucres, les tiges de maïs, etc… Les procédés majoritairement étudiés se sont basés sur des méthodes de prétraitements conventionnelles, qui consistent en des traitements physiques, physico-chimiques ou chimiques, dont l'objectif principal est la solubilisation des fractions hémicelluloses et/ou lignine. Les traitements en conditions acides sont reconnus pour leurs actions sur l'hydrolyse de la liaison osidique au sein de la fraction des hémicelluloses, alors que ceux en conditions basiques attaquent principalement la fraction de lignine en agissant sur des liaisons de type éther et ester, majoritairement présentes dans la lignine. Les principales modifications recherchées au sein du substrat lignocellulosique sont l'augmentation de la surface spécifique, la diminution du degré de polymérisation, la diminution de la cristallinité de la cellulose, etc…

Notre travail a consisté à combiner un traitement chimique à l'acide sulfurique ou l'hydroxyde de sodium avec un procédé thermomécanique par haute pression de vapeur saturée. L'agent chimique est utilisé pour son action de catalyseur des réactions d'hydrolyse des liaisons chimiques au sein du substrat lignocellulosique à haute température. La technique d'imprégnation de catalyseur la plus largement utilisée est l'immersion, qui présente l'inconvénient de générer des fractions résiduelles de solutions chimiques, nécessitant un post-traitement de séparation et de neutralisation.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons développé une technique d'imprégnation par aspersion, qui consiste à répartir, par vaporisation, des quantités suffisantes de solutions chimiques, avec une même efficacité du catalyseur que la méthode classique mais sans les inconvénients. Le substrat imprégné par le catalyseur subit ensuite un traitement thermomécanique par le procédé de Détente Instantanée Contrôlée « DIC ». Ce traitement consiste à soumettre dans un réacteur le substrat lignocellulosique à une haute température, obtenue par un contact direct du substrat avec de la vapeur d'eau saturée sous haute pression, pendant un temps fixé. L'étape de traitement thermique est suivie par une détente abrupte vers une pression réduite de 5 kPa. La détente brusque permet d'une part l'explosion de la matière provoquant des modifications structurales au sein de la matrice et d'autres part d'abaisser sa

température, stoppant ainsi les réactions thermiques de dégradation. L'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité a été ensuite effectuée afin d'évaluer les performances du prétraitement dans sa déstructuration. L'hydrolysat obtenu a finalement subi des tests de fermentation afin de convertir les monomères de glucose en éthanol. Afin d'évaluer l'efficacité du procédé, différentes techniques de caractérisation ont été mises en œuvre au cours de ce travail de thèse ; la spectroscopie infrarouge (FTIR), la diffractométrie des rayons X (DRX) ou la microscopie électronique à balayage (MEB).

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres et est organisé comme décrit ci-dessous :

Le premier chapitre présente un état de l'art des connaissances nécessaires à la compréhension et l'interprétation des résultats obtenus dans les différentes parties abordées au cours de la thèse. Une partie entière est consacrée à la présentation générale de la biomasse lignocellulosique, au bilan des connaissances sur sa structure chimique ainsi que sur les propriétés influençant sa bioconversion. Les différentes étapes du processus de bioconversion sont ensuite détaillées. Une partie de la synthèse bibliographique a été consacrée aux procédés de prétraitement, répartie selon deux catégories de procédés : conventionnel et innovants. L'utilisation potentielle de l'hydrolyse enzymatique dans la saccharification du substrat prétraité est également abordée, suivie d'un examen bibliographique sur l'opération de la fermentation alcoolique des sucres monomères contenus dans l'hydrolysat. Enfin, une dernière partie de ce chapitre est dédiée à la présentation du procédé de valorisation du bioéthanol en hydrogène.

Le second chapitre est consacré aux différents matériels et méthodes utilisés au cours de la partie expérimentale. Dans un premier temps, les techniques de caractérisation de la matière première sont détaillées, puis dans un second temps la méthode d'expérimentation et d'optimisation par plan d'expériences à surface de réponse a été abordée. Les différents protocoles expérimentaux des prétraitements, de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation, ainsi que les techniques d'analyses utilisées sont également détaillés.

Le troisième chapitre de ce manuscrit est consacré aux résultats de caractérisation des deux matières premières étudiées, à savoir la chènevotte et l'alfa. Cette caractérisation a permis d'acquérir les connaissances nécessaires pour l'évaluation du potentiel des deux matières premières dans le procédé de bioconversion en bioéthanol. Ensuite, l'impact du prétraitement sur les deux matières premières a été évalué au regard des résultats d'analyses structurales, chimiques et morphologiques.

Les principaux résultats de l'étude de l'hydrolyse enzymatique des deux substrats prétraités sont ensuite présentés dans le quatrième chapitre. Les résultats de l'effet des modifications produites au niveau des deux matières premières sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique sont donnés. L'étude des corrélations entre la libération des sucres après prétraitement et la saccharification enzymatique est détaillée. Les résultats des analyses de la distribution en sucres monomères et des composés de dégradation de sucres sont également présentés. Les résultats relatifs à l'étape de fermentation des hydrolysats obtenus sont aussi rapportés.

Enfin, pour compléter le travail, une discussion générale sur l'ensemble des résultats est présentée, suivie des principales conclusions et des perspectives à ces travaux.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

Table des matières

1. INTRODUCTION 9
2. CONTEXTE ENERGETIQUE ET ENVIRONNEMENTALE 9
3. BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE, ENERGIE RENOUVELABLE 13
3.1 Généralités sur la biomasse végétale 13
3.2 Origine, composition et structure de la biomasse lignocellulosique 14
3.2.1 Origine de la biomasse lignocellulosique 14
3.2.2 Composition et structure de la biomasse lignocellulosique 15
3.2.3 Liaisons intra et inter-polymères dans la biomasse lignocellulosique 21
3.3 Propriétés de la biomasse lignocellulosique influençant le procédé de bioconversion 22
3.3.1 Propriétés chimiques 22
3.3.2 Propriétés physiques 23
3.4 Matières lignocellulosiques candidates pour cette étude 24
3.4.1 Le chanvre industriel « Cannabis sativa L. » 24
3.4.2 L'alfa « Stipa tenacissima L. » 28
4. PROCEDE DE BIOCONVERSION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE PAR VOIE BIOCHIMIQUE 30
4.1 Généralités sur le procédé de bioconversion 30
4.2 Procédés de prétraitements conventionnels 31
4.2.1 Prétraitements physiques 34
4.2.2 Prétraitements physico-chimiques 34
4.2.3 Prétraitements chimiques 42
4.3 Procédés de prétraitements émergents 48
4.3.1 Détente Instantanée Contrôlée 48
4.3.2 Irradiation par micro-ondes 50
4.3.3 Ultrasons 51
4.3.4 Liquides ioniques 52
4.3.5 Fluides supercritiques 53
4.4 Hydrolyse enzymatique du substrat prétraité 54
4.4.1 Les cellulases 54
4.4.2 Mode d'action des cellulases 56
4.4.3 Paramètres influençant l'activité des cellulases 56
4.5 Fermentation alcoolique en éthanol 57
4.6 Distillation 60
5. VALORISATION DU BIOETHANOL EN HYDROGENE 61
6. CONCLUSION 62

Liste des figures

Figure 1 : Consommation totale d'énergie finale par secteur, (a) : Maroc, (b) : France (Source AIE, 2015) 9

Figure 2 : Emissions mondiales en CO_2 provenant de la combustion des carburants par secteur (Source AIE, 2015) 11

Figure 3 : Aspects environnementaux, sociaux et économiques de la durabilité des biocarburants 11

Figure 4 : Demandes futures en biocarburants (Source AIE, 2009) 12

Figure 5 : Cycles de CO_2 pour les combustibles dérivés du pétrole et de la biomasse (Alonso et al., 2010) 13

Figure 6 : Catégories majeures de la biomasse lignocellulosique 15

Figure 7 : Les principaux composants et structure de la biomasse lignocellulosique (Isikgor and Becer, 2015) 16

Figure 8 : Structure moléculaire de la cellulose 16

Figure 9: Structure des hémicelluloses 18

Figure 10 : Les trois unités du polymère de la lignine 19

Figure 11 : Liaisons entre les monomères et polymères de la biomasse lignocellulosique 21

Figure 12 : Les surfaces cultivées en chanvre. (France, 2013) 24

Figure 13 : Les différents composants et utilisations du chanvre industriel 25

Figure 14 : Coupe transversale d'une tige de chanvre examinée par analyse optique (Bouloc, 2006) (V: vaisseaux ; F : fibres xylémiennes) 26

Figure 15 : Dessin anatomique du chanvre planche réalisée par (Köhler, 1898) 27

Figure 16 : Différentes applications de l'alfa 28

Figure 17 : Morphologie de l'alfa, (a) : à l'état brute sous forme de touffe, (b) : illustration des différents composants de l'alfa 29

Figure 18 : Schéma des procédés SHF (a) et SSF (b) (Yang et al., 2013) 31

Figure 19 : Effet de prétraitement sur la biomasse lignocellulosique (Mosier et al., 2005) ... 32

Figure 20 : Effets majeurs du prétraitement sur la biomasse lignocellulosique 34

Figure 21 : Schéma du système du prétraitement de l'explosion à la vapeur (Liu et al., 2013) 35

Figure 22 : Réaction de l'hydrolyse acide de la liaison glycosidique 36

Figure 23 : Formation en milieu acide du furfural, hydroxymethlfurf (HMF), l'acide levulinique et l'acide formique à partir des monosaccharides 36

Figure 24 : Illustration schématique des différents types d'installation pour le prétraitement de la thermohydrolyse. (a) : réacteur co-courant ; (b) : réacteur contre-courant ; (c) : réacteur à écoulement frontal (*flow through*) (Mosier et al., 2005) 41

Figure 25 : Réactions de délignifications. (a) : Hydrolyse basique des fonctions éthers, (a) : Réaction de saponification des liaisons esters (Privas, 2013) 45

Figure 26 : Schéma du procédé Organosolv (Zhang et al., 2016) 46

Figure 27 : Représentation du cycle du traitement DIC 48

Figure 28 : Effet combiné des prétraitements mécanique et thermomécanique par DIC sur le taux de sucres réducteurs et sur la vitesse initiale d'hydrolyse. PGB (paille grossièrement broyée), PIB (intermédiairement broyée) et PFB (finement broyée) (Pierre et al., 2011) 49

Figure 29 : Vitesse initiale d'hydrolyse de 10 g/L de paille en fonction de la concentration en cellulases. Réactions menées dans du tampon citrate-phosphate pH 4,6 à 50 °C sous une agitation de 600 rpm. A et B, C et D: profils expérimentaux et théoriques de la paille prétraitée (15 min à 165°C) et du témoin, respectivement (Pierre et al., 2011) 49

Figure 30 : Schéma simplifié de l'absorption du catalyseur chimique au sein du substrat lignocellulosique 50

Figure 31 : Schéma du phénomène de cavitation provoqué par les ultrasons (Vinatoru, 2001) 52

Figure 32 : Mécanisme possible de la dissolution de la cellulose dans le liquide ionique [C4mim] Cl (Feng and Chen, 2008) 53

Figure 33 : Représentation schématique de la structure modulaire de l'enzyme exoglucanase (Beckham et al., 2010) 54

Figure 34 : Isothermes d'adsorption d'enzyme de la paille prétraitée à 7 bars/15 min (A) et native (B) (Pierre et al., 2011). 55

Figure 35 : Mécanisme de l'action des cellulases 56

Figure 36 : Croissance typique des microorganismes lors de la fermentation (Stanbury et al., 1995) 58

Figure 37 : Génération de composés inhibiteurs (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) 59

Figure 38 : Schéma du procédé de distillation azéotropique (Kumar et al., 2010) 60

1. INTRODUCTION

Ce chapitre consacré à l'état de l'art, propose une synthèse bibliographique des différents travaux, fondamentaux et techniques nécessaires à la compréhension du sujet. La connaissance de la composition et de la structure de la matière lignocellulosique est primordiale pour permettre la compréhension des réactions qui peuvent avoir lieu lors des prétraitements physicochimiques. Une partie de cette analyse bibliographique est consacrée à la connaissance des différents types de liaisons majoritairement présentes dans ce type de substrat ainsi que les paramètres influençant le procédé de bioconversion. Une analyse détaillée des procédés de bioconversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol est présentée ; les procédés de prétraitements conventionnels et émergents sont décrits, en mettant l'accent sur les principales modifications engendrées au sein de la biomasse. Aussi, les principales méthodes biologiques de saccharification enzymatique et fermentation alcoolique sont présentées. Et enfin, la dernière partie du chapitre, permet de donner un aperçu sur le procédé de valorisation du bioéthanol par reformage catalytique en vue de la production de l'hydrogène.

2. CONTEXTE ENERGETIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

a) Volet Energie

L'énergie est indispensable pour la croissance économique et le développement des sociétés. La demande mondiale en énergie ne cesse d'augmenter à la suite de l'accroissement démographique et de l'augmentation des besoins des pays en voie de développement. D'après l'Agence internationale de l'Energie (IEA), la demande énergétique mondiale, mesurée par l'approvisionnement total en énergie primaire (ATEP), a augmenté de près de 150% entre 1971 et 2015, en s'appuyant principalement sur les combustibles fossiles (principalement le pétrole). En 2015, les sources fossiles représentaient 82% de l'ATEP mondiale (IEA, 2017a). D'après le même organisme, les scénarios tendanciels sur l'évolution de l'ATPE mondial montrent que cette augmentation restera soutenue d'ici 2030, où elle devrait varier de 60 à 75% entre 2000 et 2030.

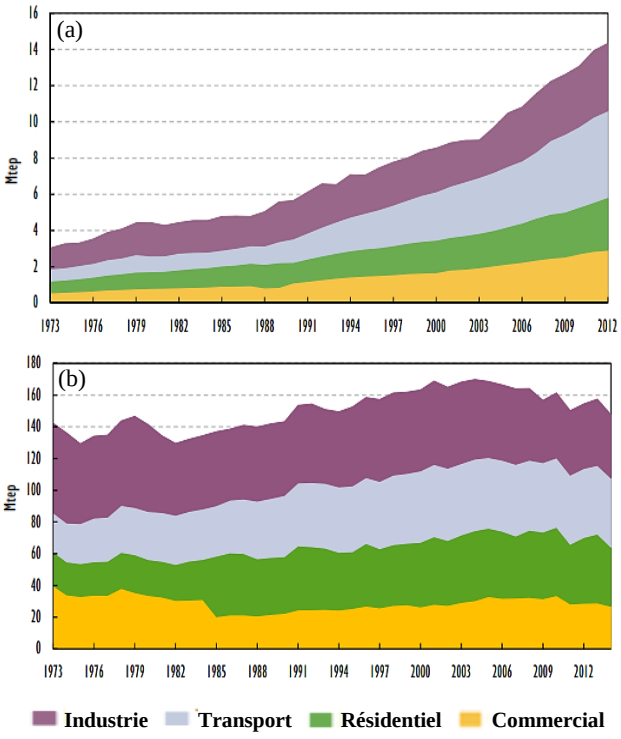


Figure 1 : Consommation totale d'énergie finale par secteur, (a) : Maroc, (b) : France (Source AIE, 2015)

Le Maroc est très fortement dépendant des importations d'énergie. Près de 91% de l'énergie utilisée provient de l'étranger. D'après l'AIE, l'ATEP du Maroc a atteint 19,4 millions de tonnes d'équivalent pétrole (Mtep) en 2015. Le mix énergétique du Maroc est dominé par le pétrole, qui représente 60,6% de

l'ATEP. Les secteurs du transport et de l'industrie sont les plus gros consommateurs d'énergie au Maroc et ont totalisé à eux deux près de 60% de la consommation totale d'énergie finale en 2012, soit 33,2% pour le transport et 26% pour l'industrie (Figure 1, a) (IEA, 2014).

L'ATEP de la France s'élevait à 245,7 millions de tonnes d'équivalent pétrole (Mtep) en 2015. Le secteur économique de l'énergie en France comprend la production locale (55,2% en 2015) et l'importation (44,8%) d'énergie primaire, les combustibles fossiles représentaient 46,6% de l'ATEP, constitués de 28,8% de pétrole. En 2014, le secteur du transport représente 29,5% de la consommation totale d'énergie finale (Figure 1-b) (IEA, 2017b).

Ces dernières années, la demande mondiale en énergie s'est avérée supérieure aux réserves en énergies fossiles, ce qui représente un défi pour une transition énergétique des énergies fossiles épuisables vers des énergies renouvelables durables.

b) Volet environnement

L'impact de l'activité humaine sur le système climatique, notamment par son usage des combustibles fossiles, est approuvé. Selon le cinquième rapport d'évaluation du Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC), les concentrations de dioxyde de carbone (CO_2) dans l'atmosphère ont augmenté de façon significative au cours du dernier siècle (GIEC, 2013). La concentration moyenne de CO_2 (403 ppm) est environ 40% plus élevée qu'au milieu des années 1800, avec une croissance moyenne de 2 ppm/an au cours des dix dernières années. Des augmentations significatives ont également eu lieu dans les niveaux de méthane (CH_4) et d'oxyde nitreux (N_2O). Les émissions de CO_2 provenant de l'énergie représentent la plus grande part des émissions mondiales de gaz à effet de serre (GES), soit plus des trois quarts des émissions.

Le secteur du transport est le deuxième plus grand secteur émetteur de CO_2 dans le monde (Figure 2). Au Maroc, les secteurs les plus émetteurs de CO_2 sont la génération électrique et le transport. Ce dernier, en 2014 représentait 28,85% des émissions totales. Alors qu'en France, le transport est le plus grand secteur émetteur de CO_2, avec 42,4% des émissions totales (IEA, 2017b, 2014). L'augmentation des teneurs de gaz à effet de serre dans l'atmosphère engendre une augmentation de la température atmosphérique globale moyenne, ce qui en résulte des dérèglements climatiques majeurs (Balat, 2011; Chen and Fu, 2016; Zabed et al., 2016). Un accord international pour lutter contre les changements climatiques, a été adopté par 195 nations en décembre 2015, à Paris (COP 21). Cet accord vise à maintenir l'augmentation de la température mondiale bien en dessous de 2 °C et de mener des efforts encore plus poussés pour limiter cette augmentation à 1,5 °C au-dessus des niveaux préindustriels, notamment en renforçant le déploiement d'énergies renouvelables (Vanwerts, 2015).

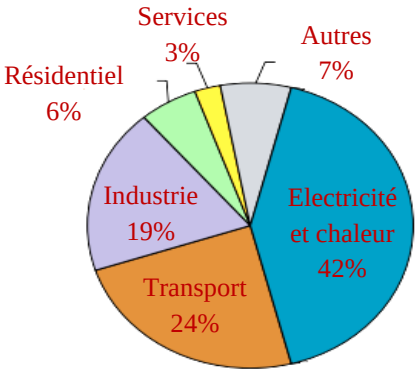


Figure 2 : Emissions mondiales en CO_2 provenant de la combustion des carburants par secteur (Source AIE, 2015)

c) Développement de carburants alternatifs : enjeux et perspectives

Dans le cadre du développement des systèmes énergétiques plus durables pour le secteur de transport, une multitude de travaux de recherche et de développement sont menées dont l'objectif est de combiner la réduction de l'impact environnemental à la diminution de la dépendance au pétrole et à l'optimisation de l'emploi des terres agricoles et forestières. Le développement de procédé de production des biocarburants fait partie des pistes étudiées. Pour le développement de ces procédés, il est pertinent de prendre en considération les éléments essentiels de durabilité, de dimensions économique, sociale et environnementale selon le schéma illustré dans la Figure 3.

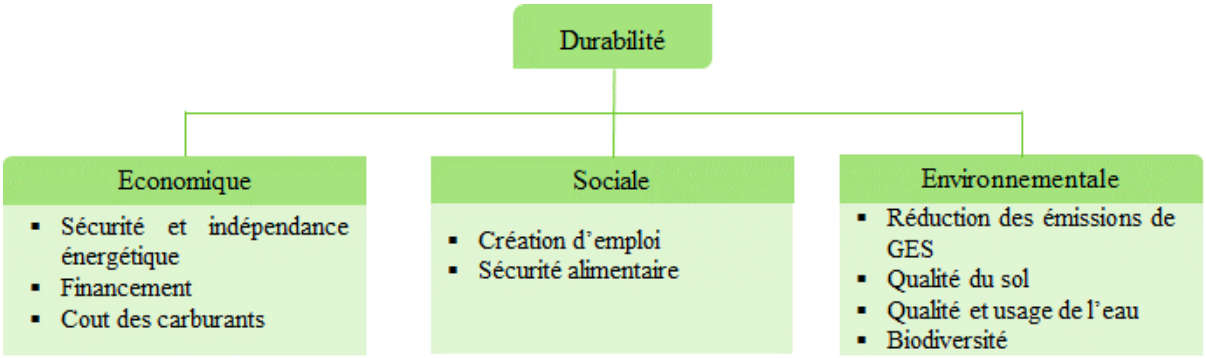


Figure 3 : Aspects environnementaux, sociaux et économiques de la durabilité des biocarburants

Un biocarburant est un carburant liquide ou gazeux produit à partir de la transformation de matières organiques non fossiles issus de la biomasse. Le bioéthanol par exemple, est le carburant principal utilisé comme substitut de l'essence pour le transport routier. Son incorporation dans l'essence atteint actuellement environ 30% en Brésil, sans modification majeure des infrastructures de distribution ou dans les véhicules. Sa combustion ne produit que du CO_2 qui est immobilisé pendant le processus de photosynthèse, et de la vapeur d'eau et pas ou peu d'oxydes azotés et soufrés (NO_x, SO_x).

Le bioéthanol résulte de la bioconversion fermentaire, par des micro-organismes, des sucres contenus dans des plantes, ces dernières sont variées et peuvent être classées en trois catégories : saccharifère comme la betterave, amylacées comme les céréales et lignocellulosique comme le bois, la paille, etc…Le bioéthanol produit à partir des deux premières catégories de plantes est dit de première génération. Cette utilisation engendre inéluctablement une concurrence directe avec la chaine alimentaire animale et humaine. Ainsi, la deuxième génération utilisant la matière lignocellulosique est en voie de développement. La matière est issue de composants ligneux ou à base de carbone ne faisant pas partie de l'alimentation, ce qui constitue un avantage de disponibilité supérieur et de non-concurrence alimentaire par rapport à la première génération de biocarburants. Les procédés de transformation de la biomasse lignocellulosique devront offrir plusieurs avantages :

- Être totalement autonomes de point de vue des consommations énergétiques,
- Apporter les meilleures réponses au problème de la réduction des émissions CO_2,
- Présenter un bon potentiel de réduction des coûts de biocarburants,
- Ne pas conduire à la synthèse de sous-produits ou co-produits.

L'utilisation mondiale des biocarburants devrait progresser d'une manière significative à plus long terme, atteignant 2,7 Mb/j en 2030 (Figure 4). Près d'un quart de cette augmentation provient des technologies de deuxième génération. Le défi du développement des biocarburants de deuxième génération est de valoriser la plante entière et d'utiliser une plus grande variété de matières premières. Ces nouveaux procédés sont confrontés à des verrous technologiques à faire lever, avant qu'ils soient opérationnels à l'échelle industrielle.

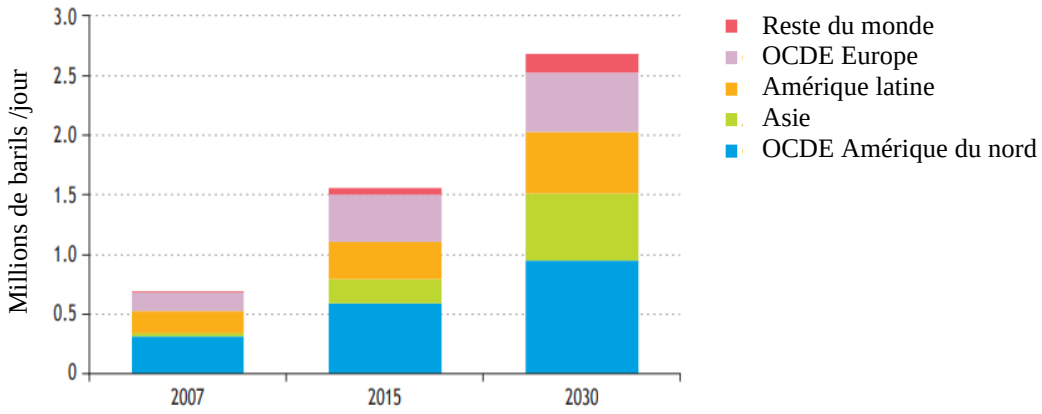


Figure 4 : Demandes futures en biocarburants (Source AIE, 2009)

3. BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE, ENERGIE RENOUVELABLE

3.1 Généralités sur la biomasse végétale

La biomasse végétale est reconnue comme une source d'énergie propre et renouvelable possédant un potentiel important pour substituer, sur le marché de l'énergie, les combustibles fossiles conventionnels (Cai et al., 2017; Zhang et al., 2016). A la différence des autres énergies renouvelables, la biomasse libère lors de son utilisation par combustion du dioxyde de carbone dans l'atmosphère. Cependant, cette combustion ne rejette dans l'atmosphère que ce que la plante y avait puisé lors de la croissance par photosynthèse. Un équilibre est obtenu et le bilan théorique sur le dioxyde de carbone produit est donc neutre, l'utilisation de la biomasse végétale comme source d'énergie rentre dans le cycle naturel du carbone, ce qui fait de ce type de biomasse une source d'énergie renouvelable (Figure 5).

Au sens large, le terme biomasse signifie la masse totale des organismes vivants présents dans un milieu naturel donné. Depuis le premier choc pétrolier, en 1973, ce concept s'applique aux produits organiques végétaux utilisés à des fins énergétiques ou agronomiques. Selon la réglementation de l'union européenne, la définition de la biomasse est: « *la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture (comprenant les substances végétales et animales), de la sylviculture et de l'industrie connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et municipaux* » (Damien, 2013). Elle est essentiellement constituée de polymères complexes de carbone, hydrogène, oxygène, azote, de soufre en faible proportions et d'éléments inorganiques. La lignocellulose est la biomasse renouvelable la plus abondante, sa production annuelle a été estimée à 10^{10} MT dans le monde, ce qui permet une utilisation énergétique à grande échelle, en substitution de combustibles fossiles (Alvira et al., 2010).

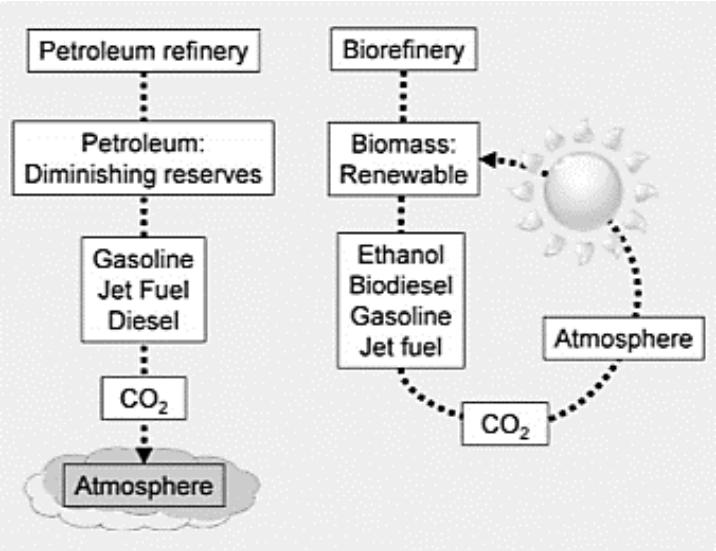


Figure 5 : Cycles de CO_2 pour les combustibles dérivés du pétrole et de la biomasse (Alonso et al., 2010)

3.2 Origine, composition et structure de la biomasse lignocellulosique

Les matériaux cellulosiques sont particulièrement intéressants en tant que matières premières pour la production de biocarburants en raison de leur faible coût, abondance et approvisionnement durable (Tian et al., 2018; Tye et al., 2016). Leur diversité et disponibilité en vue de leur conversion en éthanol à usage carburant devrait permettre à subvenir aux besoins énergétiques, couverts jusqu'à présent essentiellement par les produits dérivés du pétrole, tout en générant de nouveaux débouchés pour le monde agricole.

3.2.1 Origine de la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique appartient exclusivement à la classe végétale. C'est une espèce constituée d'un substrat complexe, composé de trois principales fractions : cellulose, hémicelluloses et lignine. On distingue deux grandes familles de ressources en biomasse lignocellulosique (Ballerini, 2011; Demirbaş, 2001; García et al., 2014) (Figure 6) :

- La famille des «co-produits » : fraction coproduite lors de l'exploitation d'une matière à plus haute valeur ajoutée,
- La famille des « cultures dédiées » : ressources produites spécifiquement pour une valorisation énergétique.

a) Les ressources co-produites

Ce type de ressources en biomasse lignocellulosique peut provenir des résidus de l'exploitation forestière, constitués de branches et rameaux laissés après le façonnage des arbres, des résidus de l'industrie de transformation de bois et des déchets secs agricoles, constituant la partie non comestible des plantes, laissée sur place après la récolte comme par exemple la paille de blé et d'orge, des tiges de maïs ou bagasse…

b) Les ressources des cultures dédiées

Ce type de ressources en biomasse lignocellulosique provient des espèces végétales dédiées exclusivement à des fins énergétiques. Ces plantes sont cultivées pour leur forte productivité, ces cultures peuvent être annuelles ou pérennes, ligneuses ou herbacées. Parmi les exemples les plus connus miscanthus, le *swichgrass,* saule, peuplier…En général, les caractéristiques de la culture énergétique idéale sont :

- Un rendement élevé (production maximale de matière sèche par hectare),
- Une production avec un faible apport en énergie et un coût bas,
- Des besoins faibles en nutriments.

D’autres caractéristiques sont prises en compte pour ce type de culture, liées au climat local et aux conditions du sol. Une consommation excessive en eau peut être une contrainte majeure dans de nombreuses régions du monde et donc la résistance de la culture à la sécheresse est un facteur important. D'autres facteurs sont également importants, comme la résistance aux ravageurs et aux maladies ainsi que les besoins en engrais.

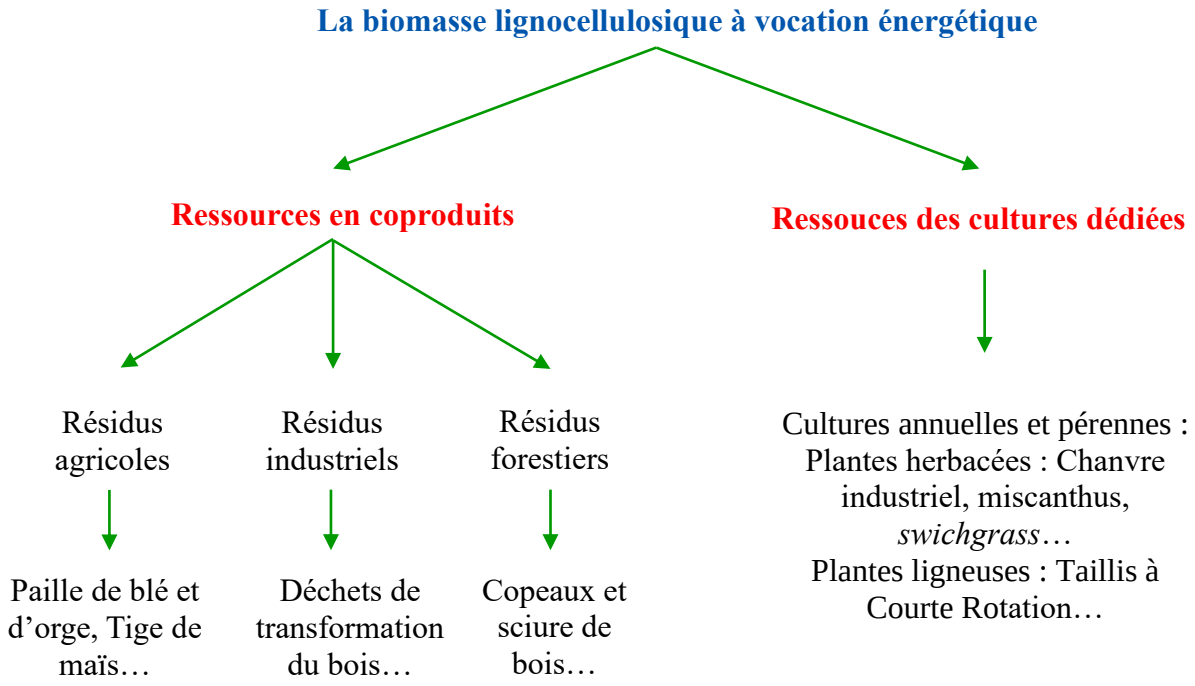


Figure 6 : Catégories majeures de la biomasse lignocellulosique

3.2.2 Composition et structure de la biomasse lignocellulosique

La paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique présente un potentiel important en termes de carbone renouvelable. Sa structure assez hétérogène est principalement constituée de cellulose, d’hémicelluloses et de lignine (Figure 7), leurs proportions peuvent être extrêmement variables en fonction de l’espèce végétale, de l’âge et des conditions de croissance (Hames, 2009). Des études ont révélé que chaque groupe de substrats possède un potentiel énergétique spécifique lié à la composition chimique (Klimiuk et al., 2010). La cellulose et les hémicelluloses (holocellulose), qui composent typiquement les deux tiers de la matière sèche de la paroi cellulaire, sont des polysaccharides qui peuvent être hydrolysés en sucres puis fermentés en bioéthanol. La paroi cellulaire peut aussi contenir des extractibles et jusqu'à 10% de substances minérales (cendres, silice) et son taux d'humidité varie de 10 à 80%. Les usages de la biomasse reposent sur la connaissance précise de la composition chimique de la matière première.

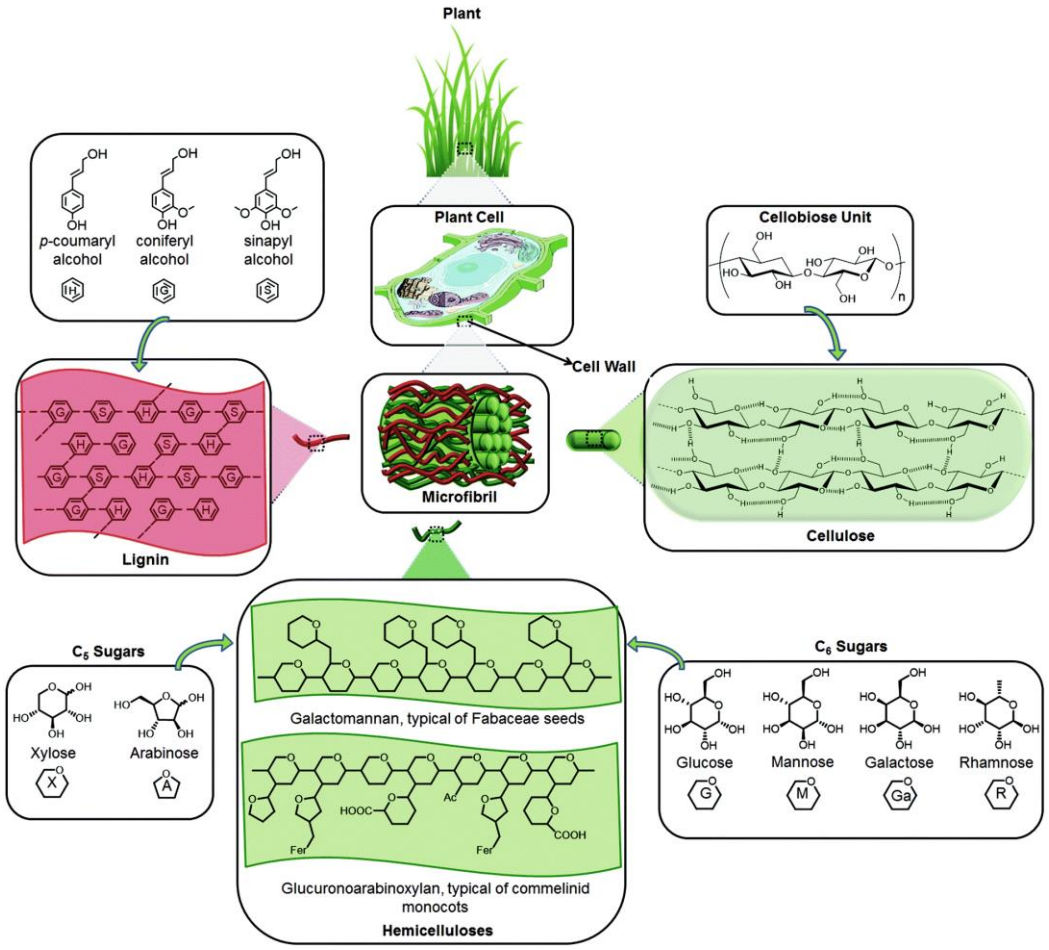


Figure 7 : Les principaux composants et structure de la biomasse lignocellulosique (Isikgor and Becer, 2015)

a) La cellulose

C'est le constituant principal de la biomasse lignocellulosique représentant selon les espèces jusqu'à 50% de la paroi végétale. Il s'agit d'un homopolymère linéaire d'unité de D-glucose liées entre elles par des liaisons osidiques de type β-(1,4). Il peut être représenté par la formule générique $(C_6H_{10}O_5)n$.

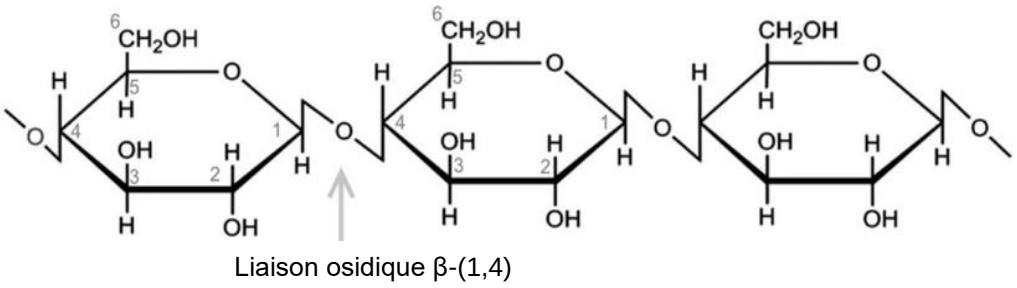


Figure 8 : Structure moléculaire de la cellulose

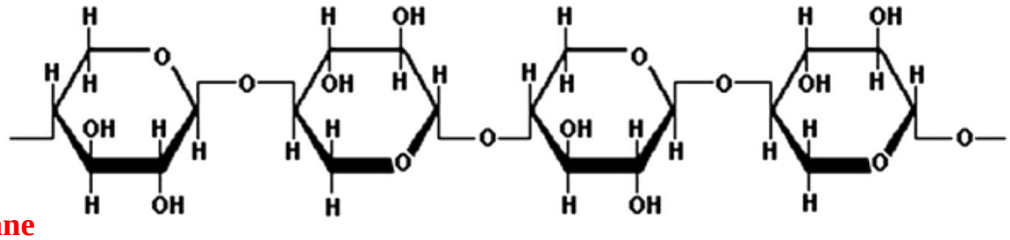
Des liaisons hydrogène intra et inter-molécules sont favorisées au sein des polymères de la cellulose (Figure 7), lui conférant une forte linéarité et cristallinité, ce qui rend ce constituant difficile à être attaqué chimiquement ou biologiquement. Elle est caractérisée par un degré de polymérisation qui se situe aux environs de 10 000 et un poids moléculaires élevé (~ 500000 Da). Elle se présente sous la forme de microfibrilles de 3 à 68 nm de diamètre, agglomérées en fibrilles de diamètre compris aux environs de 360 nm et de longueur supérieur à 5 µm (Agbor et al., 2011; Faik, 2013; Li et al., 2015). Des techniques d'analyses par diffraction X ont mis en évidence sa structures cristalline avec la présence de zones amorphes. Le D-glucose fermentescible peut être produit à partir de la cellulose sous l'action d'un acide ou d'enzymes rompant les liaisons bêta (1,4) -glycosidiques.

De façon générale, un traitement thermique conduirait à une augmentation sensible du taux de cristallinité global. Par rapport à la partie hautement microcristalline, il semblerait que les régions amorphes soient plus réactives, les molécules moins ordonnées étant préférentiellement dégradées (Auxenfans et al., 2017a; Zhuang et al., 2015). La cellulose est insoluble dans la plupart des solvants, y compris l'eau, et résistante à l'hydrolyse enzymatique qui a pour but la transformation de la cellulose en sucres monomères fermentescibles au cours de la fermentation éthanolique.

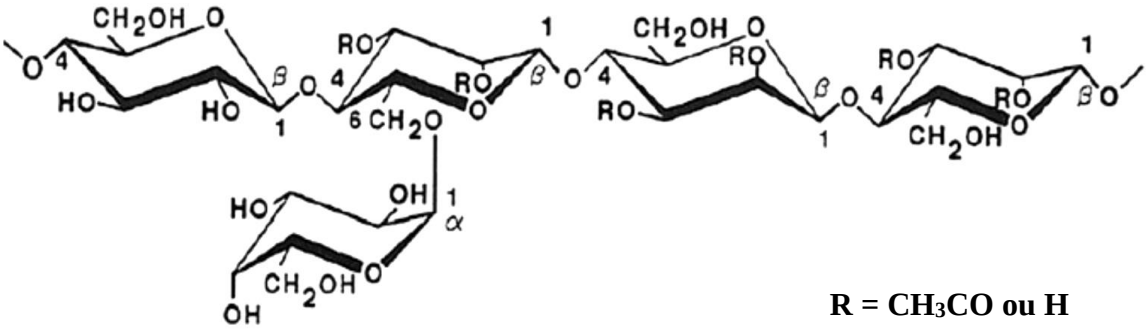
b) Les hémicelluloses

C'est le deuxième polymère principal de la paroi végétale. Ce sont des hétéropolysaccharides complexes, composés de sucres à cinq et six carbones et constitués en un squelette principal ramifié avec plusieurs substituants latéraux. Ils peuvent être représentés par la formule générique $(C_5H_8O_4)_n$. Ils sont constitués de pentoses (sucres en C_5 comme le xylose et l'arabinose), d'hexoses (sucres en C_6 comme le glucose, le galactose ou le mannose) et d'acides uroniques (sucres possédant une fonction acide à la place de la fonction alcool primaire) (Figure 7). Ils sont caractérisés par de faible degré de polymérisation (entre 150 et 200) (Agbor et al., 2011; Chen and Liu, 2015; Singh et al., 2014). La Figure 7 montre la disposition des polymères des hémicelluloses à la surface de chaque microfibrille de cellulose. Ainsi, les hémicelluloses représentent un lien entre la lignine et les fibres de cellulose et donne à l'ensemble du réseau lignocellulosique plus de rigidité.

Il existe des variations significatives dans la composition et la structure de l'hémicellulose entre différents types de biomasse. Dans le cas du bois dur (feuillus) et les plantes herbacées (graminées) le sucre du squelette principal est le xylose avec des chaines latérales d'arabinose et d'acide glucuronique, les sections non ramifiées sont souvent remplacées par des esters acétyliques. Dans le cas du bois tendre (résineux), le sucre du squelette principal est le mannose avec des chaines latérales de glucose et de galactose (Agbor et al., 2011; Dheeran and Reddy, 2017; Karimi et al., 2014; Zabed et al., 2016). En raison de leur structure amorphe et leur nature ramifiée, les hémicelluloses sont plus faciles à hydrolyser que la cellulose.

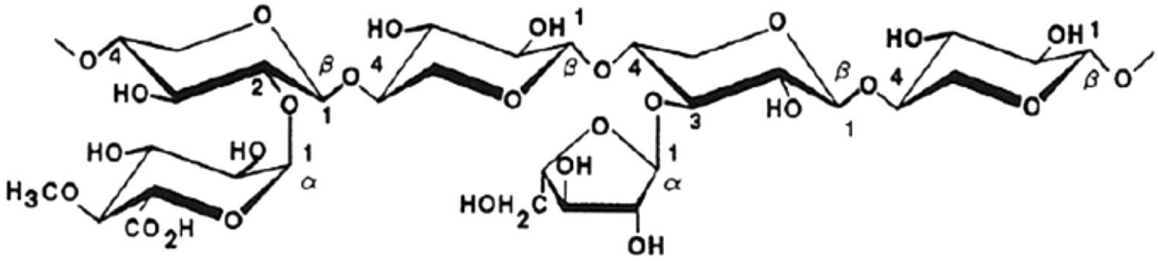


Xylane



R = CH_3CO ou H

Galacto-gluco-mannane



Arabino-glucurono-xylane

Figure 9: Structure des hémicelluloses

c) La lignine

Produite après croissance complète de la cellule, la lignine est le constituant essentiel de l'espace intercellulaire, son rôle est de consolider la structure pariétale pour lui conférer une certaine rigidité. Elle forme avec des hémicelluloses, une matrice amorphe dans laquelle les fibrilles de cellulose sont imprégnées et protégées contre la biodégradation (Figure 7). C'est une macromolécule fortement réticulée de haut poids moléculaire résultante de la condensation de trois alcEols aromatiques : l'alcool p-coumarylique, l'alcool confrérylique et l'alcool sinapylique (Figure 10). Des liaisons éther prédominent entre les unités de la lignine, contrairement aux fonctions acétals de la cellulose et des hémicelluloses. Des liaisons covalentes existent aussi entre la lignine et les polysaccharides qui améliorent fortement la force des liens entre la

cellulose, hémicellulose et la lignine (Agbor et al., 2011; Karimi et al., 2014; Xu et al., 2016). La lignine peut se présenter comme co-produit de la production de l'éthanol, elle peut être valorisée en chaleur et énergie aidant ainsi à l'amélioration de l'économie globale du procédé (Galbe and Zacchi, 2012).

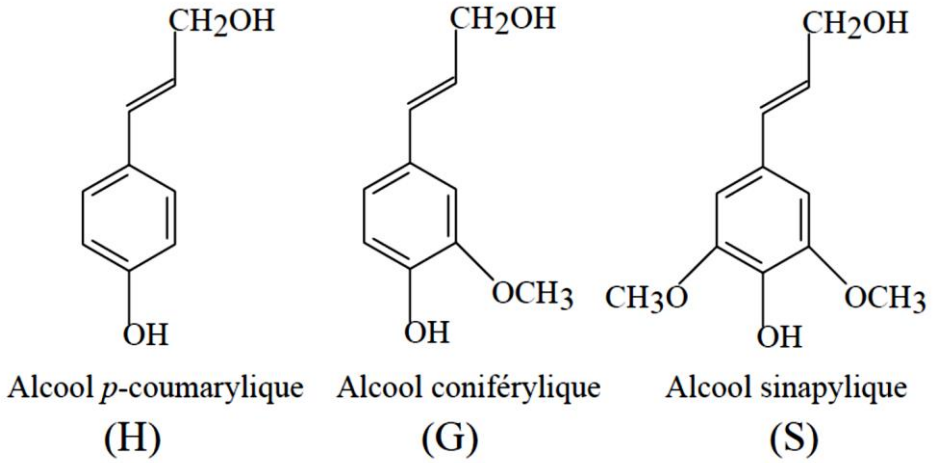


Figure 10 : Les trois unités du polymère de la lignine

Selon sa composition et sa structure, la biomasse lignocellulosique peut être de nature ligneuse. Dans ce cas les plantes sont généralement caractérisées par une croissance lente et sont composées de fibres étroitement liées, donnant une surface externe dure (exemple du bois). La biomasse peut aussi être de nature herbacée, et les plantes sont généralement pérennes, avec des fibres plus lâches, caractéristique d'une plus faible proportion de lignine (Xu et al., 2016).

Même si la cellulose reste le constituant majoritaire, la structure et la composition des matériaux lignocellulosiques dépendent des conditions de cultures et de l'espèce végétale considérée. Le Tableau 1 montre les teneurs des principaux constituants chimiques de certaines espèces lignocellulosiques. L'identification des espèces végétales destinées à la bioconversion en éthanol de deuxième génération se base sur les proportions en celluloses, hémicelluloses et lignine de l'espèce étudiée. L'efficience du procédé de bioconversion est améliorée par des teneurs élevées en cellulose et hémicellulose et par des teneurs basses en lignine. En effet, l'éthanol provient de la fermentation des sucres monomères issus de l'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose. Cette hydrolyse est affectée par la teneur en lignine car d'une part, elle imprègne le réseau cellulose-hémicelluloses, et d'autre part, les produits de solubilisation de la lignine ont un effet inhibiteur sur les micro-organismes responsables de la fermentation (Bajpai, 2016; Silva et al., 2017a).

Tableau 1 : Composition chimique de différents types de biomasse lignocellulosique

Type de biomasse lignocellulosique	Espèce	Cellulose	Hémicelluloses	Lignine	Références
Bois dur	Eucalyptus	38-46	17-18	19-29	(Alves et al., 2010; McIntosh et al., 2016; Vázquez et al., 2007)
	Peuplier	48-53	25-29	15-21	(Isikgor and Becer, 2015; Ragauskas et al., 2006)
	Bouleau	38-42	20-38	19-22	(Mutturi et al., 2014; Ragauskas et al., 2006)
	Saule	41	21	26	(Sassner et al., 2008)
Bois tendre	Sapin de douglas	43-44	11-19	27-28	(Isikgor and Becer, 2015; Mutturi et al., 2014)
	Pin	42-50	22-27	20-29	(Isikgor and Becer, 2015)
	Epicéa	42-49	15-20	27-30	(Teghammar et al., 2012; Zhao et al., 2008)
Les résidus agricoles	Paille d'orge	34-43	22-33	6.3-16	(García-Aparicio et al., 2006; Monlau et al., 2013; Singh Nee Nigam and Pandey, 2009)
	Paille de blé	33-40	20-30	12-20	(Isikgor and Becer, 2015; Prasad et al., 2007)
	Paille de riz	28-35	20-26	17-19	(Isikgor and Becer, 2015; Teghammar et al., 2012)
	Paille de sorgho	32-35	24-27	15-21	(Cai et al., 2017; Isikgor and Becer, 2015)
	Bagasse de canne à sucre	25-45	23-32	15-25	(Isikgor and Becer, 2015; Rabelo et al., 2011; Rezende et al., 2011)
	Rafles de maïs	34-41	30-36	6-16	(Isikgor and Becer, 2015; Singh Nee Nigam and Pandey, 2009; Wang et al., 2011)
	Tiges de maïs	35-39	17-35	7-19	(Isikgor and Becer, 2015; Öhgren et al., 2005)
	Rafles de coton	36-58	14-21	20-26	(Gaur et al., 2016; Singh Nee Nigam and Pandey, 2009)
Cultures dédiées	*Switchgrass*	35-40	25-30	15-21	(Isikgor and Becer, 2015; Li et al., 2010)
	Miscanthus	38-48	18-30	12-25	(Brosse et al., 2009; Hodgson et al., 2011)
	Bambou	26-50	15-26	21-31	(Alves et al., 2010; Sánchez, 2009)

3.2.3 Liaisons intra et inter-polymères dans la biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique de nature complexe et récalcitrante, est constituée de quatre principales liaisons inter et intra-polymères: liaisons éther, ester, carbone-carbone, hydrogène (Figure 11)(Alvira et al., 2013; Faik, 2013).

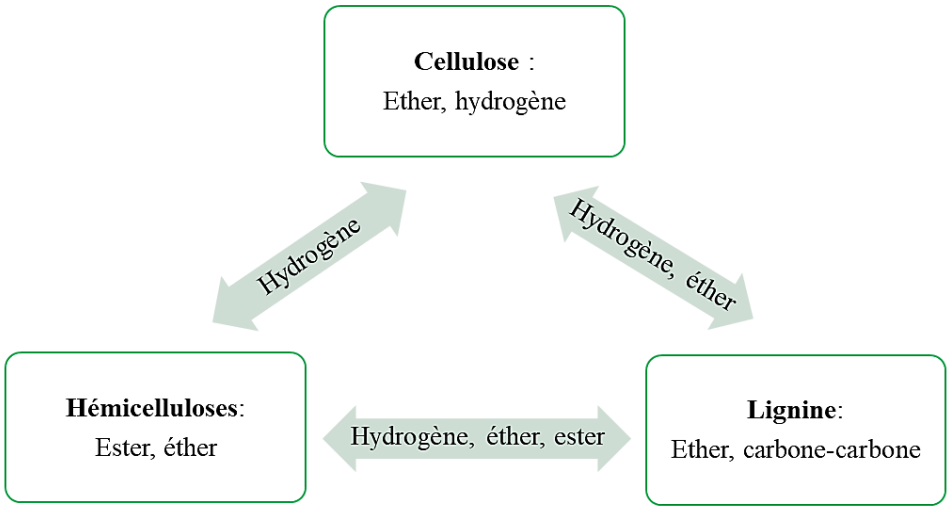


Figure 11 : Liaisons entre les monomères et polymères de la biomasse lignocellulosique

Le polymère de cellulose est constitué de deux liaisons principales ; liaison glycosidique et liaison hydrogène. La liaison glycosidique est celle qui forme la chaîne polymère initiale. Plus précisément, c'est une liaison β1-4 D-glycosidique qui relie les unités de glucose ensemble. La liaison glycosidique peut également être considérée comme une liaison éther, puisque c'est une connexion entre deux atomes de carbone avec une interférence de l'oxygène élémentaire. La liaison hydrogène est considérée comme responsable de la structure cristalline de la cellulose. La disposition du polymère en chaines parallèles, longues et droites avec la présence uniforme de groupes hydroxyles de part et d'autre du monomère de glucose permettent la formation de la liaison hydrogène entre deux groupes hydroxyles de chaînes de polymères différentes. Les principaux types de liaisons qui relient les molécules au sein de la lignine sont des liaisons éther et des liaisons carbone-carbone. La fraction totale des liaisons de type éther dans la lignine représente environ 70% des liaisons totales entre les unités monomères. Les liaisons carbone-carbone forment les 30% restants des liens totaux entre les unités (Alvira et al., 2013; Faik, 2013).

A l'échelle expérimentale, la décomposition du substrat lignocellulosique permet l'identification et la séparation des différents composants. Cependant, cette technique engendre des modifications de sa structure d'origine ainsi ne permettant pas de fournir des conclusions claires sur les différentes liaisons. Les travaux de Faulon et al. (1994) ont proposé un modèle tridimensionnel utilisant la mécanique moléculaire et dynamique afin de comprendre l'organisation de ces polymères. Selon ce modèle, il a été identifié que les liaisons hydrogène relient non seulement entre cellulose et hémicelluloses, mais aussi la lignine à la cellulose et à

l'hémicellulose. En outre, l'existence de liaisons covalentes entre la lignine et les polysaccharides a été identifiée.

3.3 Propriétés de la biomasse lignocellulosique influençant le procédé de bioconversion

Il existe plusieurs facteurs affectant le procédé de bioconversion en éthanol de la biomasse lignocellulosique. Comme il est décrit dans le paragraphe 4, un procédé de bioconversion comporte 4 étapes : prétraitement, hydrolyse enzymatique, fermentation et séparation. La nature récalcitrante et la composition hétérogène de la biomasse lignocellulosique constituent des barrières physico-chimiques devant son hydrolyse enzymatique, étape primordiale pour la digestion de la cellulose en monomères de glucose fermentescibles en éthanol. Un certain nombre de facteurs affectant l'étape d'hydrolyse enzymatique ont été suggérés par différents travaux.
Parmi les barrières physico-chimiques, on peut citer ; la lignine, les groupements acétyles des hémicelluloses, l'indice de cristallinité de la cellulose, la surface spécifique, la taille des particules, la taille des pores, et le degré de polymérisation (Chen et Liu, 2015; Karimi et al., 2014). D'après Kumar et al., (2016), la lignine est considérée comme étant le polymère qui affecte le plus l'hydrolyse enzymatique.

3.3.1 Propriétés chimiques

a) Lignine

La lignine constitue le premier obstacle devant l'hydrolyse enzymatique, sa présence et celle de ses dérivés inhibent l'action des enzymes cellulases. Les principales liaisons chimiques existantes dans la lignine sont les liaisons C-O-C et C-C formant une molécule fortement réticulée. Un substrat à faible teneur en lignine permet alors une saccharification enzymatique plus efficace avec moins d'apport en enzymes. L'élimination de la lignine en amont du procédé de bioconversion rend la cellulose plus accessible aux enzymes cellulases et améliore significativement l'hydrolyse enzymatique ainsi que le rendement en monomères de sucres. En plus d'être une barrière physique, les effets néfastes de la lignine comprennent aussi la formation de liaisons non productives avec les enzymes conduisant à une baisse de la conversion cellulosique, mais aussi l'éventuelle toxicité de ses dérivés vis-à-vis des micro-organismes pendant la phase de fermentation (Rabemanolontsoa et Saka, 2016; Singh et al., 2014).

b) Hémicelluloses

Les hémicelluloses se lient à la fois aux faisceaux cellulosiques et à la lignine créant un réseau complexe fournissant la résistance structurelle à la dégradation microbienne. Les travaux de Fan et al., (2014a) ont suggéré que l'élimination de l'hémicellulose peut entraîner une augmentation de la taille des pores de la biomasse et donc augmenter l'accessibilité des enzymes à la fraction cellulosique. Il convient de souligner que l'hydrolyse des hémicelluloses fourni un hydrolysat riche en pentoses pouvant être recyclé en fermentation en vue d'augmenter le rendement total du processus de bioconversion.

3.3.2 Propriétés physiques

a) Cristallinité

La cristallinité est une propriété physique caractérisant la structure de la cellulose, et peut être analysée par diffraction aux rayons X. Les liaisons hydrogène inter et intra-molécules de cellulose laissent former des microfibrilles très ordonnées augmentant ainsi sa cristallinité. Cette dernière est autant résistante aux réactions chimiques qu'à la dégradation biologique. Ainsi, le degré de cristallinité de la cellulose est un facteur important pour déterminer sa susceptibilité à diverses réactions chimiques et biologiques. Il a été démontré que les zones amorphes, parties moins ordonnées, de la cellulose peuvent facilement être hydrolysées par des enzymes, tandis que les zones cristallines, parties hautement ordonnées, sont plus résistantes à l'hydrolyse (Chang et Holtzapple, 2000). L'indice de cristallinité (CrI) est typiquement calculé selon la formule suivante :

$$CrI = \frac{I_{002} - I_{18}}{I_{002}} * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Où, CrI est l'indice de cristallinité, I_{002} est l'intensité maximale du pic à un angle de diffraction de $2\theta = 22^{\circ}$ et I_{18} est l'intensité de la diffraction de la cellulose amorphe à $2\theta = 18^{\circ}$ (Segal et al., 1959).

b) Surface spécifique

La surface spécifique affecte l'accessibilité des enzymes au sein de la biomasse lignocellulosique et influence en combinaison avec d'autres facteurs le taux d'hydrolyse. Kumar et Wyman, (2009) ont montré que la vitesse d'hydrolyse est associée au phénomène d'adsorption des enzymes sur la cellulose. Ce phénomène est conditionné par l'accessibilité des enzymes aux sites actifs cellulosiques et donc par la surface disponible. Fan et al. (2014) ont montré l'amélioration de la conversion cellulosique en présence d'une augmentation de la surface spécifique et du volume des pores, suite à un prétraitement par explosion à la vapeur combiné à l'acide sulfurique sur des tiges de maïs. Les travaux de Maache-Rezzoug et al. (2015) ont également montré que l'accessibilité des enzymes aux polymères de cellulose de la paille de blé, prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique, a été améliorée ; augmentation significative des valeurs de la vitesse et du rendement de bioconversion.

Il est certain que la surface spécifique de la biomasse prétraitée affecte l'hydrolyse enzymatique et est en corrélation avec d'autres facteurs tels que l'élimination de la lignine et l'hémicellulose (Chen et Liu, 2015). Par ailleurs, Karimi et Taherzadeh (2016) ont reporté que la surface accessible augmente progressivement pendant l'hydrolyse enzymatique, à la suite de l'élimination partielle de la cellulose. Cependant, la vitesse de l'hydrolyse reste généralement beaucoup plus rapide au début qu'aux derniers stades de l'hydrolyse enzymatique, malgré une disponibilité surfacique plus élevée en fin d'hydrolyse. Cela indique que la surface spécifique n'est pas le principal facteur déterminant de l'hydrolyse. La cristallinité de la cellulose, la désactivation des enzymes et l'augmentation de la concentration en lignine sont liés à la

diminution de la vitesse de l'hydrolyse enzymatique. Par conséquent, la surface accessible doit être considérée en combinaison aux autres facteurs affectant la conversion cellulosique.

c) Degré de polymérisation (DP)

Le degré de polymérisation (DP) du substrat préalablement prétraité influence l'hydrolyse enzymatique. En effet, le prétraitement réduit le degré de polymérisation de la cellulose (Kumar et al., 2009). Le poids moléculaire moyen de la cellulose (M_C) peut être mesuré par la détermination du nombre des groupes réducteurs. Pour la cellulose, la relation entre le poids moléculaire et le DP peut théoriquement être décrite par la relation ci-dessous :

$$DP = \frac{M_c - 18}{M_G - 18} \quad \text{Eq. 2}$$

Où M_C = poids moléculaire de la cellulose et M_G = poids moléculaire de l'unité de glucose anhydre (180 g).

3.4 Matières lignocellulosiques candidates pour cette étude

Les deux espèces lignocellulosiques qui ont fait l'objet de l'étude de cette thèse sont la chènevotte, coproduit de l'exploitation du chanvre industriel et l'alfa, plante endémique des régions méditerranéennes.

3.4.1 Le chanvre industriel « *Cannabis sativa* L. »

a) Généralités

Le chanvre est une des plus anciennes plantes originaire d'Asie centrale, il est cultivé depuis plus de 8000 ans pour son intérêt dans les industries du textile et du papier mais aussi pour des usages médicamenteux (Karus, 2002). L'utilisation de sa fibre textile pour la fabrication des cordages et des toiles était une activité importante en France. Au XIX^{éme} siècle, le chanvre a perdu son importance en tant que matière première au profit du coton et des fibres synthétiques. Cependant, il y a eu récemment un regain d'intérêt pour le chanvre industriel en raison de ses différentes vertus (Bouloc, 2006). La France est le premier producteur de chanvre en Europe avec une superficie de culture atteignant en 2014, 10 500 ha (plus de 50% des surfaces européennes) (EIHA, 2015). Le chanvre est produit majoritairement dans les régions d'Anjou, de Bretagne, d'Auvergne, de Poitou-Charentes et de Berry (Figure 12) (Bouloc, 2006). Les variétés cultivées aujourd'hui ont des teneurs extrêmement faibles en composé à caractère psychotrope (tétrahydrocannabinol (THC)). En France, le taux de THC doit être inférieur à 0,2% conformément à la

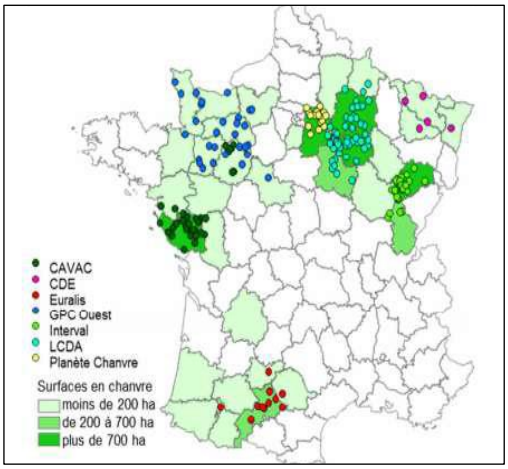


Figure 12 : Les surfaces cultivées en chanvre. (France, 2013)

règlementation européenne. Au Maroc, la culture du chanvre remonte au VII^{ème} siècle, où il était produit de façon traditionnelle. Depuis 1956, le Maroc a interdit la culture du chanvre pour son usage sous forme de psychotrope. Actuellement, le Maroc s'ouvre sur des perspectives de développement socio-économique pour l'utilisation polyvalente de la plante du chanvre industriel. La figure ci-dessous montre les différents composants de la plante ainsi que leurs utilisations.

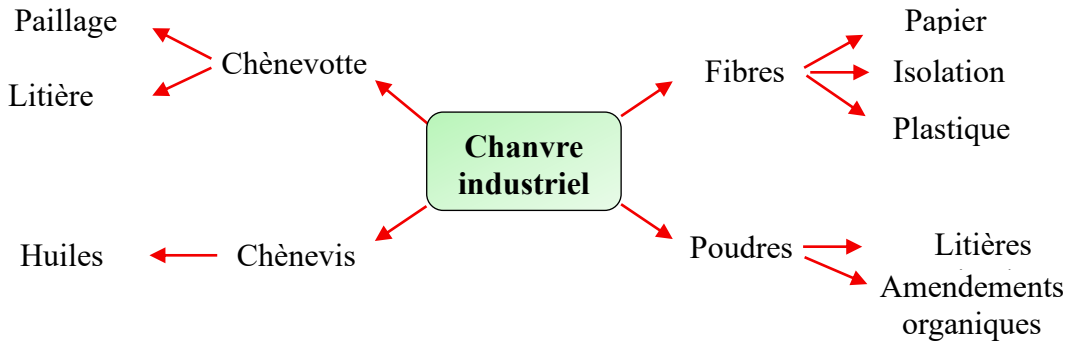


Figure 13 : Les différents composants et utilisations du chanvre industriel

Le chanvre est une plante herbacée dicotylédone appartenant à la famille des *Cannabinacées*. Il est communément admis que le chanvre est associé à une espèce, *Cannabinus sativa*, qui se subdivise en trois groupes ou sous espèces : *Cannabis sativa* : variété industrielle ; *Cannabinus ruderalis* : forme dite sauvage ; *Cannabinus indica* : la forme psychotrope. L'espèce « *Cannabis sativa* » fait l'objet des travaux de cette thèse. Cette plante se caractérise par une croissance rapide et un cycle cultural court, car elle peut être semée en mai et récoltée en septembre (Bouloc, 2006). La plante se caractérise également par ses racines profondes et très ramifiées, qui lui permettent d'augmenter sa capacité hydrique et d'améliorer la structure du sol tout en laissant la terre propre grâce à sa compétitivité face aux mauvaises herbes (Bouloc, 2006). Le chanvre présente de nombreux autres avantages qui font de lui une matière intéressante pour le secteur des bioénergies ; une résistance microbienne et à la sécheresse, un rendement élevé, pas de besoins en herbicides ou fertilisants, une croissance dans les sols contaminés et une utilisation pour les cultures de rotation (Rehman et al., 2013).

b) Morphologie et anatomie du chanvre industriel

i. La tige

Le chanvre est une plante annuelle et monopodiale, c'est-à-dire qu'elle est définie par une croissance de la tige en hauteur. Les tiges peuvent atteindre 2 à 4 m de hauteur avec un diamètre moyen de 1 à 3 cm, la croissance est dirigée de l'apex vers la base. La tige de chanvre présente une surface cannelée et ramifiée où s'insèrent des feuilles épineuses selon une disposition opposée tous les 10 à 30 cm. Des entre-nœuds de longueurs variables sont formés suite à une croissance différentielle (Bouloc, 2006). En fonction des conditions de culture, la morphologie peut varier en favorisant la mise en place de ramification avec une forte croissance en épaisseur,

ou bien une croissance de branches limitées avec une tige plus fine et plus haute (Amaducci et al., 2008).

Une coupe transversale de la tige de chanvre fait apparaitre plusieurs tissus végétaux (Figure 14). On distingue d'après la Figure 14, l'épiderme et le cortex, riches en fibres longues primaires et secondaires disposées en faisceaux, qui forment deux anneaux autour du bois central et participent au maintien de la tige. Le xylème ou bois central est appelé la chènevotte, il est constitué de cellules lignifiées, de fibres ligneuses, de vaisseaux et de rayons de cellules (Vignon et al., 1995). Le xylème est composé d'éléments conducteurs (vaisseaux) assurant la circulation de la sève. La coupe transversale du xylème sous examen optique laisse apparaitre sa structure alvéolaire. D'où son rôle de responsable de la circulation de la sève brute dans la plante. La Figure 14 montre également l'existence d'un creux au centre de la tige. Un processus de séparation mécanique (défibrage) est généralement réalisé afin de récupérer les deux fractions chènevotte et fibres.

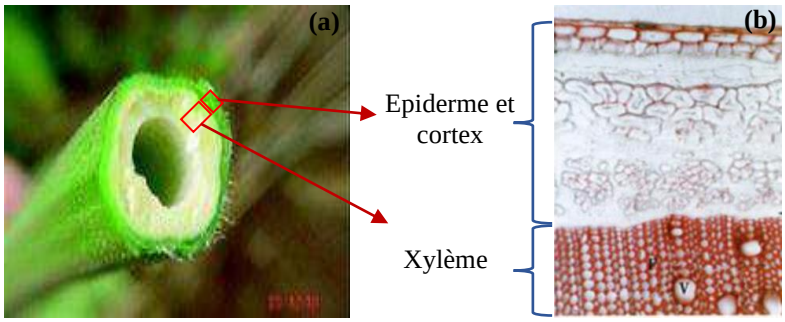


Figure 14 : Coupe transversale d'une tige de chanvre examinée par analyse optique (Bouloc, 2006) (V: vaisseaux ; F : fibres xylémiennes)

ii. La racine

Le système racinaire de la plante se présente sous une forme pivotante, peu développé par rapport à sa biomasse aérienne. Les racines centrales peuvent atteindre des profondeurs d'environ 2 m mais les racines secondaires, considérées comme la partie racinaire la plus importante en masse, s'enfoncent de 10 à 60 cm (Bouloc, 2006).

iii. Les fleurs

La plante est caractérisée par de longues et fines fleurs. Leur formation débute durant la dernière phase de formation de la plante. Les inflorescences se distinguent en mâle et femelle. Les inflorescences mâles sont organisées en grappe généralement au sommet de la tige, formées de panicules plus ou moins lâches sans feuilles. Les fleurs femelles dépourvues de pétales, se composent de deux longs stigmates blancs, jaunes ou roses qui apparaissent par paire, à l'aisselle de petites feuilles (Figure 15) (Bouloc, 2006).

iv. La graine

Les graines de chanvre sont de forme ovoïde ou sphérique et elles mesurent de 3 à 5 mm de longueur. Chaque graine renferme deux cotylédons riches en substances de réserves (protéines et huile) (Bouloc, 2006).

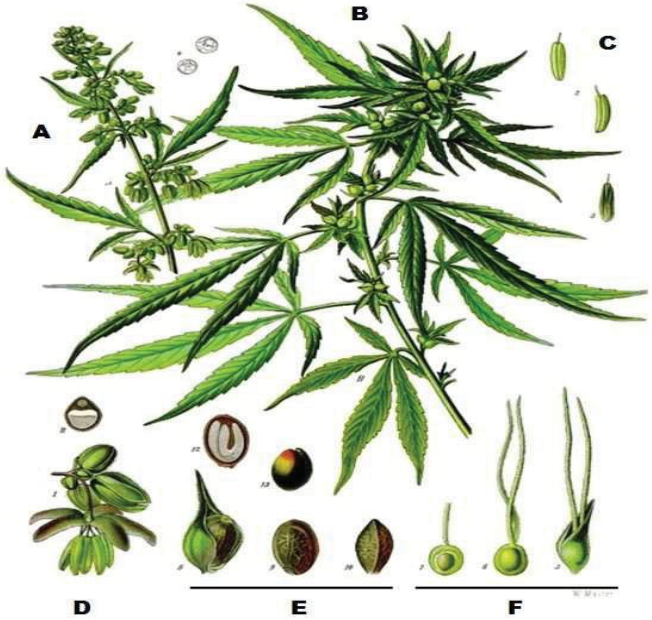


Figure 15 : Dessin anatomique du chanvre planche réalisée par (Köhler, 1898)

La figure 15 présente en A : les parties apicales mâles, en B : les parties apicales femelles, en C : Les anthères sont représentées individuellement et en D : l'inflorescence mâle, rassemblant les anthères en grappe. E. Les graines de chanvre, F : Les différents stades de maturité de la fleur femelle (Köhler, 1898).

c) La chènevotte : co-produit de l'exploitation du chanvre industriel

La chènevotte, en anglais « woody hemp», constitue le cœur central de la tige de chanvre. Elle se présente sous forme de copeaux de bois récupérés après l'opération de défibrage mécanique de la tige. Sa proportion est d'environ 65% de la masse sèche de la tige (Rehman et al., 2013). La chènevotte se caractérise par une grande affinité pour l'eau, cette capacité d'absorption et de rétention d'eau lui permettent de contenir jusqu'à quatre fois son poids en eau, d'où son utilisation comme litière. Elle trouve aussi des applications dans le bâtiment comme matériaux composites grâce à ses propriétés thermomécaniques.

Différents travaux ont été menés afin de mettre en évidence le potentiel de la chènevotte pour la production de bioéthanol (Barta et al., 2010; Gandolfi et al., 2013a; Moxley et al., 2008; Vignon et al., 1995). La chènevotte est composée de cellulose (~44%), des hémicelluloses (18-30%) et de lignine (21-28). Gandolfi et al. (2013) ont effectué une analyse complète de la composition chimique de la chènevotte. La quantification des fractions cellulose et hémicellulose a été effectuée par hydrolyse acide (72% H_2SO_4), permettant leur décomposition en sucres monomères. L'étude a suggéré que la fraction en holocellulose est comparable à celle du bois dur. De plus, la fraction hémicellulosique est composée principalement de glucuronoxylane et de glucomannane (polymères hémicellulosiques caractéristiques du bois dur) suite à une forte présence du xylose et de mannose (Gandolfi et al., 2013a). En conclusion, la chènevotte est classifiée comme faisant partie de la famille du bois dur. Sa composition, ses

propriétés, son faible coût et sa disponibilité font d'elle une source intéressante de cellulose pour la production de sucres fermentescibles.

3.4.2 L'alfa « *Stipa tenacissima* L. »

a) Généralités

L'alfa, en anglais « *esparto grass* » et de son nom scientifique *Stipa tenacissima* L., est une graminée pérenne de la famille des *poaceae*. C'est une plante endémique de la méditerranée occidentale qui pousse sur les terres semi-arides de l'Afrique du Nord et du sud de l'Espagne (Belkhir et al., 2012; Khelifa et al., 2016). Elle couvre une grande superficie, estimée à environ 3.186.000 ha au Maroc, 4 000 000 ha en Algérie, 400 000 ha en Tunisie et 350 000 ha en Libye. Au Maroc, l'alfa recouvre les zones désertiques des hauts plateaux de l'oriental, notamment dans les provinces de Figuig, Jerada, Taza et Boulemane. En France, elle est présente uniquement dans le département du Var. L'alfa pousse spontanément en touffes formant de vastes nappes contribuant à limiter la désertification du sol. La limite de l'expansion de l'alfa est déterminée par la sécheresse qui prévaut en bordure du Sahara, mais aussi par l'humidité croissante d'un climat humide. Les nappes alfatières sont connues par leur topographie particulière et leur difficulté d'accès. La croissance de la plante nécessite très peu d'eau ce qui fait d'elle une culture durable. L'alfa joue également un rôle important dans le développement social, économique, culturel et industriel. Sa récolte se fait de façon manuelle, généralement en juillet-aout et sa transformation pour différentes applications offre de l'emploi aux habitants. Les applications de l'Alfa sont multiples et diversifiées, et peuvent être classées en plusieurs catégories (Figure 16).

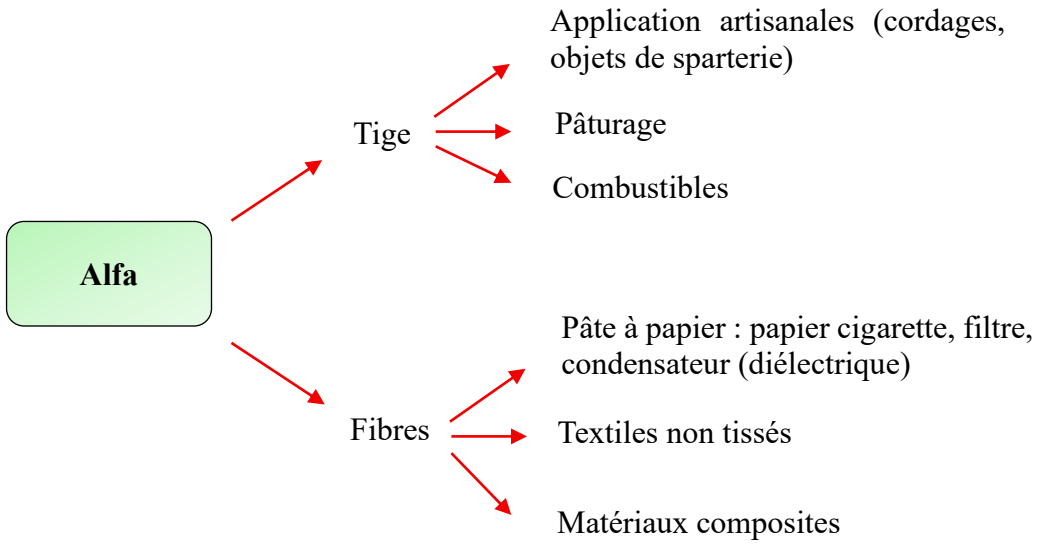


Figure 16 : Différentes applications de l'alfa

b) Morphologie et composition de l'alfa

L'alfa se présente en touffes d'environ 1 à 1,2 m de hauteur, de forme circulaire et homogène lorsqu'ils sont jeunes (Figure 17-a) et deviennent vides avec le vieillissement. La plante est répartie en deux parties ; une partie souterraine et une autre aérienne, le rhizome se situe entre les deux parties. La partie souterraine correspond au système racinaire, très développé et ramifié permettant la fixation et la protection du sol, les racines d'environ 2 mm de diamètre s'enfoncent sur des profondeurs de 30 à 50 cm (Dallel, 2012). La partie aérienne est composée de plusieurs tiges et feuilles. Les feuilles sont cylindriques, très tenaces, lisses, brillantes, fines qui présentent de nombreux poils, raison de leur porosité importante. Elles mûrissent entre le quatrième et le onzième mois après bourgeonnement, selon l'endroit et les conditions climatiques (Belkhir et al., 2012). Elles peuvent atteindre 1m de hauteur. Les tiges sont emboitées, ramifiées et partageant la même racine. La surface des feuilles et des tiges est cireuse permettant à la plante, d'une part, de capter les particules de sable et contenir la désertification, et d'autre part de limiter l'évaporation de son eau et donc de résister à des températures élevées. Sa partie supérieure est brune et laisse apparaître des traces desséchées.

Des travaux ont détaillé la composition chimique des fibres d'alfa provenant d'Algérie et de Tunisie pour lesquelles les proportions en holocellulose et lignine sont de 69,8 et 17,7% pour l'alfa algérienne (Bouiri et Amrani, 2010), et 68,2 et 22,3% pour l'alfa tunisienne (Marrakchi et al., 2011). L'intérêt de l'Alfa en tant que source potentielle de production de bioéthanol réside dans son adaptation à un climat semi-aride. En effet, dans des régions à faibles ressources en eau, comme le Maroc, le développement de cultures énergétiques irriguées pourrait exacerber le problème de la compétitivité avec les cultures alimentaires en termes d'utilisation d'eau. Des cultures énergétiques résistantes à la sécheresse devraient être le choix le plus favorable en termes d'adaptation et de durabilité environnementale.

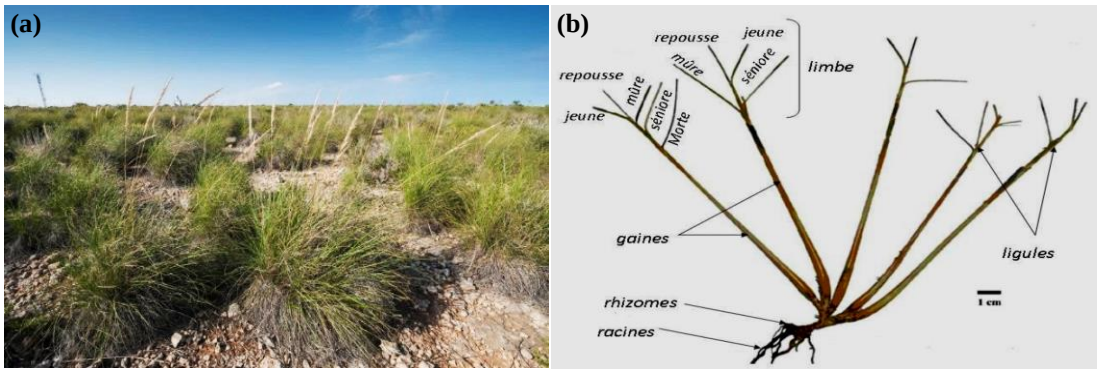


Figure 17 : Morphologie de l'alfa, (a) : à l'état brute sous forme de touffe, (b) : illustration des différents composants de l'alfa

En matière de développement durable, l'alfa est une ressource abondante et renouvelable dans les zones arides et rurales. Son exploitation peut contribuer à créer ou développer une activité économique locale sans impact environnemental significatif, ainsi que la lutte contre le dépeuplement rural.

4. PROCEDE DE BIOCONVERSION DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE PAR VOIE BIOCHIMIQUE

4.1 Généralités sur le procédé de bioconversion

La voie biochimique figure parmi les principales voies de production de biocarburants à partir de la biomasse lignocellulosique (Ballerini, 2011; Rastogi et Shrivastava, 2017). La problématique majeure est liée à l'inaccessibilité à la cellulose, cette dernière se trouve dans une structure complexe et récalcitrante, contenant les deux autres polymères : les hémicelluloses et la lignine, formant un réseau autour d'elle. Le procédé de bioconversion par voie biochimique consiste à soumettre la matière lignocellulosique à des traitements physiques et/ou chimiques et biologiques afin d'accéder aux polymères cellulosiques pour les transformer en monomères de glucose fermentescibles en éthanol. Cette voie de bioconversion offre des avantages majeurs par rapport à la voie chimique; rendement saccharidique élevé, formation minimale de sous-produits, faible demande en énergie (Menon et Rao, 2012). Cependant, l'hydrolyse enzymatique du substrat lignocellulosique rencontre des limitations liées à la présence de la lignine, aux structures récalcitrantes des hémicelluloses et de la cellulose cristalline, à la porosité, etc…D'où, l'intérêt d'une étape de prétraitement préalable en vue de briser la structure cristalline des lignocelluloses et d'éliminer la lignine et/ou les hémicelluloses en exposant les molécules de cellulose à une conversion enzymatique la plus efficace. Ainsi, on distingue globalement deux schémas de procédés de production d'éthanol de deuxième génération (Balat, 2011; Kumar & Sharma, 2017):

- Le procédé SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) :

Le procédé de bioconversion de type SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) consiste à la réalisation des opérations d'extraction des sucres et de la fermentation de façon successive et séparée (Chen et Fu, 2016; Kumar et Sharma, 2017; Yang et al., 2013). Le procédé SHF est composé de quatre étapes : Le prétraitement qui a pour objectif de rendre la fraction polysaccharidique accessible aux enzymes. L'hydrolyse enzymatique qui convertit la cellulose en glucose grâce à l'action des enzymes de type « cellulases » sécrétées par la souche fongique « *Trichoderma reesei* ». La fermentation des sucres obtenus en éthanol qui peut être éventuellement récupéré par distillation. La Figure 18, ci-dessous récapitule le schéma de base d'un procédé SHF.

- Le procédé SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)

Le procédé de bioconversion de type SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) consiste à effectuer l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique en une seule étape (Chen et Fu, 2016; Kumar et Sharma, 2017; Yang et al., 2013). Ce qui présente un avantage en termes de diminution du coût des investissements (moins de réacteurs) et une diminution des phénomènes d'inhibition. Cependant, l'inconvénient majeur est la diminution de la température de réaction, à cause de la présence des microorganismes de fermentation, dont la plage de température optimale est comprise entre 30 et 35 °C, alors que l'étape d'hydrolyse enzymatique

nécessite une température de 50 °C, température optimale pour l'activité catalytique des enzymes.

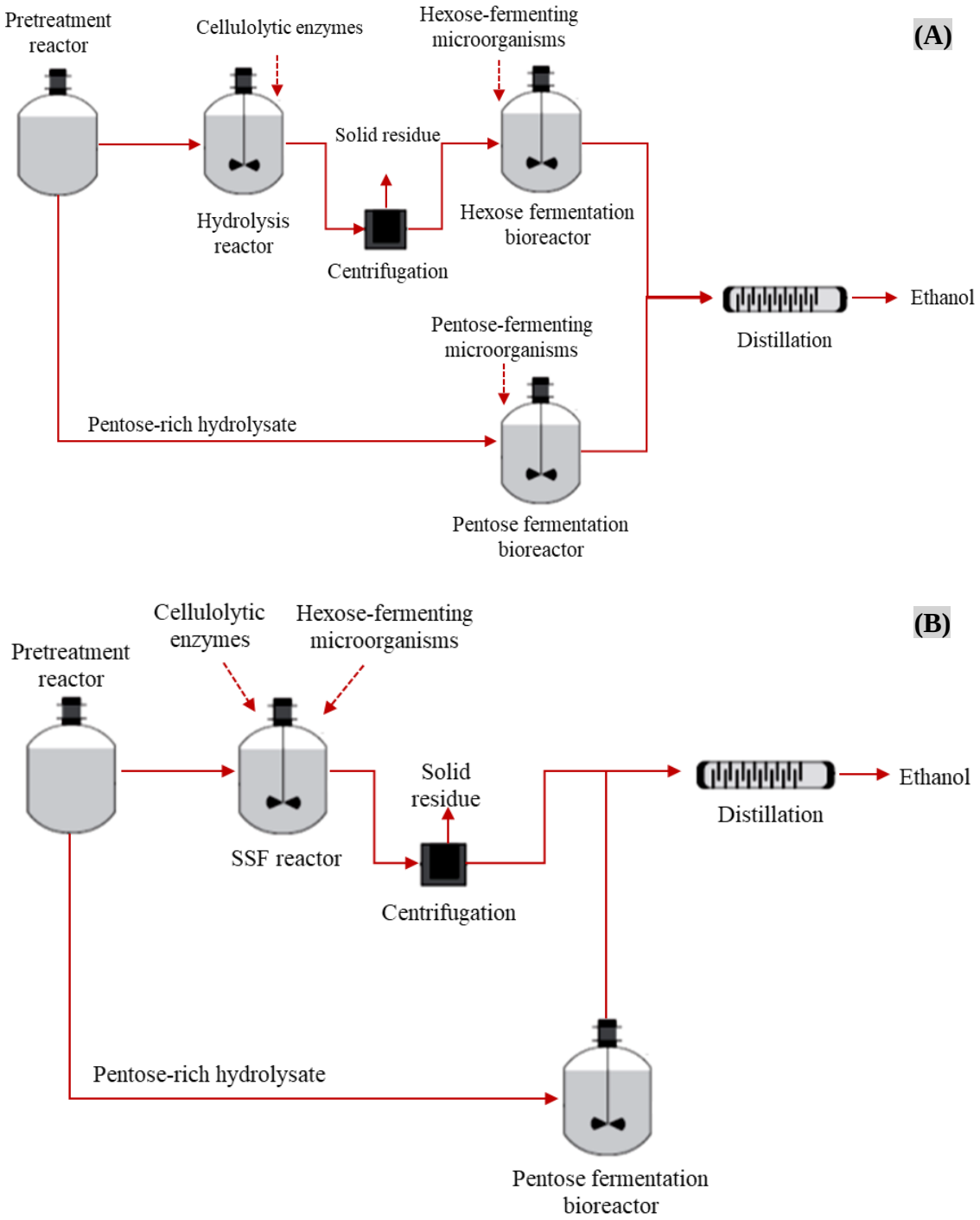


Figure 18 : Schéma des procédés SHF (a) et SSF (b) (Yang et al., 2013)

4.2 Procédés de prétraitements conventionnels

Le prétraitement est une étape cruciale à la bioconversion de la biomasse lignocellulosique, dont l'objectif principal est de rendre la fraction cellulosique accessible à l'action des enzymes cellulases. Les prétraitements permettent ainsi de déstructurer la matrice lignocellulosique en éliminant la lignine et/ou les hémicelluloses, en réduisant la structure cristalline de la cellulose

et le degré de polymérisation, et en augmentant la surface spécifique (Agbor et al., 2011; Balat, 2011; Galbe & Zacchi, 2012; Karimi et al., 2014; Mosier et al., 2005)

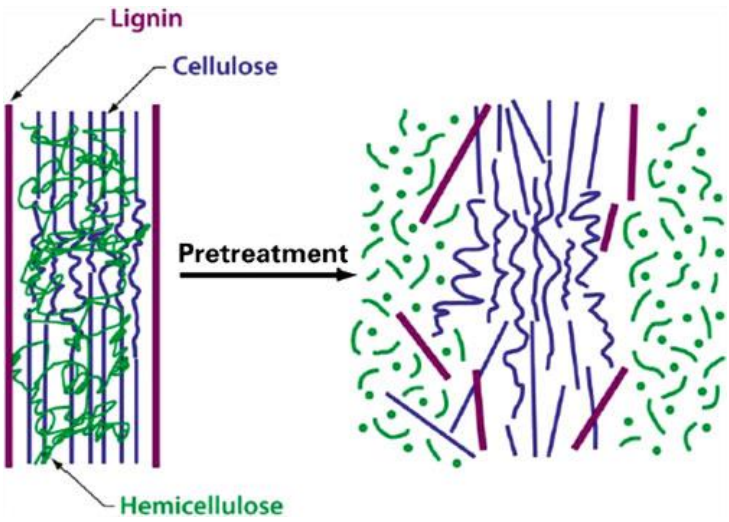


Figure 19 : Effet de prétraitement sur la biomasse lignocellulosique (Mosier et al., 2005)

Il existe un certain nombre de caractéristiques clés pour qu'un prétraitement de la biomasse lignocellulosique soit considéré comme étant efficace (Galbe & Zacchi, 2012; Karimi et al., 2014) :

- Rendement élevé de la digestibilité de la cellulose après l'hydrolyse enzymatique avec un faible apport en enzymes ;
- Faible consommation chimique lors du prétraitement et des étapes ultérieures de neutralisation et de conditionnement ;
- Recyclage et réutilisation des réactifs chimiques utilisés lors du prétraitement ;
- Faible consommation énergétique et la possibilité d'un recyclage d'énergie comme chaleur secondaire ;
- Production minimale de déchets ;
- Efficacité du procédé sur une large gamme de matériaux lignocellulosiques ;
- Besoins en réduction de taille de la matière première limités ;
- Pas ou peu de formation de sous-produits inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et du processus de fermentation ;
- Faible capital et coût opérationnel.

Par ailleurs, certaines conditions de prétraitement peuvent favoriser la formation de composés inhibiteurs du processus de fermentation. En effet, le xylose et le glucose peuvent être dégradés respectivement en furfural et en 5-hydroxyméthyl furfural (HMF). Les prétraitements génèrent également des acides aliphatiques (acide acétique, acide formique, et acide lévulinique) ainsi que des composés phénoliques provenant de la décomposition de la lignine. Toutes ces réactions varient en fonction du type de prétraitement mais également de son degré de sévérité ; un prétraitement efficace doit avant tout limiter la formation de ces produits de dégradation (Chen & Fu, 2016; Kumari & Singh, 2018; Zabed et al., 2016).

L'intensité des conditions prévalant au cours du prétraitement peut être évaluée à l'aide d'un paramètre appelé « critère de sévérité (CS) ». Le CS est défini comme étant un paramètre combinant les effets simultanés de la température, de l'acidité (pH) et de la durée de l'opération (Aita and Kim, 2010; Chen and Liu, 2015; Hendriks and Zeeman, 2009; Kumar et al., 2016). Il est exprimé sous la forme d'une équation empirique liant les trois facteurs principaux du prétraitement (paragraphe 4.2.2.a). L'intérêt de ce facteur est qu'il permet au sein d'un même procédé de prétraitement de faciliter la comparaison entre les différentes conditions et d'avoir un meilleur contrôle. Ce facteur est utilisé particulièrement dans le cas du prétraitement hydrothermique et/ou en conditions acides. Des valeurs de CS ont été fournies par des auteurs (Galbe et Zacchi, 2007; Pedersen and Meyer, 2010) servant de repère sur l'intensité d'un prétraitement pour différentes techniques et substrats. Le niveau de sévérité peut s'étendre de -1,5 à 4,5 en fonction des conditions du prétraitement. L'augmentation de la température engendre une augmentation de la sévérité du traitement et améliore la conversion cellulosique ultérieure (Duque et al., 2016). Cependant, cette augmentation peut également entrainer des pertes de la biomasse, une consommation énergétique élevée et la formation d'inhibiteurs pour les enzymes et les microorganismes en fermentation (Agbor et al., 2011; Alvira et al., 2013). Le niveau de CS augmente aussi après augmentation de l'acidité du milieu réactionnel. Lorsque les valeurs de CS sont relativement élevées, l'hydrolyse des hémicelluloses en oligomères et monomères est favorisée. Néanmoins, des niveaux excessivement élevés de CS pourrait conduire à la dégradation des monomères de xylose et glucose et leur transformation en composés inhibiteurs (Bhutto et al., 2017; Jung et Kim, 2014).

Il convient de mentionner que, dans le contexte de la comparaison entre différentes techniques de prétraitement sur différents substrats, le facteur CS est considéré comme un paramètre unidimensionnel qui n'est pas assez suffisant pour prédire de manière fiable le rendement en sucres récupérés après hydrolyse enzymatique (Pedersen and Meyer, 2010). De plus, dans le même contexte, il parait nécessaire d'utiliser un agent enzymatique normalisé et uniforme, mais aussi un mélange de cellulase à température, pH, dosages des enzymes, temps de réaction et concentration de substrat fixe, afin de valider la comparaison entre les prétraitements (Pedersen and Meyer, 2010).

Des études structurales sur les parois cellulaires végétales suggèrent qu'aucune méthode de prétraitement n'est optimale uniquement pour une biomasse donnée. Par ailleurs, les techniques de prétraitement peuvent être regroupées en trois catégories distinctes : physique, chimique et physico-chimique (Figure 20). Ces catégories peuvent être combinées entre elles, car deux ou plusieurs techniques de prétraitement rassemblées peuvent donner un résultat plus efficace.

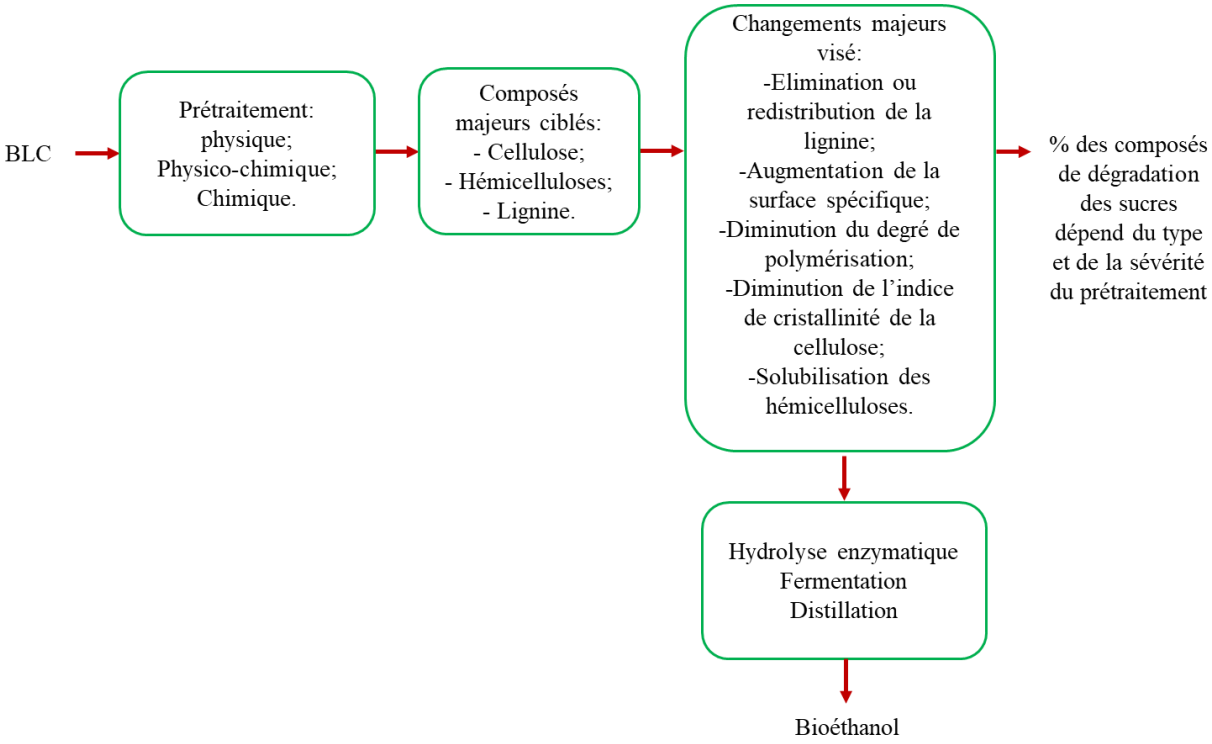


Figure 20 : Effets majeurs du prétraitement sur la biomasse lignocellulosique

4.2.1 Prétraitements physiques

Les prétraitements physiques consistent à réduire la taille du substrat par action mécanique. Le broyage en fragments de quelques millimètres a été utilisé pour améliorer la digestibilité de la biomasse lignocellulosique. Ce traitement modifie les caractéristiques du substrat en augmentant les surfaces accessibles, en réduisant le degré de polymérisation et l'indice de cristallinité de la cellulose, mais aussi en améliorant les phénomènes de transfert de chaleur et de masse. L'énergie nécessaire à l'opération dépend des caractéristiques de la biomasse et de la taille ciblée des particules. En effet, le broyage du bois dur nécessite plus d'énergie que pour les résidus agricoles. Néanmoins, cette énergie reste assez importante pour envisager une application industrielle. Le broyage est plutôt utilisé comme une étape d'homogénéisation de la taille du substrat, étape préalable avant celle du prétraitement éventuel (Karimi et al., 2014; Zhu et al., 2010).

4.2.2 Prétraitements physico-chimiques

Les techniques de prétraitement physico-chimique sont caractérisées par la conjugaison d'actions physique et chimique. Les techniques les plus citées dans la littérature (Bajpai, 2016; Bhutto et al., 2017; Kumar et Sharma, 2017; Wang et al., 2014) sont décrites dans les points suivants :

a) Explosion à la vapeur « steam explosion »

L'explosion à la vapeur est une méthode physico-chimique largement utilisée pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique. Le terme "autohydrolyse" a également été

utilisé comme synonyme de l'explosion à la vapeur, décrivant les changements qui ont lieu au cours de ce processus. Elle consiste à traiter la biomasse préalablement conditionnée par un traitement physique, avec de la vapeur saturée à pressions comprise entre 0,7 et 4,8 MPa et des températures variant de 160 à 240 °C (Agbor et al., 2011; P. Kumar et al., 2009; Sun and Cheng, 2002). La pression est maintenue pendant quelques secondes à quelques minutes, puis une détente brutale est appliquée jusqu'à la pression atmosphérique. Le schéma de ce système de prétraitement est représenté dans la Figure 21.

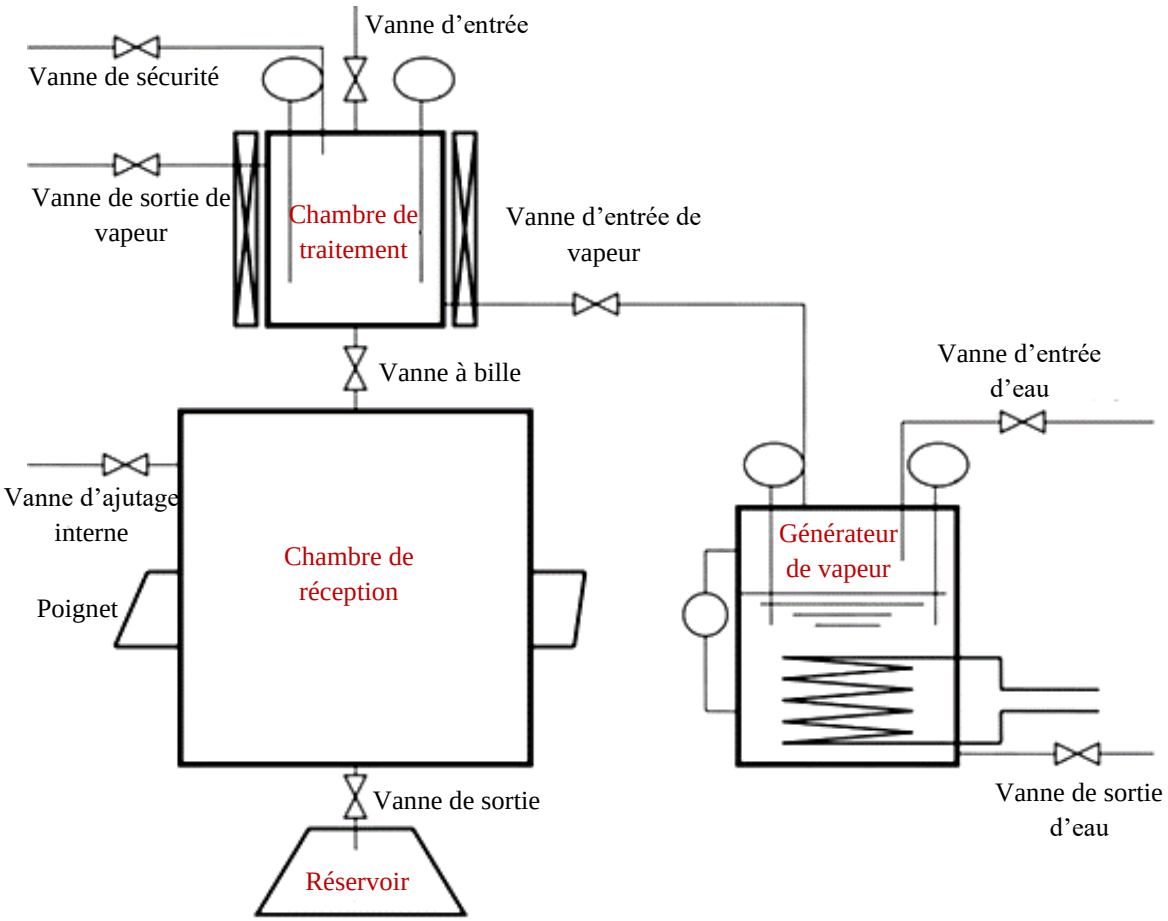


Figure 21 : Schéma du système du prétraitement de l'explosion à la vapeur (Liu et al., 2013)

Cette technique favorise l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique et la transformation de la fraction lignine (Agbor et al., 2011; Singh et al., 2014). La cellulose dans le substrat prétraité devient plus accessible, par conséquent, la digestibilité de la matière lignocellulosique est améliorée par rapport au substrat non traité (Aditiya et al., 2016; Chen et al., 2017). En effet, l'eau à haute température génère des ions hydrogène suivant des réactions d'auto-ionisation, ce qui porte le milieu à des conditions acides. Les groupements acétyles présents dans la fraction hémicellulosique sont ainsi hydrolysés en produisant de l'acide acétique. Cet acide catalyse davantage la réaction d'hydrolyse de la liaison glycosidique (Figure 22) au sein des hémicelluloses entraînant la libération des monomères de glucose mais principalement du xylose, justifiant ainsi l'utilisation du terme « autohydrolyse » (Cybulska et al., 2013; Duque et al., 2016; Sui et Chen, 2015).

Les facteurs les plus importants affectant l'efficacité du prétraitement par le procédé d'explosion à la vapeur sont la taille des particules, la température, le temps de traitement et l'humidité (Duff and Murray, 1996; Negro et al., 2003; Sun and Cheng, 2002). La solubilisation et l'hydrolyse optimales des hémicelluloses peuvent être obtenues en utilisant soit une température élevée et un temps de séjour court (270 °C de l'ordre de 1 min) ou des températures plus faibles et des temps de séjour plus longs (190 °C, 10 min) (Duff and Murray, 1996). Néanmoins, les travaux de Wright, (1998) cité par Kumar and Sharma, (2017) ont montré qu'une température plus basse et un temps de séjour plus long constituent des conditions plus favorables, car ils permettent d'éviter la formation des produits de dégradation des sucres glucose et xylose formés pendant le prétraitement par explosion à la vapeur (Figure 23).

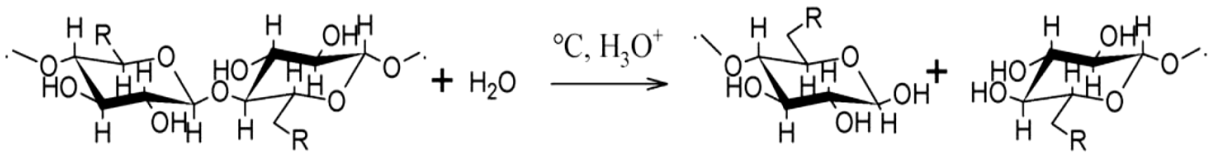


Figure 22 : Réaction de l'hydrolyse acide de la liaison glycosidique

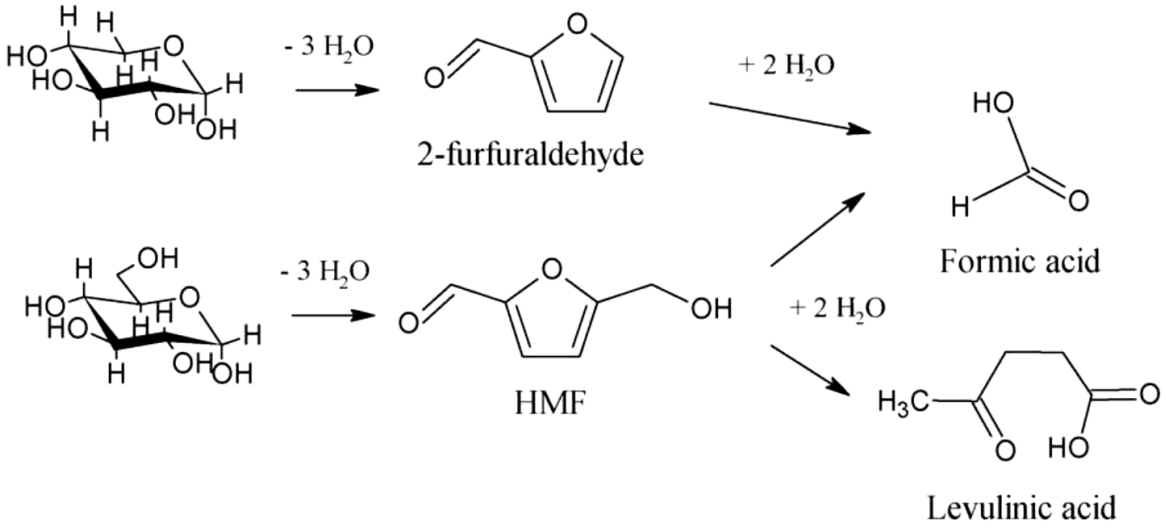


Figure 23 : Formation en milieu acide du furfural, hydroxymethlfurf (HMF), l'acide levulinique et l'acide formique à partir des monosaccharides

Le facteur de sévérité défini pour la première fois par Overend et al., (1987) est un terme commun qui décrit les effets combinés de la température et le temps de réaction. Le modèle est basé sur la cinétique du premier ordre qui obéit à la loi d'Arrhenius (Jang et al., 2016):

$$R_0 = te^{\frac{(T(t)-T_R}{14,75}} \quad \text{Eq. 3}$$

Où, R_0 est le facteur de sévéruté ; T est la température en °C ; T_R est la température de référence (100°C) ; t est le temps de résidence en min et la constante de 14,75 est la valeur de l'energie d'activation selon une réaction de premier ordre.

Dans le cas où un catalyseur acide est ajouté au prétraitement de l'explosion à la vapeur, Abatzoglou et al., (1992) a modifié l'expression mathématique du facteur de sévérité en incluant le pH comme troisième paramètre pour estimer son effet sur le prétraitement. Ainsi, le facteur de sévérité combinée est calculé sous la forme suivante (Jang et al., 2016) :

$$CS = \log(R_0) - pH \quad \text{Eq. 4}$$

Récemment, un nouveau paramètre, densité de puissance d'explosion (EPD, Explosion Power Density), a été introduit pour tenir compte de l'effet de la durée du processus d'explosion (Z. Yu et al., 2012). Le processus de l'explosion à la vapeur peut être divisé en phase d'ébullition à la vapeur (réaction thermochimique) et phase d'explosion (conversion d'énergie), ces deux phases pourraient être exprimées par le facteur de sévérité (R_0) et EPD, respectivement. La théorie de l'EPD est basée sur l'hypothèse du processus d'expansion d'un système adiabatique, P_e est déterminé par la variation de la température avant et après la phase d'explosion, selon l'équation suivante :

$$P_e = \frac{\Delta H_s + \Delta H_l + \Delta H_m}{t * V} \quad \text{Eq. 5}$$

Où ΔH_S, ΔH_w, et ΔH_m signifie la variation d'enthalpie de la vapeur (steam), de l'eau (liquid water) et de la matière respectivement. Les termes t et V représentent la durée de l'explosion et le volume du réacteur, réspectivement.

Le facteur EPD ne remplace pas le critère de sévérité CS, mais dans les cas où l'EPD varie considérablement, le facteur CS devient moins important. Cela se produirait lorsqu'une très courte explosion et des basses températures sont atteintes après le prétraitement (Duque et al., 2016).

D'après Balat (2011) la technique de l'explosion à la vapeur peut être considérée comme la méthode la plus efficace pour le prétraitement de la biomasse de type bois dur et résidus agricoles, mais elle est moins efficace pour les résineux (bois tendre). Liu et Chen (2015) ont évalué la conversion de la cellulose et hémicelluloses des tiges de maïs, en glucose et xylose, respectivement, suite à l'application de l'explosion à la vapeur suivie de l'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité. Les résultats ont montré que les conditions optimales d'explosion de la vapeur étaient de 160 °C et 48 min, où la conversion de la cellulose et des hémicelluloses était de 93,4 et 71,6%, respectivement. Wood et al. (2014) ont appliqué l'explosion à la vapeur sur la paille de colza et étudié son effet sur l'hydrolyse enzymatique. Les résultats ont montré que 86% en glucose a été récupéré après hydrolyse enzymatique du substrat prétraité à 210 °C pendant 10 min. Ces travaux suggèrent que l'augmentation du rendement de l'hydrolyse est fortement corrélée à l'élimination des chaines de xylane. Ces mêmes travaux indiquent que la réduction de la taille des particules de la paille de colza

améliore la saccharification, particulièrement à des niveaux de sévérité faibles. Bien que l'opération de réduction de la taille des particules soit un processus énergivore et coûteux, une granulométrie appropriée pourrait considérablement améliorer l'efficacité du prétraitement en raison d'une efficacité élevée des phénomènes de transfert de masse et de chaleur (Liu et al., 2013). Notons aussi que les besoins en vapeur saturée dans le processus d'autohydrolyse augmentent avec l'augmentation de la taille et l'humidité des particules de la biomasse (Toor et al., 2013). La détente explosive utilisée dans cette technologie ouvre la structure de la biomasse, mais la digestibilité de la cellulose n'est que faiblement corrélée avec cet effet (Aita et Kim, 2010). Une partie de la lignine est éliminée par ce type de prétraitement, mais elle est redistribuée sur les surfaces de la fibre à la suite des réactions de dépolymérisation/ repolymérisation (Aita et Kim, 2010; Karimi et al., 2014).

Le prétraitement par explosion à la vapeur, comparé à d'autres méthodes de prétraitement, offre des avantages tel qu'un faible coût d'investissement, un impact environnemental significativement faible, un potentiel d'efficacité énergétique élevé et une utilisation des produits chimiques dans des conditions moins dangereuses (Bhutto et al., 2017; Duque et al., 2016; Wang et al., 2014). Cependant, il existe un certain nombre de limitations liées à l'application de cette technique, notamment la dégradation partielle des sucres produits après hydrolyse des hémicelluloses et la rupture incomplète de la matrice lignine-polysaccharides, formant des sous-produits inhibiteurs des activités ultérieures, en aval du procédé de bioconversion (P. Kumar et al., 2009). L'utilisation de système de détoxification et lavage dans l'eau du substrat prétraité pour l'élimination des composés inhibiteurs ont été discutés dans la littérature (Toor et al., 2013; Zabed et al., 2016). Néanmoins, ces systèmes entrainent une diminution du rendement global de la saccharification en raison des pertes en sucres solubles obtenus après le prétraitement, et impactent le procédé de bioconversion d'un point de vue économique et environnemental.

L'explosion à la vapeur peut être efficacement améliorée par l'ajout de H_2SO_4 (Fan et al., 2014b; Guerrero et al., 2017; Sharma et al., 2015) ou SO_2 (Carrasco et al., 2010; Wiman et al., 2012), typiquement pour des concentrations comprises entre 0,3 et 3% (massique), comme catalyseur de la réaction d'hydrolyse de la fraction hémicellulosique (Figure 22). L'utilisation de catalyseurs acides permet une diminution de la température et le temps de traitement comparativement aux conditions sans catalyseur, ainsi qu'une récupération complète des sucres hémicellulosiques, une diminution de la production de composés inhibiteurs et une amélioration de l'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité (Balat, 2011; Duque et al., 2016).

L'explosion à la vapeur catalysée par acide sulfurique a été largement utilisée sur plusieurs substrats lignocellulosiques. L'utilisation de ce procédé pour le prétraitement des copeaux de saule (bois dur), à 200 °C pendant 4 ou 8 min à une concentration en acide de 0,5%, a permis de récupérer environ 86% en xylose et 92% en glucose après hydrolyse enzymatique (Sassner et al., 2008). Par ailleurs, les résultats ont montré une diminution de la proportion en lignine avec la sévérité du prétraitement. Fan et al. (2014) ont étudié l'effet de l'explosion à la vapeur sur les rafles de maïs à 200 °C pendant 5 min. La conversion maximale de la cellulose a atteint 85,3%, correspondant à un CS de 3,6 et une concentration en acide sulfurique de 0,3%, une

récupération élevée en xylose a également été obtenue. Sharma et al. (2015) ont étudié le prétraitement de la paille de riz imprégnée par l'eau ou l'acide sulfurique à une concentration de 0,5%, à des températures de 200 et 180 °C, respectivement. Les résultats ont montré que le taux de récupération des sucres a été similaire dans les deux cas de prétraitement (~87%). En revanche, inversement à l'imprégnation dans l'eau, l'imprégnation dans l'acide a permis l'obtention des concentrations en sucres monomères supérieures à celles des sucres oligomères, favorisant l'étape de l'hydrolyse enzymatique. Guerrero et al. (2017) ont appliqué le prétraitement par explosion à la vapeur par la méthode des plans d'expériences à surfaces de réponses sur deux substrats lignocellulosique : tige et résidus de banane. Les conditions optimales du prétraitement du premier substrat sont 177 °C, 5 min et 2,2% (vol) en acide sulfurique aboutissant à 91% de rendement en glucose, alors que ceux du deuxième substrat sont 198 °C, 5 min et 1,5% (vol) en acide sulfurique aboutissant à un rendement de 87,1% en glucose. Ces travaux ont particulièrement noté l'importance de la présence d'acide sulfurique pendant l'explosion à la vapeur en raison de la faible teneur en groupements acétyles dans la matière lignocellulosique étudiée.

b) Prétraitement AFEX « Ammonia Fiber Explosion »

Le procédé AFEX est considéré comme une variante de l'explosion à la vapeur qui se déroule en conditions alcalines. Il consiste à mettre en contact la matière lignocellulosique avec de l'ammoniaque liquide à haute température (90 à 100 °C) et sous pression (1 à 5,2 MPa) pendant un certain temps (Chaturvedi et Verma, 2013; Chen et al., 2017). La pression est ensuite brutalement réduite afin d'évaporer l'ammoniaque et exploser le substrat, ce qui entraine l'augmentation de l'accessibilité des enzymes aux polymères cellulosique (Chen et al., 2017). L'optimisation du prétraitement AFEX peut se baser sur plusieurs paramètres tels que l'humidité de la biomasse, la charge en ammoniaque, la température de réaction et le temps de traitement (Bals et al., 2011). La combinaison optimale des paramètres opératoires dépend de la nature de la biomasse lignocellulosique (Balan et al., 2009). Dans le procédé AFEX, l'ammonique anhydre concentré se dissocie dans l'eau pour former les ions ammonium et hydroxyde selon la réaction suivante :

$$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^- \quad \text{Eq. 6}$$

Au cours de la réaction ci-dessus, la chaleur de formation (ΔH_{NH_4OH} à 25°C = 87,59 Kcal/mol) libérée facilite l'augmentation rapide de la température de la biomasse dans le réacteur (Bhutto et al., 2017). Le procédé conventionnel consiste à un chargement en ammonique d'environ 1-2 kg/kg matière sèche à 90 °C pendant 30 min. Après le prétraitement, l'ammonique est évaporé et recyclé (Dheeran et Reddy, 2017). En raison de son recyclage, la consommation de l'ammonique est nettement faible ; environ 90% du réactif chimique est recyclé, peu de quantité reste soluble dans l'humidité du substrat servant comme nutriment aux microorganismes pendant la fermentation (Bhutto et al., 2017). L'effet chimique du procédé AFEX sur la biomasse se traduit par une réduction par solubilisation de la proportion de lignine, une faible hydrolyse des hémicelluloses, une baisse de l'indice de cristallinité de la cellulose et une augmentation des micropores dans la structure de la paroi cellulaire (Dheeran et Reddy, 2017;

Kim et al., 2016). Par conséquent, la structure de la biomasse est modifiée, entraînant une augmentation de la capacité de rétention d'eau, ainsi qu'un gonflement qui améliore sa digestibilité (Stuart et El-Halwagi, 2012). Des travaux Chen et al., (2017) ont montré que la digestibilité enzymatique à faible teneur en enzymes fourni de meilleurs résultats en procédé AFEX que d'autres procédés de prétraitement. Cette amélioration de l'hydrolyse enzymatique a été attribuée à la rupture de la structure de la lignine, réduisant l'adsorption non productive des enzymes. Ces études ont conclu que le procédé AFEX convient au prétraitement de résidus agricoles et plantes herbacées, en raison de leur composition élevée en cellulose.

Il a été montré que le prétraitement par le procédé AFEX peut améliorer les taux de saccharification des plantes herbacées et des résidus agricoles (Mathew et al., 2016; Uppugundla et al., 2014). De plus, ce procédé ne conduit pas à la formation d'inhibiteurs, ne nécessite pas de conditionnement spécifique pour les microorganismes de fermentation, ni d'ajout d'une source d'azote pour la fermentation car l'ammoniaque résiduel suffit (Kim et al., 2016). En revanche, il reste peu efficace dans le prétraitement de la biomasse lignocellulosique contenant des teneurs importantes en lignine, comme les résineux (bois tendre) et modérément efficace sur les feuillus (Chaturvedi et Verma, 2013). Les préoccupations environnementales et énergétiques liées à l'utilisation de l'ammoniaque peuvent avoir aussi un impact négatif pour des applications à grande échelle de cette technologie.

c) La thermohydrolyse « Liquide Hot Water »

La thermohydrolyse est un procédé de prétraitement hydrothermique qui consiste à mettre en contact la biomasse avec de l'eau chaude sous haute pression. Ce prétraitement est quasiment similaire à celui de l'explosion à la vapeur, la majeure différence est que l'eau utilisée à haute température (160-240°C) est à l'état liquide surchauffée, au lieu de l'état vapeur, avec absence de décompression explosive. Le temps de traitement est souvent supérieur à 15 min (Bajpai, 2016; Kumari et Singh, 2018). L'eau chaude brise les liaisons hémiacétals contenues au sein de la fraction hémicellulosique et libère ainsi des acides, ce qui facilite la rupture des liaisons éther dans la biomasse (Bajpai, 2016). Il existe trois types d'installation (Figure 24) pour la thermohydrolyse: contact de la biomasse et de l'eau chaude à co-courant (a), contre-courant(b) et par contact frontal « *flow through* » (Didderen et al., 2008; Mosier et al., 2005).

Dans le premier type d'installation, l'eau chauffée et la biomasse sont mises en contact direct à l'entrée du réacteur. Dans le second type, les deux matières entrent en contact à contre-courant dans le réacteur. La troisième installation (*flow through*) est de type batch, contrairement aux autres qui fonctionnent en continu. Le prétraitement est alors réalisé par passage de l'eau dans le réacteur qui contient déjà la biomasse (Mosier et al., 2005). Cette dernière configuration, par percolation, a été rapportée comme étant la configuration la plus efficace pour la dissolution des hémicelluloses et de la lignine dans les mêmes conditions de sévérité que les deux premières installations (Alvira et al., 2010; Bajpai, 2016).

Dans le procédé de thermohydrolyse, la décomposition des hémicelluloses est divisée en trois étapes : réaction à la surface de la biomasse pour produire des produits primaires, dissolution des produits primaires dans l'eau et décomposition ultérieurs de ces produits (Zhuang et al., 2016). Un modèle d'hydrolyse d'hémicelluloses monophasique a été utilisé comme suit (Q. Yu et al., 2012):

$$\text{Xylane} \xrightarrow{K_f} \text{Xylo-oligomères} \xrightarrow{K_1} \text{Xylose} \xrightarrow{K_2} \text{Furfural} \quad \text{Eq. 7}$$

Le modèle cinétique, basé sur une réaction de premier ordre, consécutif et homogène, est exprimé comme suit :

$$C_x = \frac{C_{H_0} k_f k_1}{(k_1 - k_f)(k_2 - k_f)} \left(e^{-k_f t} - e^{-k_2 t}\right) - \frac{C_{H_0} k_f k_1}{(k_1 - k_f)(k_2 - k_f)} \left(e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}\right) \quad \text{Eq. 8}$$

Où, C_H, C_0, C_X, C_D et C_{H0} sont les concentrations en xylane, xylo-oligomères, xylose, furfural et la concentration initial en xylane, respectivement. K_f, k_1 et k_2 sont les constantes cinétiques des réactions de décomposition du xylane et de ces dérivés.

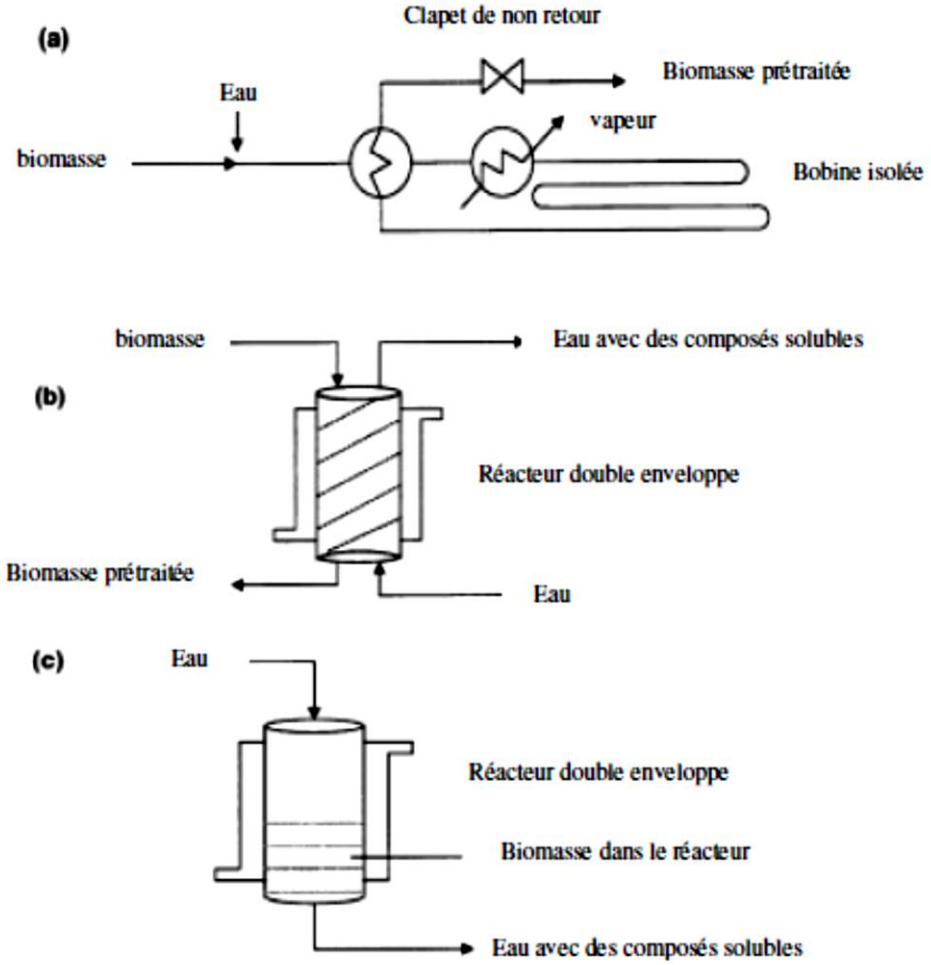


Figure 24 : Illustration schématique des différents types d'installation pour le prétraitement de la thermohydrolyse. (a) : réacteur co-courant ; (b) : réacteur contre-courant ; (c) : réacteur à écoulement frontal (*flow through*) (Mosier et al., 2005)

Le rapport entre les énergies d'activation (Ea) de l'hydrolyse des chaînes de xylane est un indicateur direct de la dépendance de la sélectivité à la température (formation ou dégradation) (Q. Yu et al., 2012). Les travaux de Yu et al. (2012) ont montré que les rapports Ea_f/Ea_1 et Ea_1/Ea_2 de la bagasse du sorgho et des copeaux de bois d'eucalyptus étaient supérieurs à 1, indiquant que des températures élevées en thermohydrolyse favorisent une sélectivité élevée à la formation des oligomères et moins élevée aux monomères de xylose. Une différence importante des paramètres cinétiques a été également observée par Zhuang et al. (2009). L'énergie d'activation pour la décomposition du xylane est de 68,76 kJ/mol pour la paille de riz et de 95,19 kJ/mol pour la coquille de palme alors que celle de la décomposition du xylose est de 47,08 kJ/mol pour la paille de riz et 79,74 kJ/mol pour la coquille de palme, après thermohydrolyse à 160-220°C dans un réacteur batch.

Les conditions de température de traitement varient en fonction de la matière première à prétraiter. En effet, la thermohydrolyse des fibres de maïs a été effectuée dans des plages de température variant de 140 à 180 °C alors que pour certaines matières premières tels que le bois dur les températures utilisées sont plus élevées, allant de 190 à 230 °C (Dheeran et Reddy, 2017). Environ 40 à 60% de la biomasse totale est dissoute dans le procédé, avec solubilisation complète des hémicelluloses, récupérées sous forme des sucres monomères, 4 à 22% de la cellulose et 35 à 60% de la lignine (Aita et Kim, 2010). La cellulose peut être récupérée sous forme de fractions solides et soumise éventuellement à une hydrolyse enzymatique (Dheeran et Reddy, 2017; Gupta et Tuohy, 2014). La maîtrise de la température et du temps de réaction joue un rôle important pour éviter la formation d'inhibiteurs issus de la dégradation des sucres pentose et hexose. Les conditions permettant d'éviter la formation d'inhibiteurs de la fermentation incluent aussi le pH qui doit être maintenu entre 4 et 7 pendant le prétraitement (Balat, 2011). Dans ces conditions, les sucres provenant de la fraction hémicellulosique sont retenus sous forme d'oligomères, minimisant ainsi leur dégradation. Ce procédé est avantageux en termes d'impact environnemental, car il ne nécessite pas d'ajout de réactifs chimiques, et ne produit que peu de rejets. Par contre, il est énergivore et consomme beaucoup d'eau (Bajpai, 2016).

4.2.3 Prétraitements chimiques

Un prétraitement chimique repose sur l'hydrolyse chimique d'un ou de plusieurs composants de la matière lignocellulosique à l'aide de réactifs. Ce type de prétraitement conduit à la modification de la structure cristalline de la cellulose ainsi qu'à l'élimination et/ou à la modification structurale des hémicelluloses et de la lignine.

a) Prétraitement à l'acide dilué

Le prétraitement à l'acide dilué a été utilisé avec succès dans le prétraitement de la biomasse lignocellulosique. Il a été appliqué dans le cas d'une large gamme de matières premières, comprenant les résineux, les feuillus, les plantes herbacées, les résidus agricoles, les résidus de papier et les déchets solides municipaux (Bajpai, 2016; Boakye-Boaten et al., 2016; Lee et al., 2015; Tabassum et al., 2017). Les prétraitements acides permettent la solubilisation des hémicelluloses avec des taux de réaction élevés et l'amélioration de la digestibilité de la

cellulose dans le substrat résiduel. L'acide sulfurique (H_2SO_4) à des concentrations inférieures à 4 % (massique), en milieu aqueux, est couramment utilisé comme réactif de choix principalement pour son efficacité et faible coût (Brodeur et al., 2011; P. Kumar et al., 2009; Menon et Rao, 2012).

L'acide est mélangé avec de la biomasse dans un réacteur en acier inoxydable, à une température comprise entre 140 et 215 °C (Agbor et al., 2011; Sun et Cheng, 2002), pendant un temps de séjour pouvant aller de quelques secondes à plusieurs minutes selon la température du prétraitement sélectionnée (Taherzadeh et al., 2008). Le mélange peut être chauffé directement en utilisant de la vapeur sous pression, comme dans le cas du prétraitement à la vapeur, ou indirectement via les parois du réacteur (Agbor et al., 2011; Tian et al., 2018). Il existe essentiellement deux types de processus de prétraitement à l'acide dilué :

- Haute température (supérieure à 160 °C), procédé à flux continu pour une faible charge de solide, de 5 à 10% du chargement en substrat,

- Basse température (inférieure à 160 °C), traitement pour une charge de solide élevée, allant de 10 à 40%.

Le prétraitement à l'acide dilué présente l'avantage d'hydrolyser la fraction des hémicelluloses, principalement les chaines de xylane, mais aussi de convertir les oligomères obtenus en sucres monomères. Selon l'intensité des conditions opératoires, les produits de dégradation des sucres pentoses (en furfural) et hexoses (en HMF) peuvent être identifiés dans la phase liquide des hydrolysats après prétraitement, ainsi que les acides acétiques libérés par les groupements acétyles liés à l'hémicellulose et les composés phénoliques provenant de la dégradation de la lignine. Gaur et al. (2016) ont étudié le prétraitement à l'acide dilué des tiges de coton à l'aide de la méthode des plans d'expériences. Les conditions de prétraitement optimales : température de 157 °C, concentration d'acide de 1,07% (massique) et une durée de 20 minutes, ont permis d'obtenir un rendement global de saccharification, intégrant le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique, de 91,1%. Ces travaux ont montré que l'hydrolyse des hémicelluloses a été positivement corrélée avec le critère de sévérité du prétraitement jusqu'à une valeur de CS = 3. De plus, le profil de formation de l'acide acétique a montré que sa libération se produit parallèlement à l'hydrolyse de l'hémicellulose, montrant une augmentation continue pour atteindre une saturation à un CS = 3. Par ailleurs, les concentrations en furfural et HMF n'ont commencé à progresser qu'au-delà d'une valeur de CS de 2,9 et 3,4, respectivement. Le prétraitement effectué par Lee et al. (2015) sur de la paille de riz, préalablement acidifiée par une solution à 1% (g/g MS) en H_2SO_4, à une température de 160 °C pendant 10 min, a abouti à une conversion cellulosique de 57% sur la base de la teneur initiale en cellulose. Les concentrations en composés inhibiteurs rapportées dans ces conditions ont été de 0,19 et 0,68 g/L en HMF et furfural, respectivement. Boakye-Boaten et al. (2016) ont évalué le prétraitement du miscanthus en utilisant une solution à 1% (volumique) en H_2SO4, à 160 °C pendant 10 min. Les résultats ont montré une réduction de la proportion en hémicelluloses de 46 à 1% en se référant à la composition de l'échantillon natif. Ces travaux ont abouti à des concentrations plus importantes en xylose qu'en glucose dans les hydrolysats de prétraitements, suggérant que dans

ces conditions, la majeure fraction hydrolysée pendant le prétraitement est constituée par les hémicelluloses alors que la fraction cellulosique reste conservée dans le substrat solide. La matrice hémicellulose-lignine qui entoure la fraction de cellulose dans la biomasse agit comme une barrière physique empêchant l'accès des cellulases à la surface de la cellulose. Par conséquent, l'élimination des hémicelluloses peut augmenter le volume des pores et la surface spécifique du substrat solide et ainsi faciliter l'accès des cellulases aux polymères cellulosiques. Cependant, il a été rapporté que la modification et la recondensation de la lignine pendant le prétraitement acide à haute température peut altérer la digestibilité enzymatique du substrat prétraité (Zhu et al., 2008).

Bien qu'ils soient des agents puissants pour l'hydrolyse des hémicelluloses, les acides sont toxiques, corrosifs et dangereux et nécessitent des réacteurs résistants à la corrosion. D'autres inconvénients liés à l'utilisation de ce procédé sont la nécessité de neutralisation des hydrolysats de prétraitement ainsi que la détoxification des composés inhibiteurs avant l'étape de fermentation. Pour rendre le procédé économiquement viable, l'acide dilué doit être récupéré après prétraitement (Galbe and Zacchi, 2012; Mosier et al., 2005).

b) Prétraitement en milieu alcalin

Le traitement alcalin des matériaux cellulosiques est un processus ancien, couramment utilisé dans l'industrie des pâtes et papiers (Takai et Colvin, 1978). Ce prétraitement repose sur l'utilisation de solutions alcalines en vue d'éliminer principalement la lignine, mais aussi solubiliser les hémicelluloses, favorisant ainsi l'accessibilité enzymatique aux polysaccharides (Agbor et al., 2011; Chen et Liu, 2015). Le procédé de prétraitement en milieu alcalin, consiste à immerger la biomasse dans une solution alcaline (0,5-10 %), à température et pression plus faibles (60-180°C) que celles des prétraitements précédemment cités (Kim et al., 2016). En principe, ce prétraitement peut être effectué à température ambiante mais avec des temps de contact beaucoup plus longs que ceux adoptés à des températures élevées (Menon et Rao, 2012).

L'hydroxyde de sodium est couramment utilisé dans le prétraitement chimique des lignocelluloses en raison de son pouvoir de délignification de la biomasse (Chen et Liu, 2015; P. Kumar et al., 2009; Singh et al., 2014; Tian et al., 2018). Le traitement à l'hydroxyde de sodium dilué implique des réactions d'hydrolyse basique et de saponification de la lignine (Figure 25), ce qui provoque ; un gonflement de la biomasse, une augmentation de sa surface interne, une diminution de la cristallinité, une séparation des liaisons structurales entre la lignine et les polysaccharides et d'une façon générale une perturbation de la structure de la lignine (Chen et Liu, 2015; P. Kumar et al., 2009; Singh et al., 2014; Tian et al., 2018).

Les groupements acétyles et les acides uroniques substituants des chaines des hémicelluloses sont aussi éliminés par ce type de prétraitement. L'ensemble de ces effets améliore la pénétration des enzymes dans la microstructure de la paroi cellulaire ainsi que la réactivité du substrat prétraité. Il est à noter que la vitesse d'hydrolyse dans le traitement basique est inférieure que celle rencontrée dans le traitement acide (Karimi et al., 2014). Ce traitement

implique d'autres processus complexes faisant intervenir d'autres réactions (Karimi et al., 2014).

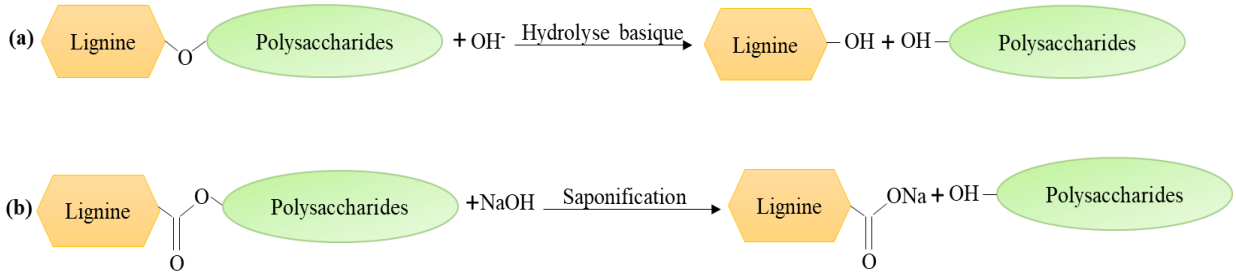


Figure 25 : Réactions de délignifications. (a) : Hydrolyse basique des fonctions éthers, (a) : Réaction de saponification des liaisons esters (Privas, 2013)

L'efficacité du prétraitement à l'hydroxyde de sodium dilué est généralement élevée pour les résidus agricoles, faible pour les feuillus et très faible pour les résineux (Bjerre et al., 1996; McMillan, 1992). Kim et Holtzapple, (2006) ont rapporté que l'énergie d'activation utilisée pour la délignification des espèces herbacées (bagasse, tiges de maïs, etc.) par prétraitement alcalin est beaucoup plus faible (50,2 à 54,2 kJ/mol) que celle requise pour la délignification du bois en raison de la différence de teneur en lignine.

Sun et al. (1995) ont étudié l'efficacité du prétraitement alcalin en analysant la délignification et la dissolution des hémicelluloses de la paille de blé prétraitée dans différentes conditions. Les résultats obtenus ont montré que les conditions optimales qui ont permis d'aboutir à 60% d'élimination de lignine et de 80% des hémicelluloses sont ; une concentration de l'hydroxyde de sodium de 1,5%, une température de 20 °C et un temps de prétraitement de 144 h. Xu et al. (2010) ont rapporté des taux de conversion de 74,4 et 62,8% des chaînes de glucose et xylose, respectivement, après prétraitement de la plante *swichgrass* avec une solution à 1% en NaOH, à une température de 50 °C pendant 12 et 72 h d'hydrolyse enzymatique. Le taux d'élimination de la lignine rapporté est de 77,8%, démontrant la capacité de délignification de ce type de prétraitement. Ces mêmes travaux ont montré une corrélation entre la sévérité du prétraitement et l'élimination de la lignine. En revanche, ils ont conclu que ce critère ne représente pas un indicateur approprié sur l'efficacité du prétraitement en raison d'une perte considérable des glucides dans les conditions de prétraitement les plus sévères. Sindhu et al. (2014a) ont étudié l'effet d'immersion de la paille de canne à sucre dans une solution à 3% de concentration en NaOH, chauffée à 121 °C pendant 60 min. Les résultats ont montré un taux d'élimination de la lignine de 90% et une récupération des sucres de 77,5%.

Le prétraitement du résidu « Empty fruit bunch » effectué par Chiesa et Gnansounou, (2014) avec des solutions de concentration en NaOH allant de 0,04 à 2%, a montré de faibles performances en hydrolyse enzymatique, en raison de la teneur en lignine relativement importante (22,9%). D'autres travaux sur cette même matière lignocellulosique effectués par Choi et al. (2013) ont abouti à un rendement de saccharification enzymatique de 88,8% après 72 h de temps d'incubation, suite à un prétraitement par explosion à la vapeur à 160 °C pendant

11 min et 20 s du substrat préalablement immergé dans une solution à 3% en NaOH avec des taux élevés d'élimination de la lignine (>85%).

Il est à noter que ce type de prétraitement ne conduit pas à la formation des composés de dégradation des sucres tels que le furfural et le HMF. Néanmoins, la formation de sels peut représenter une limitation pour les étapes ultérieures du procédé de bioconversion (Bhutto et al., 2017; Sindhu et al., 2014b). Une étape de neutralisation et de lavage du substrat prétraité en vue d'éliminer la lignine solubilisée ainsi que ses composés de dégradation avant l'hydrolyse enzymatique est recommandée pour ce type de prétraitement (Menon et Rao, 2012). Ainsi, la mobilisation de volumes importants en eau impacte le coût du procédé et son exploitation à grande échelle.

c) Prétraitement Organosolv

Le procédé Organosolv (Figure 26) a été développé à l'origine comme une alternative, respectueuse de l'environnement, aux procédés de fabrication des pâtes et papier tel que le procédé Kraft (Pye et Lora, 1991). Il a été ensuite identifié comme un prétraitement potentiel et prometteur pour la déconstruction de la matière lignocellulosique et appliqué avec succès pour le prétraitement de la biomasse (Papatheofanous et al., 1995; Zhang et al., 2016). Ce procédé consiste à solubiliser et extraire la lignine à l'aide d'un solvant organique généralement mélangé avec de l'eau, rendant les fibres cellulosiques du substrat dépourvues de lignine et plus exposées à l'hydrolyse. Aussi, les liaisons non productives entre les enzymes et la lignine sont minimisées, ce qui améliore le processus de saccharification enzymatique (Agbor et al., 2011; Zhang et al., 2016).

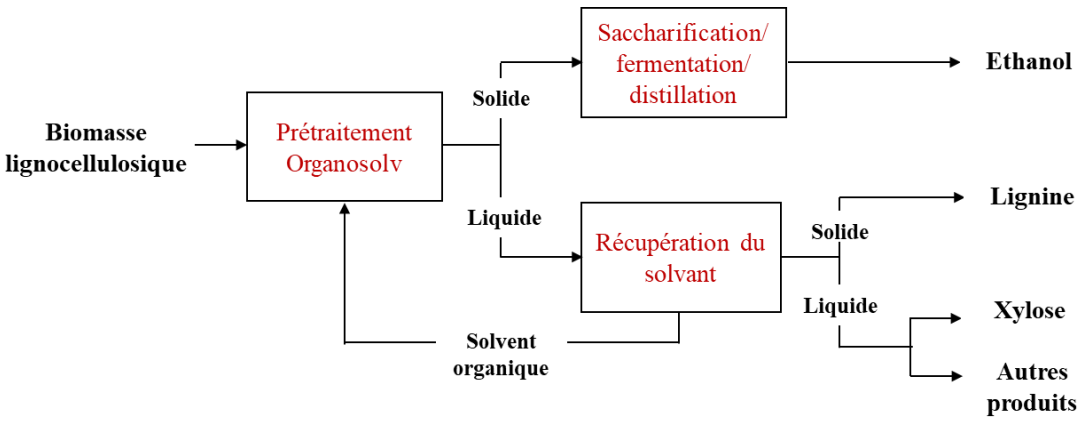


Figure 26 : Schéma du procédé Organosolv (Zhang et al., 2016)

Les solvants les plus couramment utilisés dans ce procédé sont l'éthanol, le méthanol, l'acétone ou l'éthylène glycol. Les alcools à faible masse moléculaire, tels que l'éthanol et le méthanol, avec des points d'ébullition faibles sont privilégiés (Chen et al., 2017). Le prétraitement est effectué à des températures inférieures à 200 °C en présence de catalyseurs acides (sulfurique, phosphorique, chlorhydrique…) afin d'améliorer la dissolution de la lignine et de la fraction hémicellulosique et d'augmenter les rendements en xylose (Bhutto et al., 2017; Gupta et Tuohy, 2014). L'addition d'acide peut être évitée en effectuant le prétraitement à des températures supérieures à 185 °C, ce qui provoque le phénomène d'autohydrolyse avec la libération des acides acétiques issus des hémicelluloses (Zhang et al., 2016). Le prétraitement Organosolv est un procédé sélectif qui permet de produire trois fractions séparées ; la lignine sèche, une fraction aqueuse contenant les hémicelluloses et une fraction de cellulose pure. Les résidus solides prétraités sont séparés par filtration et lavés avec l'eau distillée afin d'éliminer les solvants et les produits de dégradation pouvant inhiber les étapes en aval, celles de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation (P. Kumar et al., 2009).

Ce prétraitement est particulièrement efficace pour la biomasse lignocellulosique à haute teneur en lignine, car il est capable de rompre les liens internes de la lignine et des hémicelluloses (Kumari et Singh, 2018). D'après Kumar et al., (2009) les conditions opératoires dépendent étroitement de la nature de la biomasse et du type de catalyseur utilisé, mais sont généralement effectuées à des températures comprises entre 180 et 195 °C, des temps de réaction allant de 30 à 90 min, et des concentrations en solvant (éthanol) variant de 35 à 70% avec un ratio massique solide/liquide variant de 4:1 à 10:1. La paille de blé prétraité par le procédé Organosolv, avec une solution à 60% d'éthanol, sans catalyseur, à 210 °C pendant 60 min peut libérer 86% en glucose après hydrolyse enzymatique (Wildschut et al., 2013).

Goh et al. (2011) ont optimisé le prétraitement à l'éthanol en présence d'acide sulfurique du résidu « Empty fruit bunch » utilisant la méthode des plans d'expériences et le critère de sévérité combiné. Leurs travaux ont montré que la concentration en éthanol est le facteur le plus influent sur le rendement en glucose en le comparant avec la température réactionnelle et le temps de séjour.

Jang et al. (2016) ont effectué un prétraitement Organosolv sur du tulipier de virginie, considéré comme du bois dur, en utilisant de l'éthanol à 50% en présence d'acide sulfurique. A 170 °C, 10 min de temps de séjour et un pH de 1,9, la conversion enzymatique et l'élimination de la lignine ont atteint 97,7% et 78,7%, respectivement.

Enfin, dans ce procédé, le solvant doit être extrait et recyclé à 100%, ce qui permet, en plus d'un éventuel recyclage d'éviter des phénomènes d'inhibition au cours des étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation. Aussi, le coût élevé des produits chimiques ainsi que les problèmes liés à la sécurité lors de l'utilisation de solvants organiques présentent un frein au développement de ce procédé à l'échelle industrielle (Bajpai, 2016; Zhang et al., 2016).

4.3 Procédés de prétraitements émergents

4.3.1 Détente Instantanée Contrôlée

Il s'agit d'un procédé hydro-thermomécanique proche de l'explosion à la vapeur d'eau, utilisant des températures élevées obtenues suite à un contact avec de la vapeur d'eau sous pression, pendant un certain temps, suivi d'une détente flash vers des pressions réduites (Figure 27). Le traitement de la biomasse débute par la mise sous pression réduite d'environ 5 kPa, avant l'injection de la vapeur d'eau saturée. L'intérêt de l'instauration du vide initial est de réduire la résistance de l'air, ce qui accélère les phénomènes de diffusion de vapeur dans le produit. Le temps nécessaire pour atteindre la température d'équilibre est ainsi largement réduit. Après un temps de séjour à haute pression/haute température, la détente abrupte vers une pression réduite provoque une forte baisse de pression au voisinage du produit ; l'eau contenue dans la matière se trouve alors en déséquilibre thermodynamique et subit un phénomène d'autovaporisation. Ce phénomène produit une force mécanique au sein de la matrice causant des déformations structurales par cisaillement dont l'amplitude dépend des propriétés rhéologiques du produit, de sa teneur en eau et de la température de transition vitreuse. La chaleur nécessaire à ce processus d'autovaporisation est fournie par la matière provoquant ainsi son refroidissement (Maache-Rezzoug et al., 2011), ce qui va dans le sens d'une limitation des réactions secondaires de formation de molécules inhibitrices (Furfural et HMF).

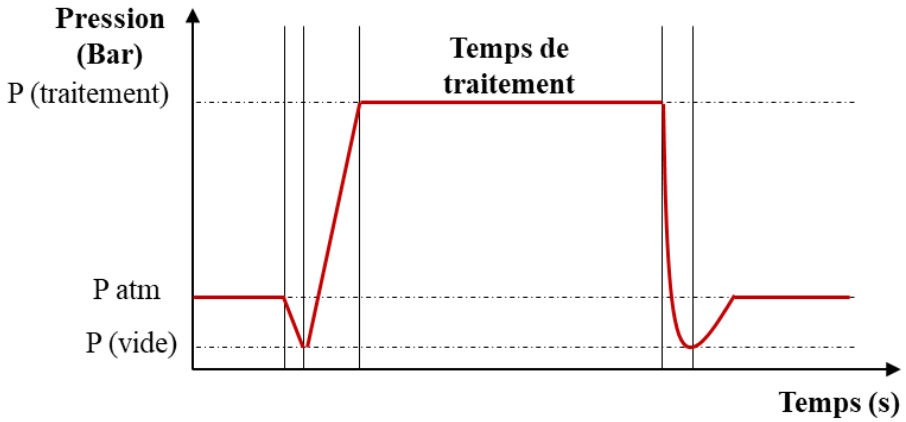


Figure 27 : Représentation du cycle du traitement DIC

Des travaux réalisés par Maache-Rezzoug et al. (2009) sur l'hydrotraitement de l'amidon de maïs par ce procédé ont montré une amélioration significative de la réactivité enzymatique des amidons modifiés, dont les rendements d'hydrolyse (liquéfaction et saccharification) étaient supérieurs à ceux des amidons natifs. Pierre et al. (2011) ont montré, par rapport à la quantité de sucres réducteurs contenus dans des drèches de malt mais aussi dans de la paille de blé, que l'efficacité de l'action des enzymes est étroitement liée aux conditions du prétraitement. L'effet du broyage sur les rendements et les vitesses d'hydrolyse a été étudié sur trois distributions granulométriques de paille de blé (1000 à 8000 µm ; 600 à 1000 µm ; 50 à 600 µm). La réduction de la taille granulométrique du substrat combiné au prétraitement DIC a permis d'améliorer le taux de sucres réducteurs libérés ; les taux ont été de 62,5, de 75,3 et de 96,7% pour respectivement les fractions grossière, moyenne et fine (Figure 28). Ces résultats montrent

clairement l'intensification des rendements d'hydrolyses avec le couplage des prétraitements mécaniques et thermomécaniques.

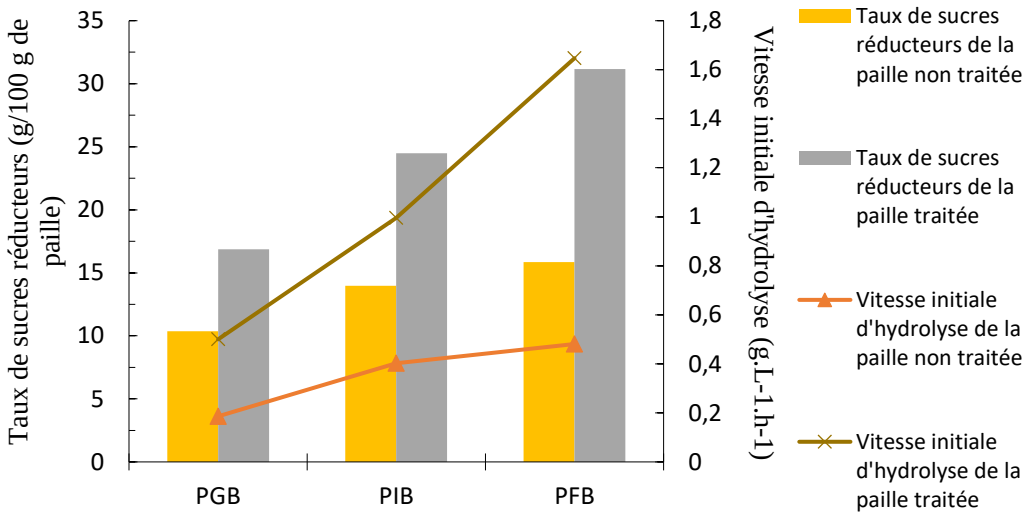


Figure 28 : Effet combiné des prétraitements mécanique et thermomécanique par DIC sur le taux de sucres réducteurs et sur la vitesse initiale d'hydrolyse. PGB (paille grossièrement broyée), PIB (intermédiairement broyée) et PFB (finement broyée) (Pierre et al., 2011)

L'effet de la variation de la concentration en cellulases sur les paramètres cinétiques de la réaction d'hydrolyse de la cellulose a été étudié sur la paille native et prétraitée par DIC (165°C pendant 15 min) par Pierre et al. (2011). Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration en enzyme favorise la vitesse initiale d'hydrolyse de la cellulose (Figure 29) avec une différence significative entre les deux types de paille et ce quelle que soit la concentration en cellulases utilisée.

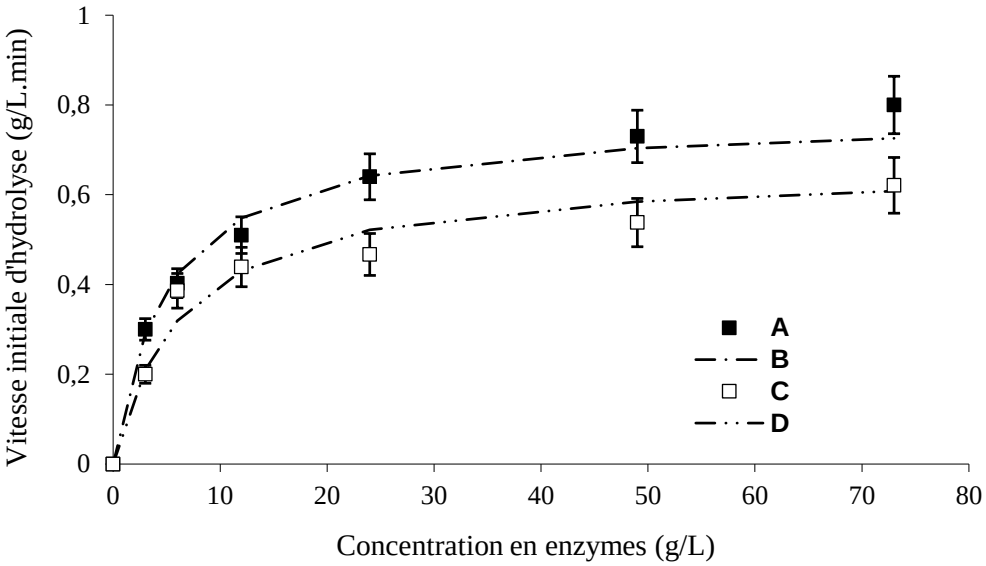


Figure 29 : Vitesse initiale d'hydrolyse de 10 g/L de paille en fonction de la concentration en cellulases. Réactions menées dans du tampon citrate-phosphate pH 4,6 à 50 °C sous une agitation de 600 rpm. A et B, C et D: profils expérimentaux et théoriques de la paille prétraitée (15 min à 165°C) et du témoin, respectivement (Pierre et al., 2011)

Le procédé DIC a été combiné à l'acide sulfurique à 0,7-2,2 % imprégné à la paille par aspersion par Maache-Rezzoug et al. (2015). L'aspersion consiste à vaporiser des quantités de solutions chimiques aqueuses sur le substrat sans génération de fractions liquides résiduelles comme c'est le cas de l'immersion, permettant ainsi la minimisation de l'impact environnementale lié à la présence du réactif. L'absorption du catalyseur par le substrat lignocellulosique est favorisé par sa structure poreuse mais aussi par sa composition en composés hydrophiles (Figure 30). Ces travaux ont montré par application de la méthode des plans d'expériences l'effet significatif de l'acide sulfurique, suivi par la température et le temps de séjour sur la récupération des sucres après hydrolyse enzymatique de la paille prétraitée. Les auteurs ont montré que l'aspersion de l'acide sulfurique combiné au traitement thermomécanique DIC engendre des modifications significatives au sein du substrat ; la surface spécifique a augmenté, facilitant ainsi l'accessibilité des enzymes aux polymères cellulosiques ainsi les rendements totaux en sucres récupérés après hydrolyse enzymatique ont été améliorés. L'application de ce prétraitement à un niveau de sévérité de 1,25 a entrainé l'augmentation de la surface spécifique de 0,76 (paille à l'état natif) à 1,68 m^2/g, ainsi la maximisation de la concentration en glucose (6,07 g/L) obtenue après hydrolyse enzymatique.

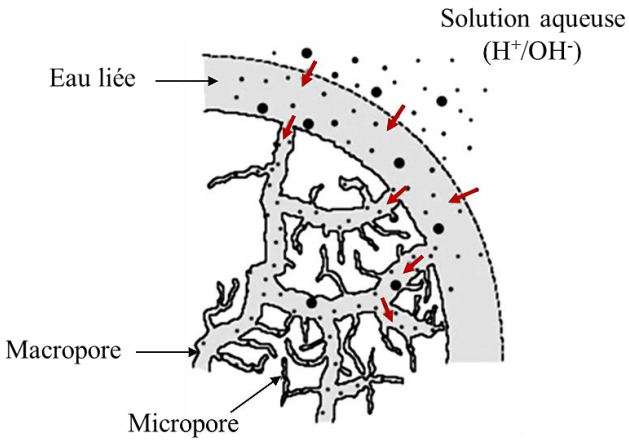


Figure 30 : Schéma simplifié de l'absorption du catalyseur chimique au sein du substrat lignocellulosique

4.3.2 Irradiation par micro-ondes

Le prétraitement par irradiation micro-ondes repose sur un chauffage par émission de rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 0,1 à 1 m et la fréquence de 0,3 à 300 GHz. Dans le cas du chauffage conventionnel, l'énergie est transférée de la surface extérieure vers l'intérieur du matériau par conduction et convection. Ainsi, une surchauffe peut se produire sur la surface extérieure avec des zones intérieures plus froides. Aussi, les phénomènes de transfert de chaleur dépendent de la conductivité thermique de la matière et les courants de convection lors du chauffage. En revanche, les micro-ondes produisent de la chaleur au niveau moléculaire par conversion directe de l'énergie électromagnétique en chaleur. L'énergie est donc uniformément dissipée à travers le substrat (Hassan et al., 2018). Ce qui représente alors une alternative au chauffage conventionnel.

Cette technique a été utilisée pour améliorer l'accessibilité et la réactivité de la cellulose. Elle s'opère de manière simple, avec une répartition efficiente de l'énergie disponible et un temps de chauffage court (Bajpai, 2016; Xu, 2014). En revanche, pour que le chauffage par micro-ondes soit effectif, des températures élevées sont nécessaires (>160 °C) (Chen et al., 2017). Binod et al. (2012) ont prétraité de la bagasse par micro-ondes, à 600 W pendant 4 min en conditions acides et/ou basiques. Les résultats obtenus ont montré que le prétraitement a amélioré le rendement en sucres fermentescibles et les conditions appliquées ont eu un effet significatif sur l'élimination de la lignine, notamment en conditions alcalines. Le prétraitement de la bagasse de canne à sucre en conditions acides et basiques a été évalué par Zhu et al., (2016) en comparant le chauffage par micro-onde à 320 W et le chauffage conventionnel à 120 °C. Les résultats ont montré que le prétraitement assisté par micro-ondes est plus efficace que le prétraitement par chauffage conventionnel, engendrant une libération de sucres réducteurs 4 fois plus élevée avec une durée de prétraitement 5,7 fois plus réduite. L'irradiation par micro-ondes de la sciure de bois d'Eucalyptus immergée dans l'eau a été étudiée et comparée directement avec un prétraitement par thermohydrolyse classique par Amini et al. (2018). Après une irradiation par micro-ondes de 30 min à 180 °C, le rendement en sucres obtenu était de 3,5 fois plus élevé que celui obtenu par thermohydrolyse, dans les mêmes conditions (Amini et al., 2018).

Bien que le prétraitement de la biomasse assisté par micro-ondes aboutit aux résultats positifs, il existe encore des aspects à améliorer tel que : la conception du réacteurs pour le prétraitement de la biomasse, la modélisation du prétraitement pour différentes origines de la biomasse, l'exploration d'un fluide caloporteur similaire à un liquide ionique à faible coût, etc.

4.3.3 Ultrasons

Le procédé de prétraitement par ultrasons fait intervenir des ondes sonores à des hautes fréquences allant de 16 KHz à 1 GHz. Ces ondes génèrent des vibrations mécaniques dans les milieux solides, liquides ou gazeux. Les vibrations se traduisent par des ondes de pression et de dépression successives, conduisant à l'apparition d'un phénomène de cavitation dans un milieu liquide (Figure 31) (Kumar et Sharma, 2017). Des bulles apparaissent et leur volume augmente et diminue en fonction de la dilatation et la compression du milieu. L'implosion de ces bulles à proximité du substrat génère des jets de liquide ultra rapide à sa surface, conduisant à une augmentation importante de la pression et de la température à son voisinage. Ce qui entraine la perturbation de la structure du substrat. La formation des bulles dépendent fortement de la fréquence de l'énergie ultrasonore (Bhutto et al., 2017). Parmi les altérations de structure engendrées suite à ce traitement, la rupture des liaisons α-O-4 et β-O-4 au sein de la lignine, qui ont été rapportées par Shirkavand et al. (2016). Les effets maximaux de la cavitation se produisent à 50 °C, ce qui coïncide avec la température optimale de beaucoup d'enzymes. D'après Chen et al. (2017), l'introduction des ultrasons dans le traitement enzymatique pourra améliorer significativement le transport des enzymes vers la surface du substrat par les effets de cavitation, entrainant une forte activité enzymatique au cours de l'hydrolyse.

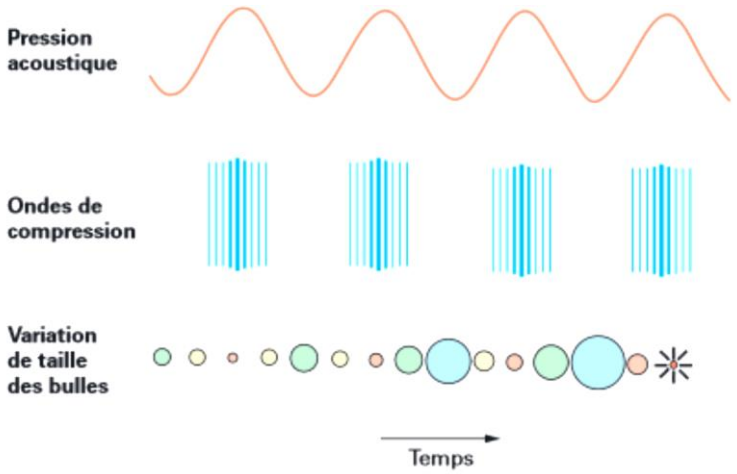


Figure 31 : Schéma du phénomène de cavitation provoqué par les ultrasons (Vinatoru, 2001)

Le prétraitement de la matière lignocellulosique par ultrasons nécessite la sélection d'un certain nombres de paramètres pour optimiser l'efficacité et la fiabilité de l'opération comme ; le mode ultrasonique (continu ou par pulsation), la fréquence, la puissance, la durée et la conception géométrique des réacteurs en vue de déterminer le niveau et la distribution de l'intensité énergétique dans le système (Bhutto et al., 2017; Kumar et Sharma, 2017). Le prétraitement aux ultrasons combiné à 10% d'ammoniaque en solution aqueuse, de la bagasse de canne à sucre appliqué par Ramadoss et Muthukumar (2014), dans des conditions établies (temps de sonication de 45 min, puissance de 400 W, amplitude de 100%, fréquence de 24 kHz et température de 80 °C) a permis la récupération de 95,78% de cellulose avec une délignification de 58,14%. Ces résultats rejoignent ceux obtenus lors de travaux menés par Xu et al. (2017) sur le prétraitement combiné à l'ammoniaque aqueux des rafles de maïs, tiges de maïs et tige de sorgho à une puissance de 90 W et une fréquence de 50 kHz.

4.3.4 Liquides ioniques

Les liquides ioniques sont considérés comme de nouveaux solvants cellulosiques appelés « solvants verts » car ils ne génèrent pas de gaz toxiques ou explosifs. Ce type de solvant est composé de sels organiques qui existent à l'état liquide à des faibles températures, et se représentent sous forme de grands cations organiques et petits anions inorganiques (Bajpai, 2016; Gupta et Tuohy, 2014). Les liquides ioniques ne sont pas volatils, ils ont une bonne stabilité chimique dans un large intervalle de températures, allant de la température ambiante à 300 °C (Chen et al., 2017). De plus en plus de travaux font référence à l'utilisation de ces liquides dans le domaine du prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Zhao et al., 2016). Le prétraitement avec certains liquides ioniques engendre des modifications structurales et chimiques augmentant la digestibilité de la biomasse lignocellulosique par des enzymes (Torr et al., 2016). Les liquides ioniques très basique tel que les chlorides, les phosphates et les carboxylates sont reconnus comme excellents solvants pour la dissolution de la cellulose (Bhutto et al., 2017; Pinkert et al., 2009). La Figure 32 montre une représentation schématique du mécanisme de dissolution de la cellulose en utilisant [C4mim]Cl (1-n-butyl-3-méthylimidazolium).

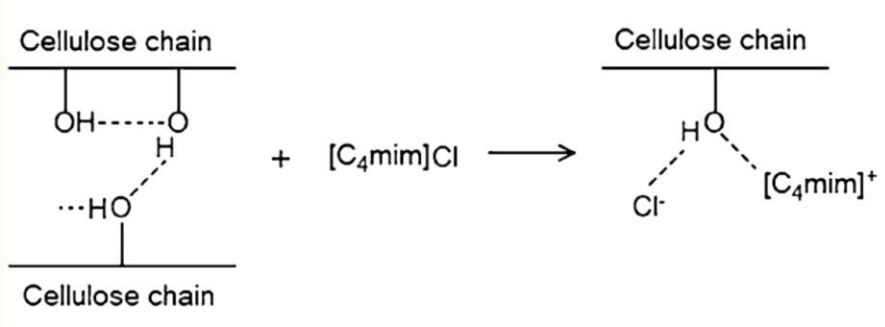


Figure 32 : Mécanisme possible de la dissolution de la cellulose dans le liquide ionique [C4mim] Cl (Feng and Chen, 2008)

L'activité anionique permet la dissolution simultanée des polysaccharides et de la lignine, par conséquent, le réseau lignocellulosique est déstructuré sans génération de composé inhibiteurs (Chen et al., 2017). Le prétraitement des tiges de maïs (Li et al., 2011) et de la plante *swichgrass* (Li et al., 2010) en mélange avec le liquide ionique [C2mim][OAc] à haute température ont permis d'atteindre 90 et 80% en moyenne de rendement en sucres fermentescibles, respectivement. Les liquides ioniques sont recyclables dans le procédé, néanmoins leurs coûts restent très élevés. Aussi, les fractions résiduelles dans le substrat peuvent avoir un effet toxique pour la croissance de la levure pendant la fermentation (Chen et al., 2017).

4.3.5 Fluides supercritiques

Le prétraitement par fluides supercritiques est basé sur l'utilisation de fluide se trouvant à température et pression au-dessus de leur point critique, ainsi aucune distinction n'existe entre les phases liquide et gazeuse. Ce type de fluide se caractérise par une densité identique à celle des liquides et une diffusivité et compressibilité proche de celle des gaz. Ainsi, les fluides supercritiques ont la capacité de pénétrer au sein de la structure cristalline de la biomasse lignocellulosique et surmonter les limitations de transfert de masse rencontrées dans les autres prétraitements (Brodeur et al., 2011). Le dioxyde de carbone est le fluide supercritique le plus utilisé en raison de ses nombreuses caractéristiques ; non toxiques, recyclables, peu couteux et à faible impact environnemental. Sa température et pression critiques sont modérées (31,1 °C et 7,36 MPa,) et il est facilement disponible comme sous-produit de nombreux procédés industriels (Alonso, 2018; Daza Serna et al., 2016). De nombreux paramètres opératoires influencent l'efficacité du prétraitement par explosion de CO_2 supercritique, parmi lesquels la température, la pression, l'humidité, le temps de traitement, le ratio matière sèche/CO_2 et le gradient de pression (Gu et al., 2013). Selon les travaux de Narayanaswamy et al. (2011), l'eau contenue dans la biomasse lignocellulosique combiné au dioxyde de carbone supercritique génère un mélange d'acides carboniques créant un environnement acidique faible qui favorise l'hydrolyse des hémicelluloses et intensifie les phénomènes de transfert de masse. Le dioxyde de carbone sous pression est capable de pénétrer les micropores de la biomasse, et lors de la libération de la pression il éclate les pores et augmente ainsi la surface spécifique cellulosique. Des images obtenues par microscopie électronique à balayage ont mis en évidence cet effet (Narayanaswamy et al., 2011). LÜ et al., (2013) ont montré que le mélange de l'eau avec d'autres solvants, tel que l'éthanol permet d'améliorer la capacité de délignification et de

solubilisation des hémicelluloses de la matrice lignocellulosique de la tige de maïs, par conséquent le rendement en sucres récupérés par hydrolyse enzymatique peut être augmenté. Cependant, le coût élevé du réacteur pouvant tolérer de haut niveau de pression représente un obstacle pour l'application de ce type de prétraitement à grande échelle (Agbor et al., 2011).

4.4 Hydrolyse enzymatique du substrat prétraité

L'hydrolyse enzymatique est une étape primordiale dans le procédé de bioconversion de la biomasse lignocellulosique en vue de l'obtention de sucres fermentescibles en éthanol. En effet, les prétraitements décrits précédemment permettent l'hydrolyse des hémicelluloses et la solubilisation partielle ou totale de la lignine, accompagnée d'une importante déstructuration de la biomasse, mais ils ne permettent dans certains cas qu'une hydrolyse partielle de la cellulose. D'où la nécessité de l'étape d'hydrolyse enzymatique pour la bioconversion de la fraction cellulosique. Cette opération exige une action synergétique de plusieurs enzymes « cellulases » qui interviennent dans la dépolymérisation des chaînes de cellulose en monomère de glucose. L'efficacité de ce processus dépend principalement des propriétés chimiques du substrat à hydrolyser.

4.4.1 Les cellulases

Les enzymes cellulases sont produites via des microorganismes par sécrétion, à savoir les bactéries ou les champignons. Le champignon *Trichoderma reesei* a été largement étudié pour sa production potentielle des cellulases (Alvira et al., 2013; Modenbach et Nokes, 2013; Yang et al., 2013). En effet, ce champignon fait l'objet d'une utilisation industrielle grâce à sa capacité de sécrétion de forte concentration de cellulases très actives. Les cellulases sont des enzymes complexes caractérisées par une structure modulaire incluant un domaine catalytique (Catalytic Domain, CD) et un domaine de liaison aux polysaccharides (Carbohydrate Binding Module, CBM) qui permet l'ancrage de la protéine sur le substrat (Figure 33).

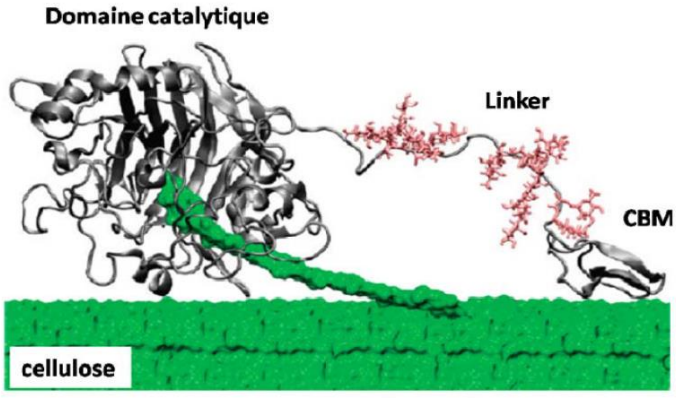


Figure 33 : Représentation schématique de la structure modulaire de l'enzyme exoglucanase (Beckham et al., 2010)

Les cellulases sont classées selon leur mode d'action catalytique en trois catégories : les endoglucanases (EG, 1,4-β-D-glucane glucanohydrolase; EC 3.2.1.4), les cellobiohydrolases,

appelées aussi exoglucanase (CBH, 1,4-β-D-glucane cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) et les β-glucosidases (dites aussi cellobiase ou β-D-glucoside glucohydrolase, BGL; EC 3.2.1.21) (Aro et al., 2005). Les liaisons entre les cellulases et le substrat lignocellulosique s'effectuent par le phénomène d'adsorption. Pierre et al. (2011b) ont déterminé les isothermes d'adsorption des cellulases lors de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé prétraitée par DIC. Ces travaux ont montré que l'adsorption des enzymes semble suivre le modèle de Langmuir, comme décrit dans l'équation suivante :

$$EB = (\frac{E_{max}K_{ad}E_F S}{1+K_{ad}E_F}) \quad \text{Eq. 9}$$

Où : E_B est la concentration des enzymes liés, E_F est la concentration des enzymes libres, S est la concentration du substrat, E_{max} est l'adsorption maximale des enzymes (g enzyme/g substrat) et K_{ad} est le coefficient d'adsorption.

A partir de l'isotherme d'adsorption des cellulases de la paille native et traitée par DIC (Figure 34), les auteurs ont montré que la paille native nécessite une concentration en enzyme supérieure à 40 g/L pour atteindre la capacité maximale d'adsorption, contrairement au substrat prétraité, où une concentration de 10 g/L d'enzyme est suffisante pour atteindre la capacité maximale de 0,07 g de protéines/g de paille. Le prétraitement a donc favorisé l'adsorption des enzymes en comparaison avec le substrat natif. Le coefficient d'adsorption (K_{ad}) a été divisé par environ 6 par rapport à celui de la paille témoin. Pierre et al. (2011b) ont également indiqué que l'expansion de la matière lors de la détente contribue à l'augmentation de sa surface d'échange en favorisant l'action des cellulases.

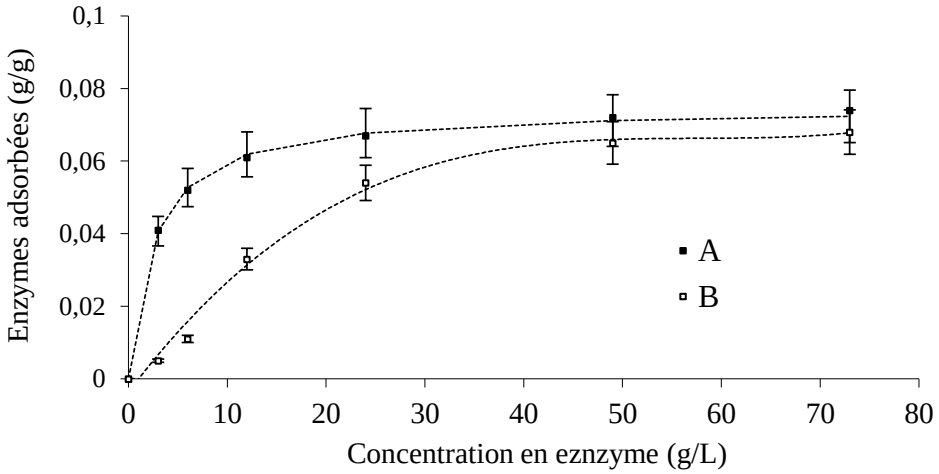


Figure 34 : Isothermes d'adsorption d'enzyme de la paille prétraitée à 7 bars/15 min (A) et native (B) (Pierre et al., 2011).

4.4.2 Mode d'action des cellulases

L'hydrolyse enzymatique est déclenchée lors de la mise en contact du substrat prétraité avec la solution enzymatique. Les conditions optimales pour le déroulement de ce processus sont ; une température de 40 à 50 °C, un pH entre 4,5 et 5 et une agitation pour assurer l'homogénéité de la suspension. Le temps d'action est fonction de la quantité d'enzymes ajoutée, leur activité et la concentration du substrat (Chauve, 2011). Les trois hydrolases agissent en synergie lors de l'hydrolyse de la cellulose. Cette synergie se résume de la manière suivante : les endoglucanases attaquent les régions amorphes de la cellulose, créant ainsi de nouvelles extrémités. Les exoglucanases qui agissent de façon processive à partir des extrémités des chaînes de cellulose se divisent en cellobiohydrolases (CBHs) qui libèrent des molécules de cellobiose, et en glucanohydrolases qui libèrent du glucose. Enfin, les β-glucosidases viennent clôturer l'hydrolyse en formant du glucose à partir de la cellobiose (Figure 35). Il a été rapporté que les cellulases présentent une cinétique non linéaire avec le temps et avec la quantité d'enzyme, et que leur mode d'action se déroule d'une manière processive (Gupta et Tuohy, 2014). Cependant, l'efficacité de ce mélange est limitée par le manque d'activité de la β-glucosidase, cette enzyme ne représentant qu'un faible pourcentage du mélange enzymatique. Cette limitation peut être levée en utilisant soit une souche génétiquement modifiée de la souche *Trichoderma reesei* qui suréxprime la β-glucosidase ou bien en supplémentant le mélange enzymatique avec de la β-glucosidase sécrétée par un autre microorganisme tel que la souche d'Aspergillus (Chauve, 2011; Gupta et Tuohy, 2014).

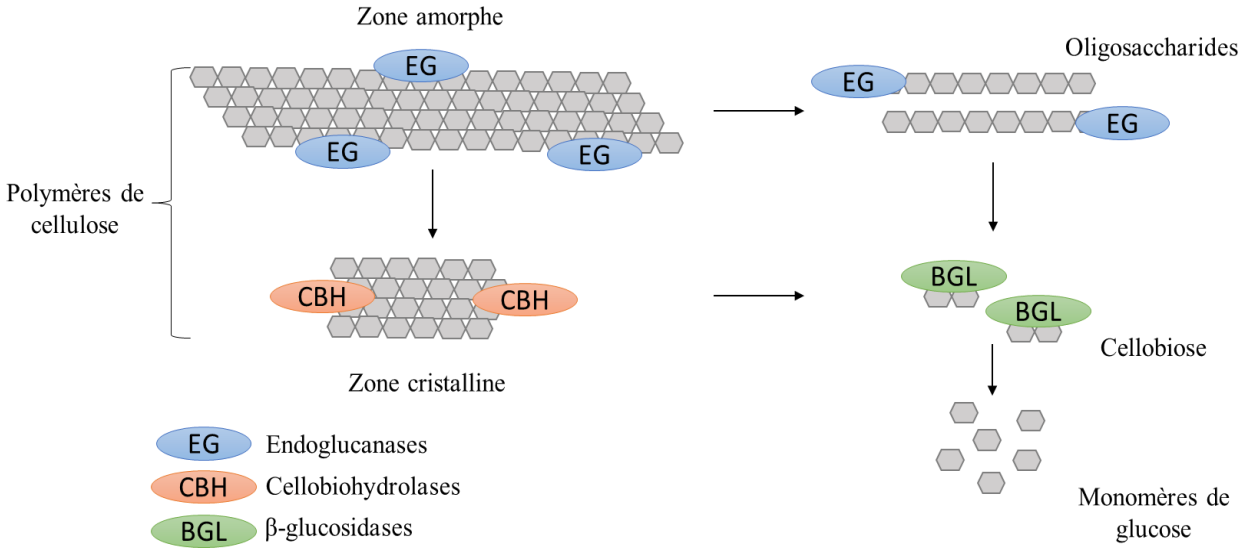


Figure 35 : Mécanisme de l'action des cellulases

4.4.3 Paramètres influençant l'activité des cellulases

Les principaux paramètres influençant l'activité enzymatique sont la température et le pH. Le chauffage du milieu enzymatique au-delà des températures physiologiques des enzymes affecte les performances des enzymes et peut entraîner une perte de leur activité catalytique. Les enzymes endoglucanases et exoglucanases sont stables à une température de 50 °C alors que les β-glucosidases restent stables jusqu'à une température de 60 °C. Le pH optimal de l'activité

des cellulases est compris entre 4 et 5 (Chauve, 2011). Les produits de l'hydrolyse enzymatique sont sous forme d'oligomères, qui se convertissent en glucose par la suite. Il a été démontré que la cellobiose et le glucose peuvent avoir un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique (Belmokhtar, 2012; Sun et Cheng, 2002). Le ratio substrat/enzyme a été aussi rapporté comme étant un facteur influençant l'hydrolyse enzymatique (Sun et Cheng, 2002).

4.5 Fermentation alcoolique en éthanol

Le substrat obtenu après hydrolyse enzymatique « hydrolysat », riche en pentoses et en hexoses, est fermentescible en éthanol. Ce processus peut être mené via plusieurs microorganismes, qui se reproduisent en libérant de l'énergie et de l'éthanol comme sous-produit de la réaction. La croissance de ces microorganismes est alors corrélée avec la production en éthanol (Jin et Jeffries, 2004). La réaction de fermentation éthanolique du glucose établit par Gay Lussac est exprimé par l'équation suivante :

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad \text{Eq. 10}$$

Le rendement de Gay Lussac, calculé de manière stœchiométrique (rendement théorique), est de 51,1 g d'éthanol pour 100 g de glucose. Cependant, cette équation ne prend pas en considération les sucres impliqués lors de la croissance des microorganismes ou convertis en d'autres sous-produits. En prenant en compte ces éléments, Louis Pasteur a déterminé un rendement théorique maximal de la fermentation éthanolique de 48,4 g d'éthanol pour 100 g de glucose (Ballerini, 2011).

La fermentation passe par trois phases principales : une première phase de latence durant laquelle les microorganismes s'adaptent à leur milieu, une deuxième phase exponentielle traduisant la multiplication des cellules jusqu'à atteindre un maximum. Une troisième phase stationnaire qui commence lors de l'épuisement des nutriments dans le milieu de fermentation (Figure 36).

Ce processus exige certaines conditions tel que l'apport en sources carbonées et azotées dans le milieu de fermentation, ainsi que l'application d'une micro-aération indispensable à la fermentation des hexoses. Les microorganismes peuvent subir un stress si le milieu de fermentation présente des conditions de températures ou de pH non adaptées ou s'il y a présence d'oxygène ou de composés inhibiteurs de la fermentation. Une forte concentration en sucres et en éthanol ont été rapportée comme ayant également des effets inhibiteurs par Bai et al. (2008, 2004). L'impact de ces facteurs dépend du type de microorganismes.

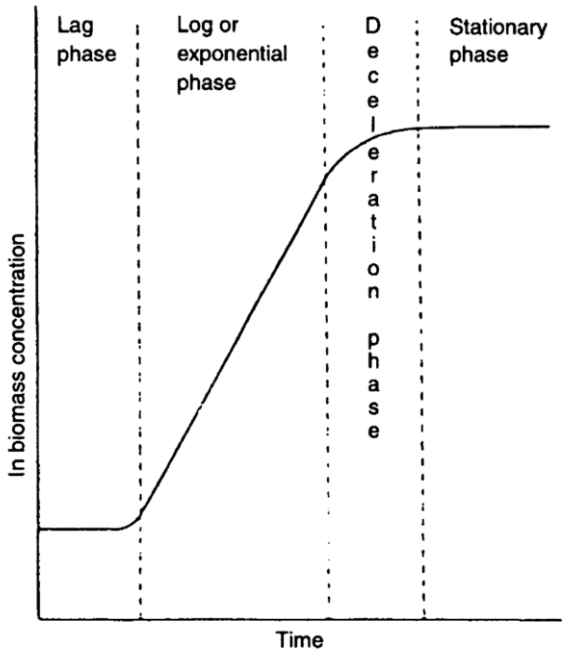


Figure 36 : Croissance typique des microorganismes lors de la fermentation (Stanbury et al., 1995)

Plusieurs organismes sont susceptibles de convertir les sucres en éthanol. Le *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger) est l'organisme de fermentation d'alcool le plus utilisé, capable de convertir les sucres hexoses en éthanol (Aditiya et al., 2016; Chen et Fu, 2016; Zabed et al., 2016). Les conditions optimales d'exploitation de ce microorganisme, utilisé dans le cadre de ce travail de thèse ; sont une température de 30-35 °C et un minimum de pH de 3,5 (Bai et al., 2008). Il est à noter qu'un pH supérieur à 5 contribue à diminuer la phase de latence et d'assurer un développement optimal de la levure (Albers et Larsson, 2009), surtout lorsque le milieu de fermentation contient des espèces inhibitrices. L'intérêt à l'utilisation de *saccharomyces cerevisiae* repose sur ses caractéristiques avantageuses pour le procédé de fermentation. En effet, cette souche présente des tolérances aux fortes concentrations en éthanol, sucres et ions (Bai et al., 2008; Lin et Tanaka, 2006). De plus, elle peut être recycler pour une nouvelle fermentation, après filtration et centrifugation (Ballerini, 2011).

Par-ailleurs, les problèmes de fermentation des sucres pentoses et la présence de composés toxiques pose des limitations pour la production de l'éthanol à partir de la matière lignocellulosique (Ballerini, 2011). En effet, le procédé de bioconversion de la biomasse est susceptible de générer des sous-produits, dont la majeure partie a un effet inhibiteur à la fermentation (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000). On distingue principalement trois catégories d'inhibiteurs (Figure 37) : les acides organiques, les furanes et les composés phénoliques. L'inhibition peut se traduire par un rallongement de la durée de la phase de latence et une conversion des sucres en éthanol plus faible, voire impossible.

Les acides acétiques, libérés après hydrolyse de la fraction hémicellulosique au cours du prétraitement, sont des acides faibles connus pour limiter le développement des microorganismes. Les acides formique et lévulinique proviennent de la dégradation des furanes

furfural et HMF, respectivement, eux même provenant de la dégradation des sucres. A concentration égale, le HMF est plus inhibiteur que le furfural (Larsson et al., 1999). L'inhibition a lieu quand les ions H^+ pénètrent au sein du microorganisme, ce dernier ayant un pH neutre, utilise de l'énergie pour évacuer les ions H^+ et garder son pH neutre. D'autre part, les cations restants dans les cellules peuvent avoir un effet toxique sur la levure (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000). Les furanes, possédant des groupement aldéhydes, sont aussi néfastes pour les microorganismes. Leur présence engendre des réactions concurrentes à la fermentation alcoolique, entraînant une phase de latence plus longue, mobilisant une partie des ressources des levures et provoquant donc une diminution de la productivité en éthanol (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000).

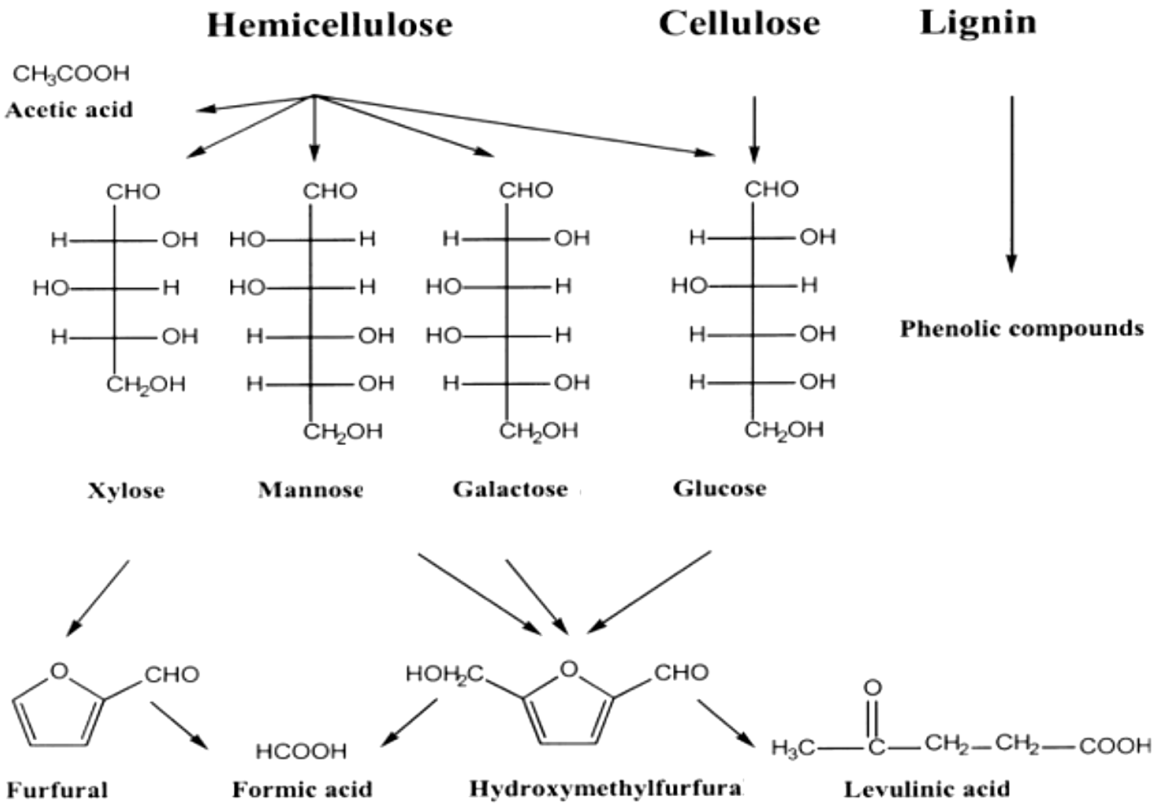


Figure 37 : Génération de composés inhibiteurs (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

Les composés phénoliques proviennent de la dégradation de la lignine. Le mécanisme de leur effet inhibiteur est encore mal connu. Il existe plusieurs composés phénoliques possibles. L'effet inhibiteur relatif aux groupements fonctionnels de quelques composés phénoliques a été évalué par Luo et al. (2002), où les groupes suivants ont été classés du plus au moins inhibiteur : CH=CH, CHO, OH, COOH et OCH_3. Il a été rapporté par Palmqvist et Hahn-Hägerdal (2000) que seuls quatre composés ont une réelle influence sur le rendement en éthanol, notamment, l'o-vanilline, p-benzoquinone, l'acide cinnamique et l'acide 3,4-dimethoxycinnamique.

Dans le cas où de fortes concentrations en inhibiteurs sont présentes dans l'hydrolysat ou le microorganisme utilisé présente une faible tolérance aux inhibiteurs, des procédés de détoxification de l'hydrolysat sont recommandé (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000). Parmi

ces procédés, nous citons les procédés alcalins (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000), les résines échangeuses d'anions (Chandel et al., 2007) ou le procédé au charbon actif (Huang et al., 2008). Ces procédés doivent éliminer les composés inhibiteurs de manière sélective, avoir un faible coût économique et s'intégrer facilement dans le procédé de fermentation (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000). L'ingénierie de la génétique est un autre moyen pour pallier aux problèmes d'inhibitions et éviter l'étape de détoxification. Des études ont démontré une meilleurs aptitude à la fermentation en présence de composés phénoliques et furanes des souches hypertolérantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Almeida et al., 2009; Wu et al., 2017).

4.6 Distillation

La liqueur fermentée de l'hydrolysat contient généralement des concentrations relativement faibles en éthanol et donc des quantités relativement élevées en eau (Aditiya et al., 2016). Pour obtenir un produit similaire au carburant, les niveaux de concentration en éthanol doivent augmenter à hauteur de 99%. Dans l'industrie chimique, la distillation est l'opération de séparation la plus communément utilisée pour les mélanges de liquides miscibles. La distillation conventionnelle repose sur la séparation des constituants du mélange en se basant sur la différence de leurs volatilités relatives ou de leurs températures d'ébullitions. En bioraffinerie, l'éthanol est préconcentré jusqu'à 92,4% par distillation conventionnelle. Une seconde distillation dite azéotropique est indispensable pour obtenir de l'éthanol anhydre (Gavahian et al., 2016; Kumar et al., 2010). Le système de distillation azéotropique est représenté dans la Figure 38.

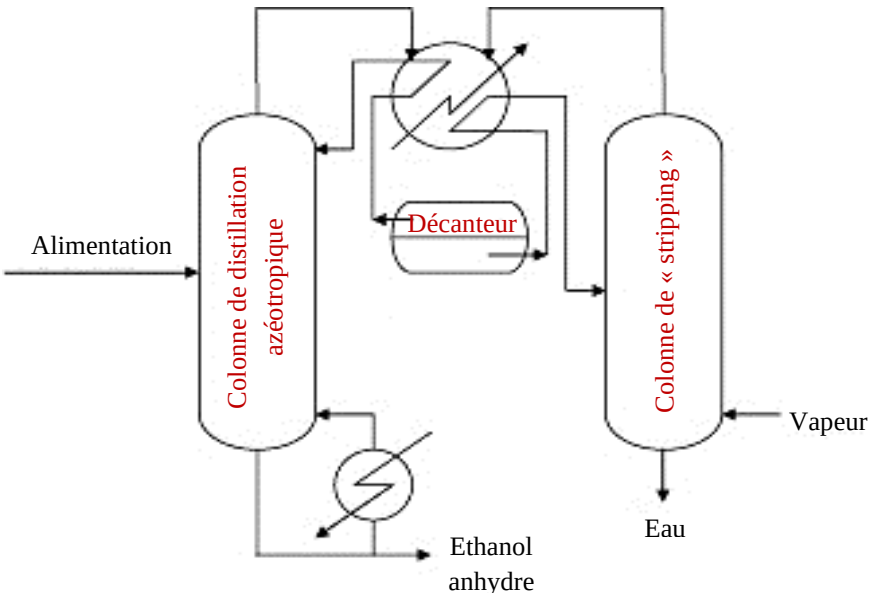


Figure 38 : Schéma du procédé de distillation azéotropique (Kumar et al., 2010)

La distillation azéotropique consiste à introduire un solvant dit « entraineur » qui va former un azéotrope ternaire avec le mélange eau-éthanol, en modifiant leur volatilité relative ainsi que

leur facteur de séparation. Le système de distillation azéotropique est composé de deux colonnes :

- Colonne azéotropique qui fournit de l'éthanol à haute concentration (~99%) en présence du solvant,
- Colonne de « stripping » qui récupère le solvant de la phase aqueuse en le recyclant vers la première colonne.

La première colonne fournit de l'éthanol anhydre à hauteur de 99%. Le distillat contient un mélange d'eau, d'éthanol et de solvant qui est divisé en deux phases par décantation. La phase contenant l'éthanol est renvoyée à la colonne de distillation azéotropique, la phase aqueuse subit une nouvelle distillation afin de séparer l'eau du solvant. Parmi ces solvants, le cyclohexane a été utilisé par Gomis et al. (2005) et privilégié dans ce procédé.

Ce procédé reste très couteux en termes de consommation énergétique et présente l'inconvénient d'utiliser des solvants dangereux (Ballerini, 2011). D'autres technologies se développent progressivement tel que la séparation sur tamis moléculaire (Ballerini, 2011). Il s'agit d'un tamis composé de zéolites, dont les pores ont un diamètre nominal de 0,30 nm. Les molécules d'éthanol (approximativement 0,44 nm de diamètre) sont retenues par ce tamis, alors que les molécules d'eau (0,28 nm de diamètre), plus petites, peuvent pénétrer les pores. Cette technologie présente un bon bilan énergétique (Huang et al., 2008).

5. VALORISATION DU BIOETHANOL EN HYDROGENE

Une voie de valorisation de l'éthanol produit par bioconversion est la production de l'hydrogène, celui-ci étant principalement produit par l'industrie pétrolière. Le stockage de l'hydrogène en piles à combustible permet de fournir de l'électricité et de la chaleur. De plus, du fait de sa combustion non polluante, la production de l'hydrogène à partir du bioéthanol représente une nouvelle voie de développement d'énergie durable et respectueuse à l'environnement (Haryanto et al., 2005) .

Le procédé le plus étudié pour la conversion de l'éthanol en hydrogène est le reformage catalytique en raison de sa haute production en hydrogène et de son efficacité énergétique. Ce procédé s'opère en présence de vapeur d'eau et à haute température (500-800 °C) en raison de l'endo-thermicité de la réaction. L'utilisation de catalyseurs métalliques joue un rôle crucial dans la production d'hydrogène par reformage d'éthanol (Cormos, 2014; Hou et al., 2015). Les métaux Rh et Ni représentent les catalyseurs les plus couramment utilisés. En présence d'eau, l'équation générale de vaporeformage de l'éthanol s'écrit :

$$C_2H_5OH + 3H_2O \rightarrow 2CO_2 + 6H_2 \quad (\Delta H_r° = 157\ kJ.mol^{-1}) \qquad \text{Eq. 11}$$

La réaction ci-dessus est accompagnée par plusieurs réactions qui coexistent à l'équilibre. Les principaux produits qui en découlent sont H_2, CO_2 et CO. D'autres réactions sont aussi mises en jeu et produisent des composants mineurs tel que le méthane, l'acétaldéhyde et l'éthylène. Ce dernier est considéré comme l'un des plus grands précurseurs de cokes qui donnent lieu aux

dépôts carbonés. Ceux-ci sont à l'origine de la désactivation du catalyseur et du bouchage des réacteurs industriels du vaporeformage. Les travaux de Toyir et al. (2010) ont montré l'efficacité du catalyseur de type $Ir/Ce_{0.9}Gd_{0.1}O_{2-x}$ en termes d'activité catalytique, de stabilité et de résistance à la déposition des composés carbonés. Le choix des conditions opératoires, du type de catalyseur et de la méthode de sa préparation contribuent à la minimisation de la présence des réactions secondaires et ainsi à l'amélioration de la conversion du bioéthanol en hydrogène.

6. CONCLUSION

Les préoccupations actuelles à l'égard des problématiques énergétiques et environnementales constituent de véritables raisons pour la recherche de solutions alternatives. La production du bioéthanol à partir de la biomasse lignocellulosique représente une nouvelle voie de développement de sources énergétiques à la fois durables et respectueuses de l'environnement. La biomasse lignocellulosique représente une matière intéressante dans le cadre du procédé de bioconversion en raison de sa disponibilité et de son faible coût. Composée principalement de cellulose, hémicelluloses et lignine, cette matière est caractérisée par une structure complexe faisant intervenir divers types de liaisons (hydrogène, éther et ester, etc). Cette nature récalcitrante de la biomasse lignocellulosique représente une barrière à sa bioconversion pendant l'hydrolyse enzymatique. Il y a donc une nécessité majeure à recourir à une étape initiale de prétraitement, permettant d'agir sur la matière lignocellulosique et ainsi exposer de manière efficace les polymères cellulosiques. La modification structurale du substrat, notamment par hydrolyse des hémicelluloses et la lignine, favorise l'accessibilité des enzymes pendant l'hydrolyse enzymatique et améliore ainsi le taux de récupération des sucres fermentescibles en éthanol.

La chènevotte, co-produit de l'exploitation du chanvre industriel, et l'alfa, plante endémique et largement disponible dans la région orientale du Maroc, représentent deux sources naturelles potentielles choisies dans le cadre de ce travail de thèse. L'étude bibliographique a permis de recenser les connaissances sur les caractéristiques et la composition biochimiques de ces deux substrats lignocellulosiques. Ainsi, nous avons choisi de mener un travail de caractérisation plus avancé sur ces des deux matières.

Ensuite, les procédés de prétraitement ont été détaillés et répartis en deux catégories : les procédés conventionnels et les procédés émergents. Les réactions mises en jeu lors du prétraitement dépendent principalement des conditions opératoires mais aussi de la nature de l'agent chimique ajouté. Nous avons choisi de mettre l'accent au cours de nos travaux de thèse sur l'étude du procédé de prétraitement innovant « DIC », combiné à un réactif chimique. Aucune donnée n'a été publiée auparavant sur l'application de ce type de procédé sur les deux substrats lignocellulosiques choisis. Nous nous sommes intéressés à étudier l'effet de l'ajout de l'acide sulfurique en tant que catalyseur de la réaction d'hydrolyse des hémicelluloses, et de l'hydroxyde de sodium comme agent chimique pour la dégradation de la lignine. Aussi, les performances de deux techniques d'imprégnation à savoir l'immersion et l'aspersion, des deux réactifs chimiques ont été étudiées et comparées sur les deux matières lignocellulosiques.

L’état de l’art sur l’hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique a permis de comprendre les différents mécanismes et paramètres gouvernant ces deux processus en vue de l’obtention de l’éthanol. Le procédé de distillation est toujours associé au procédé de bioconversion de l’éthanol cellulosique afin d’obtenir un produit à haute concentration et à l’état anhydre, notamment par distillation azéotropique.

Dans ce contexte, le travail de thèse s’est articulé sur les points suivants :

- Caractérisation physicochimique des deux matières lignocellulosiques et détermination de leur potentiel en polysaccharides.
- Prétraitement et caractérisation structurale et chimique des deux matières prétraitées.
- Hydrolyse enzymatique du substrat prétraité et étude de l’amélioration de la récupération des sucres réducteurs par optimisation des conditions opératoires du prétraitement et de l’opération d’hydrolyse enzymatique.
- Essais de fermentation de l’hydrolysat obtenu.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Table des matières

1. MATIERES PREMIERES LIGNOCELLULOSIQUES 68
1.1 Origine 68
1.2 Conditionnement 68
2. REACTIFS 68
3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE CARACTERISATION DU SUBSTRAT 69
3.1 Analyse de la composition chimique 69
3.1.1 Détermination de la matière sèche/teneur en eau 69
3.1.2 Détermination de la matière organique et minérale 69
3.1.3 Détermination de la composition biochimique : cellulose, hémicelluloses et lignine 70
3.2 Analyse du pH 74
3.3 Détermination de la capacité d'absorption d'eau 76
4. METHODES D'ANALYSE DE LA STRUCTURE 76
4.1 Caractérisation par approche microscopique 76
4.1.1 Observation par stéréomicroscopie 76
4.1.2 Observation par microscopie électronique à balayage 76
4.2 Caractérisation de la structure 77
4.2.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier 77
4.2.2 Diffraction par rayons X 78
4.2.3 Surface spécifique A_{BET} : Méthode Brunauer-Emmet-Teller 80
5. ANALYSE STATISTIQUE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES . 81
5.1 Principe de base 82
5.2 Modélisation mathématique 84
5.3 Choix du plan centré composite 84
5.3.1 Les plans factoriels complets 84
5.3.2 Les plans réduits - Plan centré composite 85
6. METHODE DE PRETRAITEMENT COMBINE DE LA MATIERE PREMIERE 85
6.1 Imprégnation du catalyseur chimique 86
6.1.1 Aspersion 86
6.1.2 Immersion 87
6.2 Traitement thermomécanique par le procédé DIC « Détente Instantanée Contrôlée » 87
6.2.1 Principe du traitement thermomécanique 87
6.2.2 Principales étapes du traitement thermomécanique 87
6.2.3 Description de l'installation DIC 89
6.2.4 Protocole de prétraitement thermomécanique appliqué 89
6.2.5 Etude de l'effet de la présence des étapes de mise sous vide 90
6.2.6 Etude de l'effet du nombre de détentes 91
6.3 Conditions du plan d'expériences 92
6.4 Calcul de l'indice de sévérité : 93
6.5 Calcul de la charge en catalyseur chimique 94
7. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA MATIERE PRETRAITEE 94

7.1 Préparation des réactifs 94
7.1.1 Tampon citrate-phosphate 94
7.1.2 Réactifs DNS (dinitrosalicylique) 94
7.2 Les enzymes 94
7.3 Protocole de l'hydrolyse enzymatique 95
7.4 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS 95
7.5 Analyse de l'hydrolysat par Chromatographie Liquide à Haute Performance 96
7.5.1 Principe 96
7.5.2 Dispositif expérimental 96
7.6 Calcul du rendement global en sucres réducteurs 98
7.7 Calcul du rendement de conversion cellulosique 98
8. FERMENTATION DES HYDROLYSATS 98
8.1 Conditionnement de l'hydrolysat avant fermentation 98
8.1.1 Ajustement du pH 98
8.1.2 Concentration des sucres 98
8.2 Protocole de fermentation 99
8.3 Analyse du taux de croissance des cellules de levure 99
8.4 Dosage de l'éthanol 99
8.5 Calcul du rendement en éthanol 99
9. SCHEMA GLOBAL DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE DU PROCEDE DE BIOCONVERSION ETUDIE 100

Liste des figures

Figure 39 : Broyeur à couteaux Retsch Grindomix GM 200 68

Figure 40 : Tamiseuse à vibration Fritsch Analysette 3 pro..... 68

Figure 41 : Schéma du principe du dosage des constituants pariétaux des fibres par la méthode Van Soest (Van Soest, 1963)..... 71

Figure 42 : pH mètre 74

Figure 43 : Schéma du protocole expérimental de la méthode NREL (Sluiter et al., 2012)... 75

Figure 44 : Loupe binoculaire Leica M165C 76

Figure 45 : Spectrophotomètre Thermo Scientific Nicolet iS5..... 78

Figure 46 : Illustration de la loi de Bragg. 79

Figure 47: Photo du diffractomètre aux rayons X (Karlsruhe, Allemagne). 79

Figure 48 : Schéma de l'appareil de mesure BET (ASAP 2020)..... 81

Figure 49 : Définition du domaine de variation d'un facteur, du domaine d'étude et le point expérimental 83

Figure 50 : Représentation de la surface de réponse 83

Figure 51 : Représentation d'un système d'étude 84

Figure 52 : Exemple d'un plan central composite à trois facteurs 85

Figure 53 : Imprégnation du catalyseur chimique par aspersion..... 86

Figure 54 : : Imprégnation du catalyseur par immersion 87

Figure 55 : Principales étapes du traitement thermomécanique..... 88

Figure 56 *:* Schéma et photo du dispositif expérimental utilisé pour le traitement thermomécanique 90

Figure 57 : Schéma de principe des traitements hydrothermique DV-HMT, RP-HMT et DIC. 91

Figure 58 : Solution DNS..... 94

Figure 59 : Réacteur Radleys 95

Figure 60 : Droite d'étalonnage pour le dosage spectrophotométrique du glucose 96

Figure 61 : Exemple de chromatogramme d'un mélange de sucres standards..... 97

Figure 62 : Système HPLC..... 97

Figure 63 : Incubateur de fermentation (Ecotron, INFORS HT) 99

Figure 64 : Schéma global de la démarche expérimentale adoptée dans le procédé de bioconversion étudié. 100

1. MATIERES PREMIERES LIGNOCELLULOSIQUES

1.1 Origine

Le chanvre industriel a été fourni par une ferme locale, située en région Poitou-charentes, sous forme d'amas de fibres et de copeaux de bois, ce dernier constituant représente la fraction de la chènevotte. Quant à l'alfa, elle a été récoltée et récupérée de la région orientale du Maroc (Guercif, 2015) sous forme de bottes d'environ 1 à 2 kg. La matière première à humidité résiduelle a été conservée dans une salle de stockage à température ambiante avant de subir les étapes de traitements ultérieurs.

1.2 Conditionnement

Une opération de défibrage a été effectuée en vue de séparer les deux fractions fibres et chènevotte. Nous avons récupéré à la fin de cette opération une masse de chènevotte d'environ 10 kg. L'homogénéisation de la taille du lot obtenu a été effectuée par un broyage à l'aide du broyeur à couteaux (Figure 39, Retsch Grindomix (GM 200), suivie d'un tamisage à l'aide d'une tamiseuse à vibration Fritsch Analysette 3 pro (Figure 40). La distribution granulométrique a été déterminée et répartie en trois classes de tailles :

Figure 39 : Broyeur à couteaux Retsch Grindomix GM 200

- Classe A : 0,6-0,8 mm ;
- Classe B : 0,8-1 mm ;
- Classe C : 1-8 mm.

Sur l'alfa brute, la présence de quelques impuretés (traces de terre, tiges mortes…) a nécessité une opération préliminaire d'élimination. La plante a été ensuite séchée à l'étuve pendant 24 h à 40 °C, pour atteindre une humidité résiduelle avant d'être stockée.

L'homogénéisation des échantillons d'alfa a consisté d'abords à un découpage des tiges avec une paire de ciseaux et ensuite à un broyage suivi d'un tamisage avec les équipements présentés précédemment pour atteindre des tailles de particules homogènes.

Figure 40 : Tamiseuse à vibration Fritsch Analysette 3 pro

Nous avons choisi pour l'expérimentation l'intervalle de taille granulométrique de 1 à 8 mm pour les deux matières premières.

2. REACTIFS

Les produits chimiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (France) et l'eau désionisée a été obtenue à l'aide du système Milli-Q (Millipore, France).

3. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DE CARACTERISATION DU SUBSTRAT

3.1 Analyse de la composition chimique

Les protocoles suivants décrivent le principe de la détermination de la teneur en eau, du pourcentage en matière organique et minérale et les composants pariétaux contenus dans les deux matières premières utilisées à savoir la chènevotte et l'alfa.

3.1.1 Détermination de la matière sèche/teneur en eau

La mesure de la teneur en eau contenue dans la biomasse lignocellulosique (BLC) a été effectuée par séchage dans une étuve ventilée. Une masse (m_h) de matière première est pesée dans une coupelle en aluminium de masse m_0, à l'aide d'une balance de précision à 0,0001g. Ensuite, l'ensemble a été mis dans une étuve réglée à la température de 105 ± 2 °C, selon la norme AFNOR NF U44-306 (AFNOR, 2007), pendant 24 h jusqu'à atteindre un poids constant de l'échantillon. Dans un dessicateur contenant du gel de silice, l'ensemble échantillon-coupelle a été tempéré à la température ambiante pour être ensuite pesé (m_f), et la masse sèche (m_s) est ainsi obtenue.

La teneur en matière sèche (MS), exprimée en pourcentage est égale à :

$$\%MS = \left(\frac{m_f - m_0}{m_h}\right) * 100 \qquad \text{Eq. 12}$$

La teneur en eau, noté w, exprimée en pourcentage est égale à :

$$w = \left(\frac{m_h - m_s}{m_s}\right) * 100 \qquad \text{Eq. 13}$$

3.1.2 Détermination de la matière organique et minérale

La teneur en matière organique est déterminée selon la norme AFNOR NF U 44-304 (AFNOR, 2011), par calcination de l'échantillon sec et la fraction restante représente la matière minérale. Le protocole consiste d'abord, à chauffer une coupelle en porcelaine dans le four à moufle pendant 16 h à une température de 550 ± 25 °C, afin d'éliminer toute matière volatile avant l'essai. La coupelle est ensuite pesée après refroidissement dans un dessicateur, sa masse m_0 est notée. L'échantillon est déposé dans la coupelle et la masse de l'ensemble est notée m_1. Ensuite, la coupelle et son contenu sont placés dans le four à moufle, réglé à une température de 450 °C, maintenue constante pendant 6 h. A la fin du cycle de calcination, l'ensemble est récupéré, refroidi et pesé avec une précision de 0,001g. Une masse, notée m_2, est obtenue.

La teneur en matière organique, exprimée en pourcentage en masse de l'échantillon séché, est donnée par l'équation suivante :

$$W_{om} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100 \qquad \text{Eq. 14}$$

La teneur en cendres, exprimée en pourcentage en masse de l'échantillon séché, est donnée par l'équation suivante :

$$W_{ash} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \qquad \text{Eq. 15}$$

3.1.3 Détermination de la composition biochimique : cellulose, hémicelluloses et lignine

Afin de déterminer la composition chimique de la matière première (chènevotte, alfa), en cellulose, hémicelluloses et lignine, nous avons utilisé deux méthodes de fractionnement chimique : la méthode de détergents neutre et acide de Van Soest et la méthode NREL.

- Méthode de Van Soest

La méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest (Van Soest, 1963; Van Soest et al., 1991) utilise une approche quantitative de fractionnement biochimique. Elle est normalisée en France selon le standard AFNOR FD U 44-162 (AFNOR, 2016). La méthode consiste en la séparation des constituants de la biomasse lignocellulosique en fonction de leur solubilité, suite à l'action successive de différents détergents. Cela permet ainsi de doser les quatre fractions de matières organiques, dont la teneur est calculée par perte de masse. Les fractions séparées sont :

1. La fraction équivalent extractibles ; séparée par extraction à l'eau bouillante suivie d'une extraction à chaud par un détergent neutre. Le résidu obtenu, nommé NDF (Neutral Detergent Fiber), contient la majeure partie des parois végétales. Les substances solubilisées contiennent théoriquement des acides organiques, des pectines, des lipides, de l'amidon, des tannins, la majorité des protéines et de l'azote non protéique. La norme précise toutefois que le résidu peut contenir diverses substances (protéines, amidon, tannins) fortement liées aux polymères non solubilisés.
2. La fraction équivalent hémicelluloses ; solubilisée à chaud par un détergent acide après élimination de la fraction qualifiée de soluble dans le détergent neutre. Le résidu obtenu, appelé ADF (Acid Detergent Fiber), contient théoriquement la cellulose et la lignine. La fraction hémicellulosique est calculée par la différence NDF-ADF.
3. La fraction équivalent cellulose ; solubilisée à froid par de l'acide sulfurique concentré après l'élimination des fractions extractibles et des hémicelluloses. Le résidu obtenu, appelé ADL (Acid Detergent Lignin) contient théoriquement la lignine. La fraction cellulose est calculée par la différence ADF- ADL.
4. La fraction équivalent lignine : correspond au résidu ADL de l'extraction par l'acide sulfurique concentré, qui contient théoriquement la lignine, il peut contenir par ailleurs des composés fortement liés à ces polymères comme des composés azotés.

Bien que cette méthode ne fournisse pas d'informations sur la structure des hydrates de carbone, elle sert bien de référence à de nombreux travaux.

Le schéma suivant résume les étapes du processus de fractionnement de la matière lignocellulosique par la méthode de Van Soest.

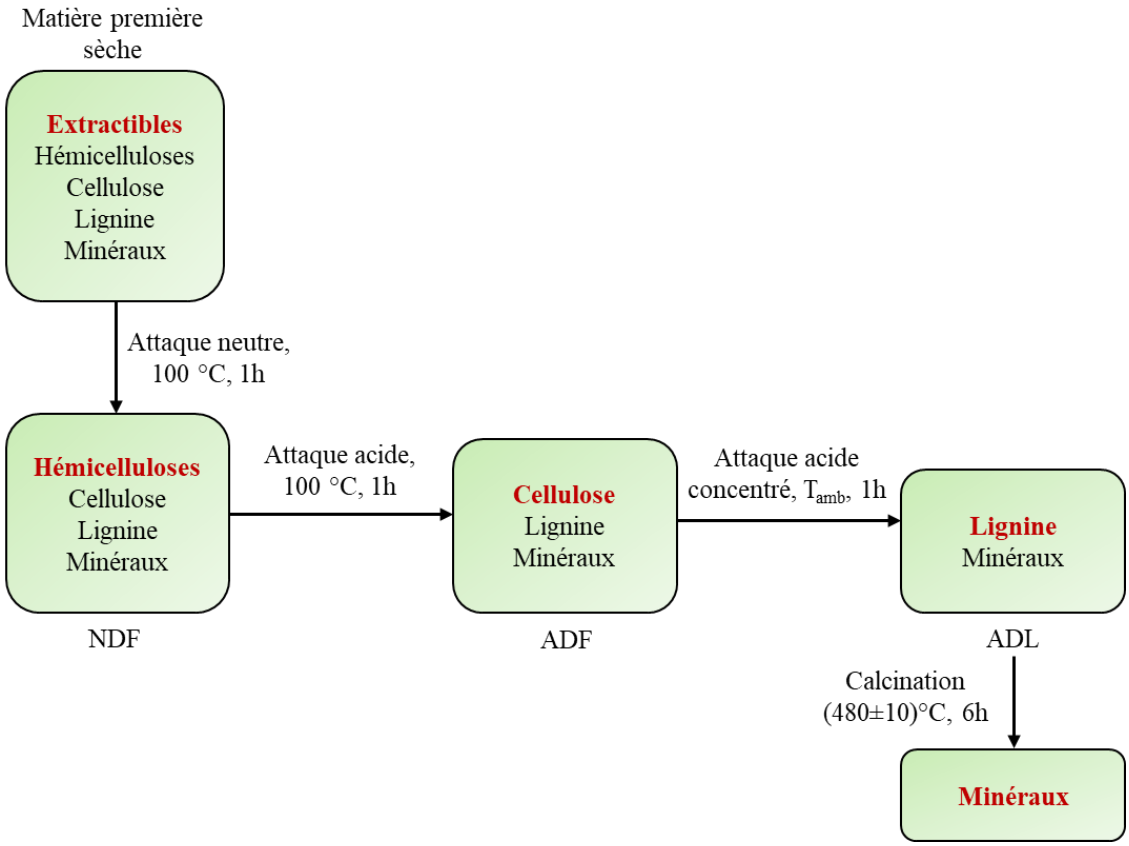


Figure 41 : Schéma du principe du dosage des constituants pariétaux des fibres par la méthode Van Soest (Van Soest, 1963)

i. Préparation des détergents

Les solutions de détergents neutre et acides sont préparées selon les protocoles suivants :

- **Solution de détergent neutre** : cette préparation consiste à peser 30 g de dodecyl sulfate de sodium dans un large bêcher, auquel est ajouté environ 0,4 L d'eau suivie d'une agitation à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à complète dissolution. A la solution est ajoutée 18,61 g d'EDTA-Na, 6,81 g de tétraborate de sodium et 4,56 g d'hydrogénophosphate de sodium, le tout est agité jusqu'à dissolution complète. La solution est ensuite transvasée dans une fiole jaugée en ajoutant 10 mL de triéthylèneglycol, puis ajustée avec 1 L d'eau distillée. Le pH final est situé entre 6,9 et 7,1.
- **Solution de détergent acide** : cette préparation consiste à peser 20 g de hexadecyltriméthylammonium bromure directement dans une fiole jaugée de 1 L. Ensuite, des volumes d'environ 0,8 L d'eau distillée et de 26,7 mL (ou 49,1 g) d'acide sulfurique

concentré sont successivement ajoutés. La solution est agitée à l'aide d'un agitateur jusqu'à dissolution complète, puis complétée avec de l'eau distillée jusqu'à 1 L.

- **Solution d'extraction acide ADL** (H_2SO_4, 72 %) : cette préparation consiste à introduire 440 mL d'eau dans un bêcher de 2L réfrigéré, puis d'ajouter lentement environ 750 mL d'acide sulfurique concentré. Le mélange n'est utilisé que lorsqu'il est revenu à la température ambiante. Enfin, la densité est mesurée et ajustée à d = 1,634 ± 0,005 avec de l'eau ou de l'acide.

ii. Description du protocole

Tout d'abord, trois creusets filtrants et vides à porosité N°2 ont été préparés, notés A, B et C. Les creusets ont été séchés à la température de 103 ± 2 °C, pendant 2 h, puis refroidis dans un dessicateur. Ensuite, les creusets ont été pesés, et leurs masses respectives notées A_0, B_0 et C_0 (±0,1 mg). Dans chacun des trois creusets, une masse de 1 g d'échantillon préalablement préparée (dimension environ 1 mm) a été introduite. Les masses des creusets pleins ont été notées, respectivement, A_1, B_1 et C_1 (±0,1 mg).

– Obtention des composés organiques insolubles dans le détergent neutre (NDF)

Les creusets ont été disposés dans une unité de chauffage à reflux, dans lesquels ont été ajoutés 100 mL d'eau préchauffée avec quelques gouttes d'anti-mousse (Octanol). L'ensemble a été porté à ébullition en moins de 5 min et maintenu pendant 30 min. L'eau a été éliminée par un système de filtration sous vide et le résidu a été lavé cinq fois à l'eau chaude à l'aide d'une pissette. 100 mL de solution de détergent neutre préchauffé ont aussitôt été ajoutés avec quelques gouttes d'anti-mousse, jusqu'à l'ébullition maintenue pendant 1 h. La solution a été éliminée par filtration sous vide et le résidu a été lavé 10 fois à l'eau bouillante, puis trois fois à l'acétone. Le creuset A a été mis de côté pour les opérations ultérieures de séchage et de calcination du résidu d'extraction NDF.

– Obtention des composés organiques insolubles dans le détergent acide (ADF)

Après extraction de la fraction soluble dans le détergent neutre, 100 mL de solution sont ajoutés au détergent acide, préchauffée dans les deux creusets B et C avec quelques gouttes d'anti-mousse. L'ébullition de la solution, atteinte en moins de 5 min, a été maintenue pendant 1 h. La solution a été éliminée par filtration et le résidu a été lavé 10 fois au moins à l'eau bouillante, puis trois fois à l'acétone. Le creuset B a été mis de côté pour les opérations ultérieures de séchage et de calcination.

– Obtention de la lignine sulfurique (ADL)

Le creuset C est placé dans un cristallisoir résistant à l'acide concentré, ensuite une quantité suffisante d'acide sulfurique (72%) est introduite. Le résidu a été maintenu immergé pendant 3 h en rajoutant de l'acide si nécessaire. Le mélange a été remué régulièrement (au moins deux fois par heure) à l'aide d'une baguette en verre. Le résidu a ensuite été filtré et lavé à l'eau bouillante 10 fois jusqu'à ce que le filtrat soit revenu à un pH proche de l'eau de rinçage, mesure effectuée à l'aide d'un papier pH, et à la fin rincé trois fois à l'acétone.

– Minéralisation des résidus

Les trois creusets ont été placés dans une même étuve réglée à la température de 103 ± 2 °C, pendant environ 16 h. Après séchage, les creusets ont été récupérés et pesés après refroidissement dans un dessicateur, les poids notés, respectivement, A_2, B_2 et C_2 (à ± 0,1 mg). Les creusets ont été ensuite placés dans un four à moufle et la température a été montée progressivement jusqu'à atteindre 480 ± 10 °C, maintenue constante pendant 6 h. Finalement, les creusets ont été récupérés et refroidis dans le dessicateur, et les poids notés A_3, B_3 et C_3 (à ± 0,1 mg). Ce protocole a été répété 3 fois, une moyenne et un écart type ont été calculés.

iii. Calcul de la teneur des fractions pariétales

Le calcul des différentes fractions NDF, ADF et ADL a été effectué à l'aide des relations suivantes :

$$NDF_{org} = \frac{(A2-A3)}{(A1-A0)*MS*MO*10^{-4}} * 100 \qquad \text{Eq. 16}$$

$$ADF_{org} = \frac{(B2-B3)}{(B1-B0)*MS*MO*10^{-4}} * 100 \qquad \text{Eq. 17}$$

$$ADL_{org} = \frac{(C2-C3)}{(C1-C0)*MS*MO*10^{-4}} * 100 \qquad \text{Eq. 18}$$

D'où, la déduction de la composition en constituants pariétaux :

$$Extractibles = 100 - NDF \qquad \text{Eq. 19}$$

$$Hemicelluloses = NDF - ADF \qquad \text{Eq. 20}$$

$$Cellulose = ADF - ADL \qquad \text{Eq. 21}$$

$$Lignine = ADL \qquad \text{Eq. 22}$$

- Méthode NREL

Cette méthode a été développée au sein du laboratoire NREL « National Renewable Energy Laboratory » (Colorado, Etats Unis, 2008). Elle consiste essentiellement à faire subir à la matière lignocellulosique une hydrolyse acide en deux étapes afin de décomposer la structure des polymères des polysaccharides, notamment les fractions cellulose et hémicelluloses, en leurs formes monomères, qui peuvent être ensuite mesurés par chromatographie. La lignine est généralement mesurée par gravimétrie comme résidu de l'hydrolyse (Sluiter et al., 2012).

i. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés avant d'appliquer le protocole expérimental. Les échantillons ont tout d'abord été broyés et tamisés, et la classe granulométrique se situant entre 600 et 1000 µm a été retenue pour la suite du protocole. En effet, les particules d'une granulométrie plus

petite ou plus grande tailles conduisent à une sous-estimation de la teneur en hydrates de carbone suite à une dégradation excessive de ces composés pour le premier cas, ou à une hydrolyse incomplète des polysaccharides en sucres monomères, dans le deuxième cas (Sluiter et al., 2008) . Ensuite, la fraction des extractibles a été éliminée en utilisant de l'éthanol suivant le protocole de la procédure NREL/TP-510-42619 (Sluiter, et al., 2008). Les échantillons ont été séchés dans une étuve réglée à une température de 40 °C pendant 48 h afin d'éviter que l'humidité puisse interférer avec les concentrations d'acide utilisées dans les étapes suivantes.

ii. Protocole

Ce protocole a comme référence la procédure standard NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al., 2010) et schématisé selon la

Figure **43**. Environ 75 ± 2,5 mg de l'échantillon sec sont pesés et mis dans des tubes à essai hermétiques et autoclavables. Ensuite, un volume de 0,75 ± 0,002 mL d'acide sulfurique à 72% (massique) sont ajoutés dans chaque tube. Le mélange présent dans les tubes a été agité avec une baguette en verre pendant 1 min environ. Ensuite, les tubes ont été placés dans un bain marie, réglé à la température de 30 ± 3 °C et incubés pendant 60 ± 5 min. Afin de favoriser cette première étape d'hydrolyse acide, des agitations ont été effectuées toutes les 10 minutes environ. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, les tubes ont été retirés du bain marie et dilués, en ajoutant un volume de 21,8 ± 0,004 mL d'eau distillée et la nouvelle concentration en acide sulfurique est de 4% (massique). Les tubes bien fermés hermétiquement ont été placés dans un autoclave afin de réaliser la deuxième étape d'hydrolyse acide. Le cycle d'autoclavage est réglé pour atteindre une température de 120 °C maintenue pendant 1 h. Lorsque le temps est écoulé, les tubes ont été refroidis et récupérés.

Ensuite une filtration sous vide des solutions d'hydrolyse sur un verre fritté n° 2 a été réalisée, afin de séparer le filtrat riche en sucres monomères et le résidu solide, composé essentiellement de lignine. Le résidu solide a été placé dans des creusets en porcelaine pour la détermination de la teneur en lignine insoluble dans l'acide. Pour cela, ce résidu a été séché dans une étuve ventilée et réglée à 105 ± 5 °C, pendant environ 24 h, et placé ensuite dans un four à moufle réglé à 575 ± 25 °C pendant 24 ± 6 h. Après le cycle de calcination, les creusets ont été récupérés et la masse a été mesurée à 0,1 mg prés. Le filtrat a été lui dilué et filtré à l'aide d'une membrane en nylon de porosité 0,22 µm pour ensuite être analysé pour les teneurs en sucres monomères par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) décrite dans le paragraphe 7.5.

3.2 Analyse du pH

Le pH de la biomasse lignocellulosique native et prétraitée a été mesuré par une sonde fixée à un pH-mètre (InoLab® pH 720, WTW). Une masse d'environ 0,1 g de matière sèche, à laquelle est ajoutée de l'eau distillée avec un rapport solide/liquide de 1:20, est agitée mécaniquement pendant 5 min et le pH est mesuré au niveau de la phase liquide après décantation de la phase solide.

Figure 42 : pH mètre

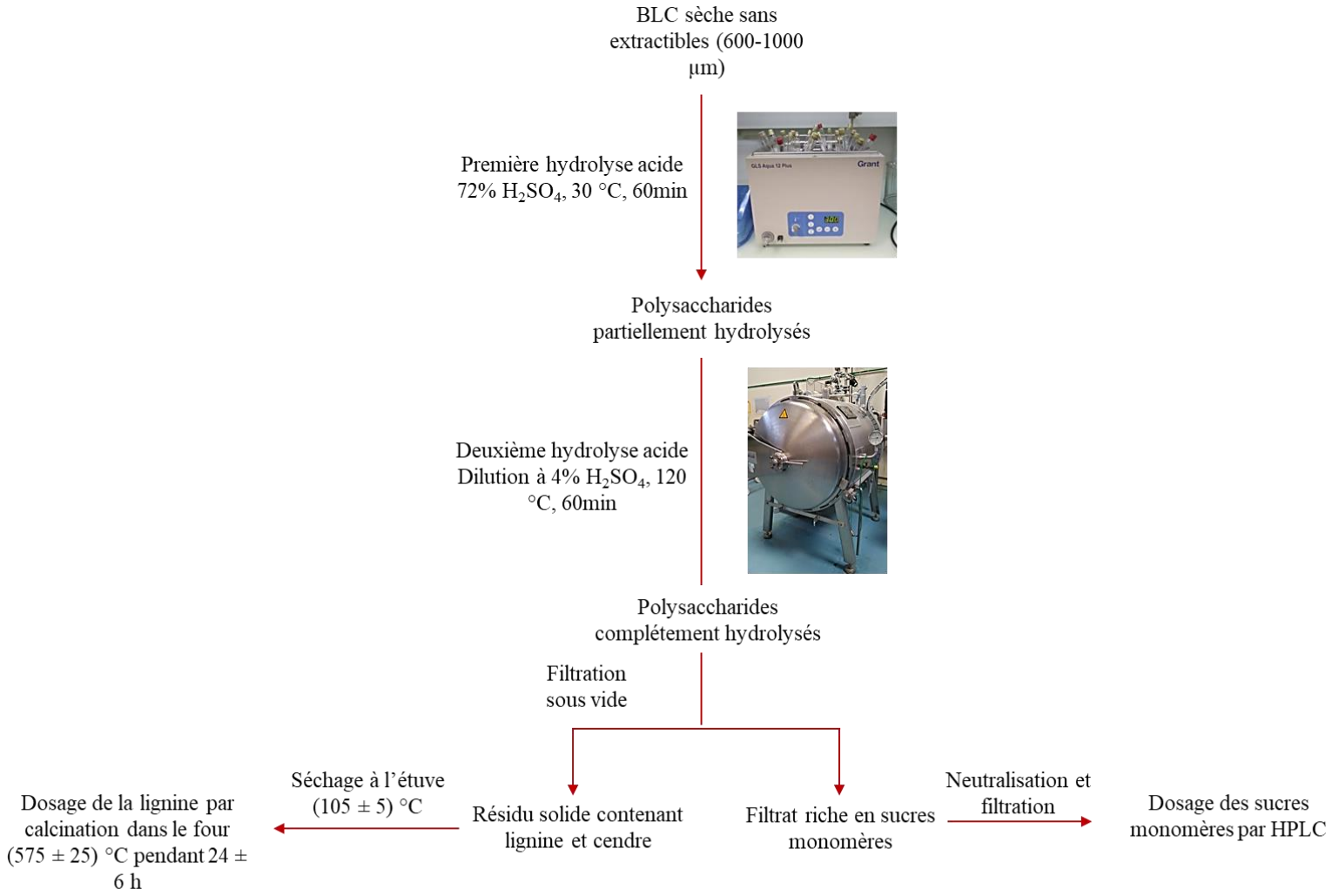


Figure 43 : Schéma du protocole expérimental de la méthode NREL (Sluiter et al., 2012)

3.3 Détermination de la capacité d'absorption d'eau

La détermination de la capacité d'absorption d'eau par le substrat a été effectuée selon la méthode décrite par Gould et al. (1989) et cité par Boussarsar et al. (2009). Des échantillons secs ont été immergés dans l'eau distillée dans un rapport massique (Substrat/Eau) de 10%. Les essais ont été réalisés à plusieurs temps d'immersion (5, 10 15, 30 et 40 min) pour suivre la cinétique d'absorption de la matière jusqu'à complète hydratation. Au bout de chaque temps d'immersion, l'excès d'eau a été éliminé par passage à travers un tamis à maille très fine. L'échantillon humide a été ensuite pesé et puis séché jusqu'à l'obtention d'un poids constant dans une étuve réglée à 105 °C. La capacité d'absorption d'eau est définie comme suit (Sangnark et Noomhorm, 2003):

$$Capacité\ d'absorption\ d'eau = \frac{Masse\ humide - Masse\ sèche}{Masse\ sèche}\ (\frac{g\ d'eau}{gM.S}) \quad \text{Eq. 23}$$

4. METHODES D'ANALYSE DE LA STRUCTURE

4.1 Caractérisation par approche microscopique

L'observation de la microstructure nous a permis de collecter des informations sur la morphologie externe et l'organisation tissulaire de la matière première (chènevotte, alfa) à l'état natif et prétraité, permettant ainsi de suivre les modifications après les prétraitements. Ces observations ont été effectuées à l'aide de deux techniques microscopiques.

4.1.1 Observation par stéréomicroscopie

À la suite des opérations d'homogénéisation (broyage et tamisage), des échantillons natifs ont été prélevés et observés à l'aide d'une loupe binoculaire de marque Leica M165C (grossissement X11), équipée d'une caméra numérique (Leica DFC). L'acquisition des images et leur analyse ont été effectuées via le logiciel LAS (Leica Application Suite). Ce dernier a permis l'évaluation des dimensions des particules des échantillons observés.

Figure 44 : Loupe binoculaire Leica M165C

4.1.2 Observation par microscopie électronique à balayage

Les observations par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées en utilisant un microscope FEI Quanta 200 du Centre Commun d'Analyses de l'Université de La Rochelle. Les analyses ont été effectuées en mode environnemental, qui est une méthodologie alternative pour l'observation des échantillons non-conducteurs et/ou échantillons hydratés grâce à la vapeur d'eau introduite dans la chambre d'analyse (Conforto et al., 2015). Ces échantillons peuvent être alors observés sans aucune préparation préalable à l'analyse.

Les échantillons ont été collés sur un porte échantillon (plot), à l'aide d'un ruban adhésif en carbone, et ensuite déposés dans l'appareil de pulvérisation cathodique afin de rendre

l'échantillon conducteur aux électrons, évitant ainsi l'accumulation des charges parasites négatives à la surface de l'échantillon au cours de son observation. Les échantillons ont été analysés sous un vide partiel de l'ordre de 1,3-1,6 mbar avec une tension d'accélération du faisceau primaire d'électrons de 15 kV selon des grossissements adaptés. Les images ont été acquises suite à la détection des électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés.

4.2 Caractérisation de la structure

4.2.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

a) Principe

Afin de déterminer la structure de la matière (chènevotte, alfa) à l'état natif et prétraité et identifier les différents types de liaisons et groupements fonctionnels au sein de ses molécules, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique parmi d'autres, communément employée pour cette finalité. En effet, la liaison chimique est caractérisée par une fréquence de résonnance. Lorsqu'elle est mise sous une radiation électromagnétique dont la fréquence correspond à sa fréquence propre, elle absorbe cette radiation.

Cette technique est plus rapide que la spectroscopie infrarouge conventionnelle. Elle consiste à envoyer des radiations au travers un instrument « interféromètre », cet instrument fourni plusieurs faisceaux à des combinaisons de fréquences différentes qui passent par l'échantillon. Après mesure de l'absorption par l'échantillon, l'ensemble des signaux obtenus (interférogramme) subissent un traitement au niveau de l'ordinateur par l'algorithme de la transformée de Fourier. On obtient alors un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive).

Le spectre obtenu représente l'évolution de la transmittance ou de l'absorbance en fonction du nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde), où on observe des variations. Chaque pic (absorption) est donc caractéristique d'un certain type de liaison. La table de correspondance (voir annexes) fourni les pics d'absorption, en termes de nombres d'onde, pour les liaisons moléculaires et les groupes fonctionnels communs.

b) Mode opératoire

Les échantillons ont été analysés par spectromètre FTIR Thermo Scientific Nicolet iS5. Le logiciel permettant l'acquisition des spectres infrarouges est OMNIC. L'utilisation du dispositif ATR (Attenuated Total Reflection) a permis d'analyser les échantillons directement dans leur état initial, sans préparation préalable. Après avoir réglé les paramètres de configuration de l'analyse, à savoir : une moyenne de 32 balayages pour chaque spectre, une résolution de 4 cm^{-1} et le format final en transmittance, il convient de passer le blanc et ensuite les échantillons à analyser. Les spectres ont été enregistrés à des nombres d'ondes de 400 à 4000 cm^{-1} et les analyses ont été réalisées en triple.

Figure 45 : Spectrophotomètre Thermo Scientific Nicolet iS5

4.2.2 Diffraction par rayons X

a) Principe

La diffraction aux rayons X permet d'étudier la structure cristalline d'un matériau. Un cristal est un empilement périodique d'atomes (ou chaînes macromoléculaires dans le cas de polymères). Lorsqu'il est irradié par un faisceau de rayons X, des ondes sont diffusées, à partir de chaque atome du cristal. La loi de Bragg stipule que ces ondes se propagent dans toutes les directions (Figure 46), selon la relation suivante :

$$2d\,sin\theta = n\lambda \qquad \text{Eq. 24}$$

Avec,

- d : distance entre deux plans de diffraction,
- n: indice de diffraction,
- θ : angle incident des photons X sur ces plans,
- λ: la longueur d'onde.

Cette loi permet d'associer chaque pic à un plan atomique imaginaire. La désignation des plans est faite par des indices de Miller, qui sont associés aux pics de diffractions. Les rayons diffractés ont des positions différentes, selon l'angle de l'échantillon par rapport aux rayons X, ce qui permet de déterminer la distance entre les plans et leur orientation.

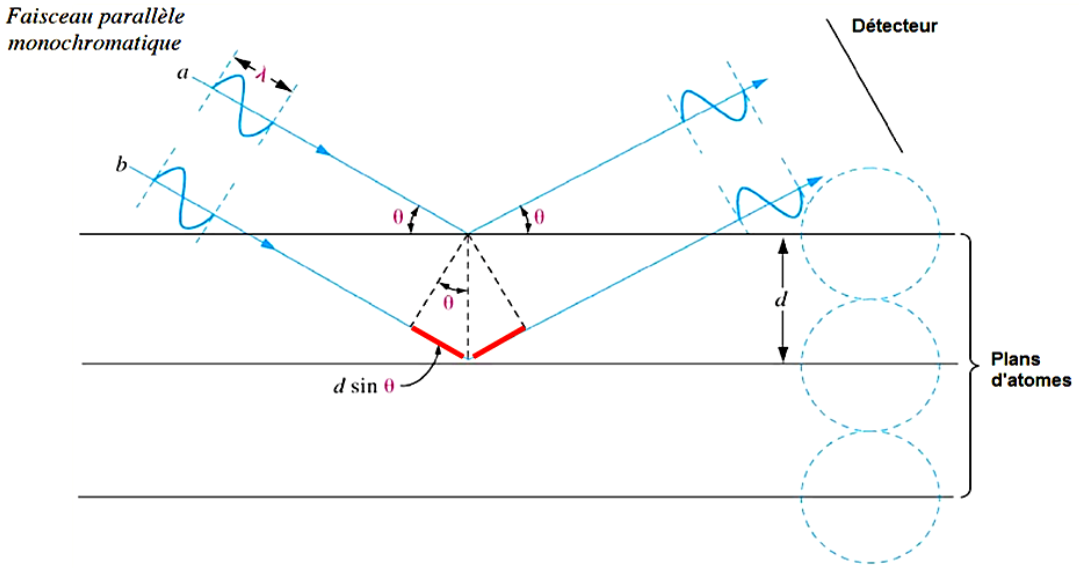


Figure 46 : Illustration de la loi de Bragg.

b) Mode opératoire

Les matières premières (chènevotte, alfa) à l'état natif et traité ont été examinées par diffraction des rayon X. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre (Figure 47) D8 Discover de Bruker-AXS (Karlsruhe, Allemagne). La radiation (Cu $K\alpha_1$ = 1,5405 Å), produite dans un tube en cuivre scellé à 40 kV et 40 mA, a été sélectionnée et parallélisée par l'utilisation d'un système à miroir Gobël croisé et collimaté, dans le but de produire un faisceau de 500 µm. Les données de diffraction par rayon X, ont été recueilles, en utilisant un détecteur 2D GADDS pendant 10 minutes puis normalisées.

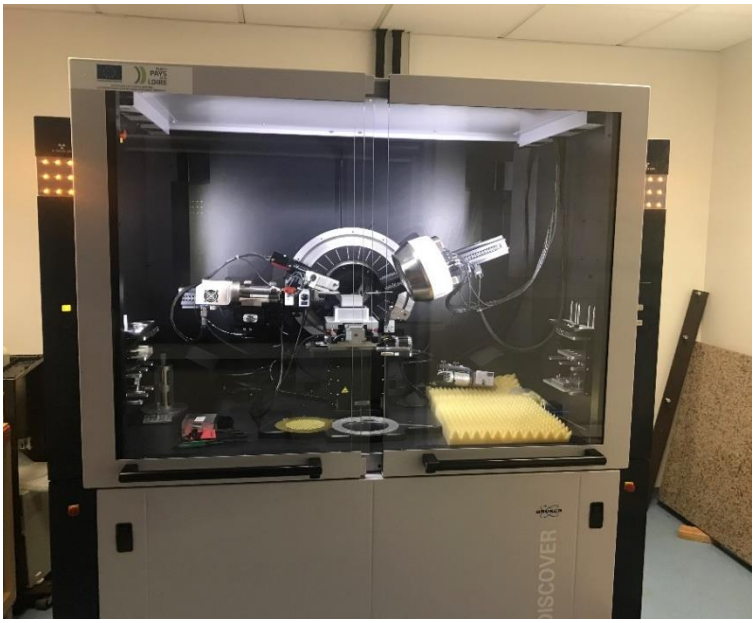


Figure 47: Photo du diffractomètre aux rayons X (Karlsruhe, Allemagne).

4.2.3 Surface spécifique A_{BET} : Méthode Brunauer-Emmet-Teller

a) Principe

La surface spécifique A_{BET} d'un substrat, appelée aussi aire massique, représente la surface totale (externe et interne) accessible par adsorption aux atomes ou molécules rapportée par unité de masse de l'échantillon. La mesure de A_{BET} est basée sur l'adsorption de molécules gazeuses à basse température (e.g N_2 à 77k).

b) Mode opératoire

L'analyse de la surface spécifique de la matière d'étude à l'état natif et prétraité a été effectuée via la technique d'adsorption. Celle-ci est basée sur la mesure de la pression du gaz adsorbable à température constante. La mesure de cette pression permet de déterminer la quantité de gaz absorbée à la surface du matériau, de tracer ainsi les isothermes d'adsorption et d'en déduire la surface spécifique (Juszczak et al., 2002). Le calcul de la surface spécifique a été réalisé selon la méthode BET (Brunauer et al., 1938) à l'aide d'un analyseur de surface ASAP 2020 (Micromeritics, USA). La caractérisation a été effectuée après dégazage d'environ 0,3 g de matière, sous vide poussé (2 µmHg), à 40 °C pendant 48 heures. La valeur de la surface spécifique est obtenue à partir de l'isotherme d'adsorption du gaz à la température de l'azote liquide (77 K), le gaz employé pour cette analyse est le krypton. Le dispositif expérimental utilisé est schématisé par la Figure 48.

Les différentes étapes de la mesure sont :

1. Le pré-séchage de l'échantillons à 40 °C, pendant 72 heures dans une étuve,
2. Le dégazage sous vide à la même température pendant 36 h, sur le poste de dégazage, afin d'éliminer l'air et toutes traces d'eau pouvant fausser les résultats de calcul de la surface spécifique,
3. Après l'étape de dégazage, la pression atmosphérique est rétablie par injection de gaz dans le tube d'azote,
4. La masse de l'échantillon est mesurée après le dégazage,
5. Le tube contenant l'échantillon est replacé sur le poste d'analyse pour subir un re-dégazage,
6. L'échantillon est plongé ensuite dans un bain d'azote liquide afin d'effectuer la mesure à $T_{constante}$,
7. Un volume connu de krypton est envoyé sur l'échantillon. Après stabilisation de la pression, le volume de gaz adsorbé est calculé à partir de la différence de pression mesurée avant et après la mise à l'équilibre. Ainsi, la précision de l'isotherme d'adsorption est directement reliée à la précision de la mesure de pression,

Pour mesurer de faible surface spécifique <1 m^2/g, nous avons utilisé le krypton à 77 K comme gaz adsorbable. Sa faible pression de saturation (2,3 mbar) à cette température

permet de travailler sur une gamme de pression plus basse et d'observer ainsi avec une meilleure précision les faibles volumes de gaz adsorbé.

8. Pour arriver à une courbe complète d'adsorption, l'étape (7) est poursuivie en augmentant progressivement les pressions partielles jusqu'au dernier point d'équilibre voulu (P_0/P=0,2).

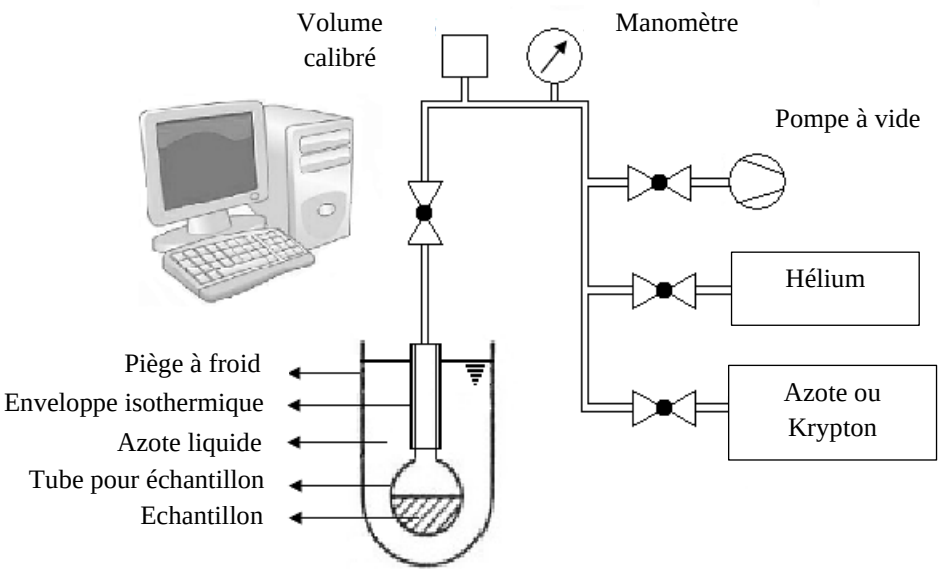


Figure 48 : Schéma de l'appareil de mesure BET (ASAP 2020)

L'équation BET permet via un traitement analytique de déterminer le volume V_m de gaz adsorbé en monocouche en se basant sur l'isotherme déterminé expérimentalement. Une fois ce volume connu, la surface totale de l'échantillon est obtenue par l'équation suivante:

$$S = n.S_m \quad \text{Eq. 25}$$

Où :
S = Surface totale de l'échantillon
n = nombre de molécules de gaz adsorbées en monocouche
S_m = surface d'une molécule de gaz (la molécule du Krypton est caractérisée par une surface de 0,210 $nm^{2)}$.
La surface spécifique est alors le rapport de la surface totale obtenue par la masse de l'échantillon.

5. ANALYSE STATISTIQUE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES

La compréhension d'un phénomène scientifique revient à étudier l'impact d'un certain nombre de variables sur l'évolution d'une grandeur particulière caractérisant ce phénomène. La méthode intuitive consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables et varier une à plusieurs valeurs et de mesurer la réponse à chaque valeur. Cependant, si plusieurs variables doivent être étudiées, à plusieurs niveaux, il faut répéter cette technique beaucoup de fois, ce

qui est fastidieux. La méthode des plans d'expériences a été définie afin de pallier à cette difficulté. Il s'agit d'une méthode statistique qui consiste, en une suite d'essais organisés, de déterminer en un minimum d'essais et avec un maximum de précision, l'influence d'une/ou plusieurs variables sur une/ou plusieurs réponses. Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle empirique traduisant les variations de la réponse en fonction de la variation simultanée des différentes variables d'entrée et ainsi d'optimiser la réponse sur un niveau maximum ou minimum, ou pour toute valeur cible. Pour présenter cette approche, il faut introduire une méthodologie spécifique aux plans d'expériences (Goupy, 2006).

5.1 Principe de base

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle de l'espace expérimental et celle de la modélisation mathématique des grandeurs étudiées. Nous définissons les termes suivants :

Réponse : grandeur d'intérêt lors d'une étude d'un phénomène. Elle est mesurable suite à la variation des variables.

Facteur : toute grandeur supposée influer le phénomène étudié. Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable. Il est caractérisé par un niveau bat et un niveau haut, l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre ces deux niveaux, s'appelle le domaine de variation.

Interaction : lorsque l'effet d'un facteur dépend de la valeur prise par un autre facteur cela se traduit par une interaction entre les deux facteurs. On appelle interaction d'ordre m une interaction entre m facteurs.

Coordonnées centrées réduites : ce sont des variables adimensionnelles qui constituent la matrice d'expériences. En effet, le passage des variables dimensionnelles à des coordonnées centrées réduits est effectué par l'application de la relation suivante :

$$X = \frac{x - x_0}{P} \qquad \text{Eq. 26}$$

Avec :
X : valeur centrée réduite qui varie entre -1 et + 1,
x : valeur dimensionnelle qui varie entre x_{min} et x_{max},
x_0 : valeur au centre du domaine (x_{min} , x_{max}) définie par : $x_0 = \frac{x_{min} + x_{max}}{2}$
P : le pas de variation de la valeur, défini par : $P = \frac{x_{max} - x_{min}}{2}$

Le domaine expérimental : espace défini par la variation des facteurs quantitatifs et/ou par les combinaisons des modalités des facteurs qualitatifs. Un domaine d'étude est défini comme l'espace dont les dimensions correspondent au nombre de facteurs. Chaque point de ce domaine

représente une combinaison des valeurs délimitées par les niveaux bas et haut de chaque facteur ; c'est donc un espace dans lequel chaque point représente une expérience (Figure 49).

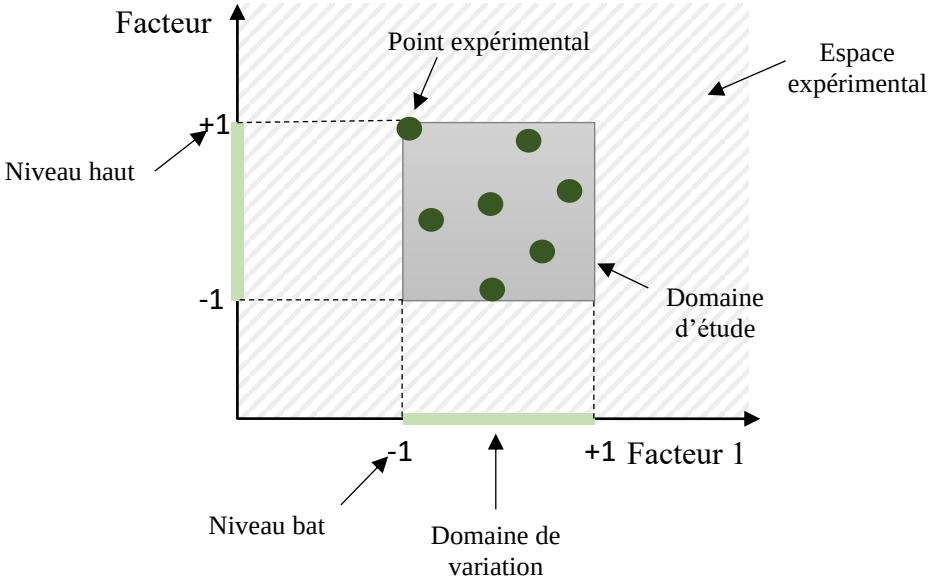


Figure 49 : Définition du domaine de variation d'un facteur, du domaine d'étude et le point expérimental

Surface de réponse ; représentation géométrique de la réponse de chaque point expérimental. Un axe y orthogonale à l'espace expérimentale est attribué à la réponse, dans le cas d'un plan à deux facteurs, cette représentation constitue un espace à trois dimensions. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur la surface de réponse (Figure 50) (Linder, 2005).

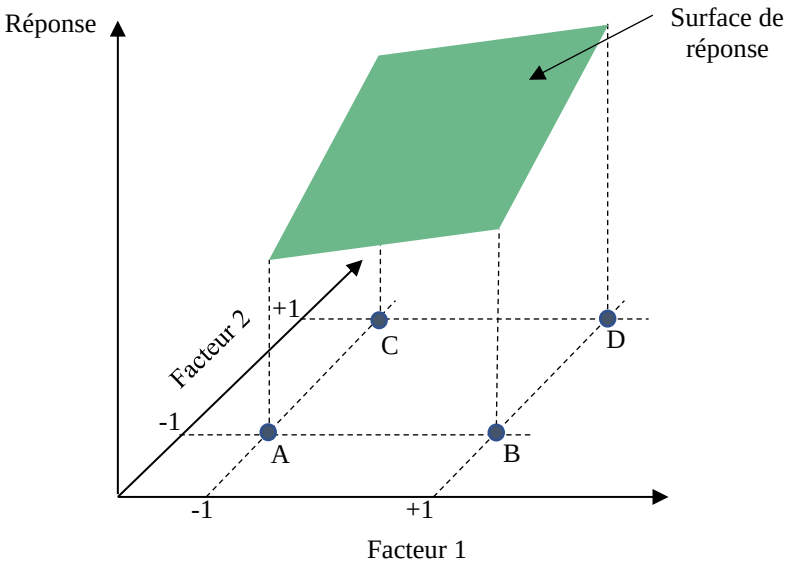


Figure 50 : Représentation de la surface de réponse

5.2 Modélisation mathématique

La réponse peut s'écrire sous une forme mathématique générale, qui décrit sa loi d'évolution, en fonction de plusieurs variables x_i (facteurs). On a :

$$y = f(x_1,x_2,x_3,\ldots,x_k) \quad \text{Eq. 27}$$

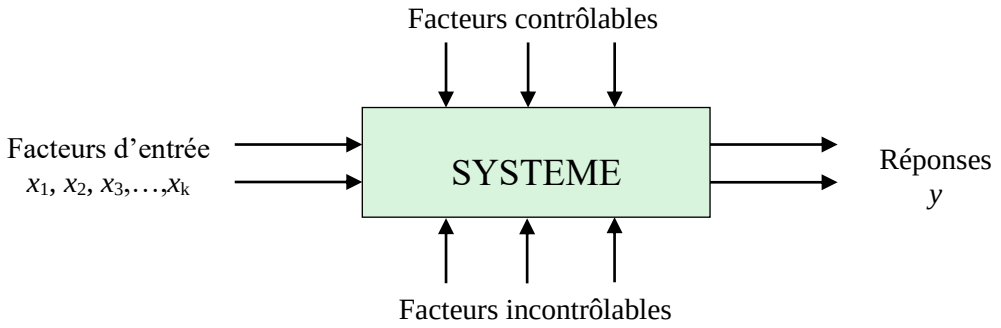


Figure 51 : Représentation d'un système d'étude

Dans le cas des plans d'expériences, l'équation 27 prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_j + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \cdots + e \quad \text{Eq. 28}$$

La réponse est représentée alors par y, le niveau que peut prendre un facteur i est représenté par x_i, l'interaction entre deux facteur i et j est exprimée par le terme $x_i x_j$, a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté à priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences. Un résidu noté « e » peut être ajouté au modèle décrit, il exprime la somme de l'écart entre le modèle choisi et le modèle réel, qu'on appelle « le manque d'ajustement », et la dispersion des résultats expérimentaux, appelée « erreur aléatoire ». L'intérêt de modéliser une réponse par un polynôme est, à part l'aspect optimisation, de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude, sans être obligé de réaliser des points expérimentaux (Goupy, 2005).

5.3 Choix du plan centré composite

5.3.1 Les plans factoriels complets

Ce type de plan concerne les études qui présentent un nombre relativement faible de facteur. Le nombre de niveaux de chaque facteur est restreint à deux (niveau bas et niveau haut). Si on considère un nombre n de facteurs à 2 niveaux, la taille de la matrice d'expérience est donc de 2^n. Les essais sont établis de manière à tester toutes les combinaisons possibles en variant tous les facteurs à tous les niveaux. Les plans factoriels complets permettent de fournir un modèle du premier degré avec interactions (modèle PDAI). Ces plans peuvent être utilisés comme un premier criblage des facteurs susceptible d'influer un phénomène et pour une modélisation simple de celui-ci (Goupy, 2006).

5.3.2 Les plans réduits - Plan centré composite

Les plans réduits consistent à utiliser des matrices d'expériences optimisées en sélectionnant certaines combinaisons des niveaux des facteurs, ce qui offre la possibilité d'étudier plusieurs facteurs à différents niveaux. Il en existe plusieurs types tels que les réseaux de Doehlert, les plans de Box-Behnken, les plans composites centrés, etc…(Goupy, 2006)

Dans notre étude, nous avons choisi le plan composite centré qui fait partie des plans dits à « surface de réponse » ou plans « d'optimisation ». Ce type de plan permet de localiser un éventuel point optimal au niveau de la surface de réponse, en établissant des modèles polynomiaux de second degré en fonction des paramètres opératoire. Ainsi, dans le cas de trois facteurs, le modèle polynomial du second degré prend la forme suivante :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 \quad \text{Eq. 29}$$

Le plan composite centré est constitué de trois catégories d'essais :

- Des essais sous forme d'un plan factoriel complet (2^n essais avec n = nombre de facteurs),
- Des essais sous forme d'un plan en étoile : appelés aussi « points axiaux », ce sont des points expérimentaux situés sur les axes avec la même distance par rapport au centre, $\alpha = \sqrt[4]{N}$ avec N qui représente le nombre d'essai dans la 1ère séquence. S'il y a 3 facteurs : N = 8 et donc α = 1,68 (en unités centrées réduites),
- Des essais au centre du domaine expérimental. Des répétitions au niveau de ce point permettent d'évaluer la répétabilité des résultats.

Ainsi, chaque facteur varie selon 5 niveaux : α, -1, 0, +1, +α.

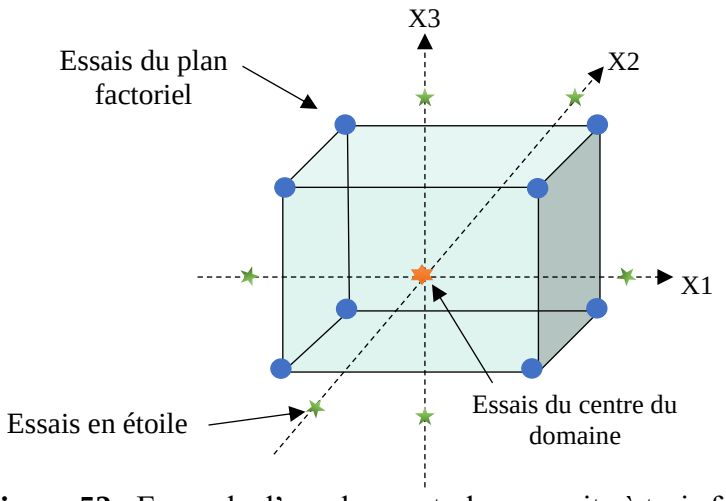


Figure 52 : Exemple d'un plan central composite à trois facteurs

6. METHODE DE PRETRAITEMENT COMBINE DE LA MATIERE PREMIERE

Le prétraitement combiné consiste d'abord en une imprégnation du substrat avec de l'acide sulfurique ou de l'hydroxyde de sodium suivi d'un traitement hydro-thermomécanique, sous haute pression par la vapeur saturée.

6.1 Imprégnation du catalyseur chimique

L'imprégnation de la matière première par le catalyseur acide sulfurique ou hydroxyde de sodium a été effectuée à l'aide de deux techniques.

6.1.1 Aspersion

Cette technique se base sur la pulvérisation en petites gouttelettes de solutions d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium sur la matière première à l'aide d'un pulvérisateur, en quantité bien déterminée et à température ambiante (Figure 53).

Figure 53 : Imprégnation du catalyseur chimique par aspersion

Les échantillons de chènevotte (20 g) et d'alfa (10 g) sont d'abord déposés dans des sacs en plastique zippé avant d'être aspergés par des solutions diluées à des concentrations en réactif chimique prédéfinies. Le protocole a été appliqué aux échantillons prévus pour trois études :

- Etude de l'effet de la concentration en catalyseur

Il s'agit d'étudier l'impact de la variation de la concentration d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium sur le prétraitement thermomécanique. Les échantillons ont été aspergés par des solutions contenant des concentrations en catalyseur chimique, allant de 3 à 50% et de 3 à 15 % (massique) pour la chènevotte et l'alfa, respectivement. La masse de la solution à asperger est calculée de manière à atteindre une humidité de 40% au niveau du substrat, tenant compte de leur humidité initiale. Les échantillons ont été pesés et agités entre chaque pulvérisation afin d'assurer une répartition uniforme de la solution. Les échantillons ont été ensuite stockés à 4 °C pendant 48 h afin de favoriser une répartition homogène dans l'ensemble du substrat et d'éviter une éventuelle évaporation avant le traitement thermomécanique.

- Etude de l'effet du taux d'humidification

Il s'agit d'étudier l'impact du taux d'humidification des échantillons de chènevotte par les solutions diluées d'acide sulfurique et d'hydroxyde de sodium. La granulométrie de la chènevotte est fixée à 1-8 mm. Les différentes teneurs en eau testées sont comprises entre 30 et 420%. Le rapport de la masse de l'acide sulfurique ou l'hydroxyde de sodium sur l'échantillon sec est gardé fixe pour chaque essai. L'aspersion a été effectuée selon la méthode décrite précédemment.

- Etude de l'effet de la granulométrie

Il s'agit d'étudier l'interaction entre les différentes classes granulométriques de la chènevotte avec les différentes concentrations en acide sulfurique. Deux classes granulométriques ont été sélectionnées pour cette étude ; [0,8-1 mm] et [1-8 mm]. Les substrats ont été aspergés par des solutions d'acide sulfurique diluées à des concentrations allant de 3 à 25 % (massique) tout en maintenant une teneur en eau de 40%.

6.1.2 Immersion

La technique d'imprégnation de l'agent chimique par immersion a été réalisée sur des lots de 20 g de chènevotte introduits dans un cristallisoir en verre (Figure 54). Des solutions d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium à des concentrations allant de 0,2 à 10% (massique) ont été ajoutées à température ambiante. Pour l'alfa, une masse de 10 g a été imprégnée en suivant le même protocole. La concentration en acide sulfurique ou hydroxyde de sodium a varié de 0,2 à 3% (massique).

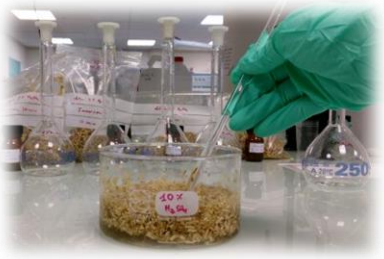


Figure 54 : Imprégnation du catalyseur par immersion

Deux temps d'imprégnation ont été testés ;10 et 30 min, pendant lesquels le mélange a été manuellement agité à l'aide d'une baguette en verre afin d'homogénéiser les échantillons et avoir une meilleure absorption. A la fin de l'opération, le mélange a été séparé en deux fractions ; solide et liquide. La séparation a été effectuée dans une unité de filtration (unité Buchner) avec une porosité du filtre de 15 µm. La teneur en humidité finale a été déterminée et a varié de 300 à 400%. Les échantillons imprégnés ont été stockés dans des sacs en plastique scellés à 4 °C, en attendant le traitement thermomécanique ultérieur.

6.2 Traitement thermomécanique par le procédé DIC « Détente Instantanée Contrôlée »

6.2.1 Principe du traitement thermomécanique

Le traitement hydro-thermomécanique est un traitement de type HTST (High Temperature-Short Time). Le traitement hydro-thermo-mécanique est obtenu par un contact direct de la vapeur d'eau saturée sous pression avec le substrat lignocellulosique, pendant un certain temps de traitement. Le principe du procédé est basé sur un hydrotraitement de la matière, obtenu grâce à l'effet combiné de la température et de la teneur en eau ; l'effet thermique repose sur l'utilisation des températures élevées, par contact direct du matériau lignocellulosique avec de la vapeur saturée sous pression, et l'effet hydrique par diffusion de la vapeur d'eau au sein du produit. Quant à l'effet mécanique, il est obtenu par la détente abrupte vers une pression réduite. Ce phénomène produit une force mécanique au sein de la matrice causant des déformations importantes par cisaillement.

6.2.2 Principales étapes du traitement thermomécanique

Les principales étapes du traitement thermomécanique sont illustrées dans la figure ci-dessous :

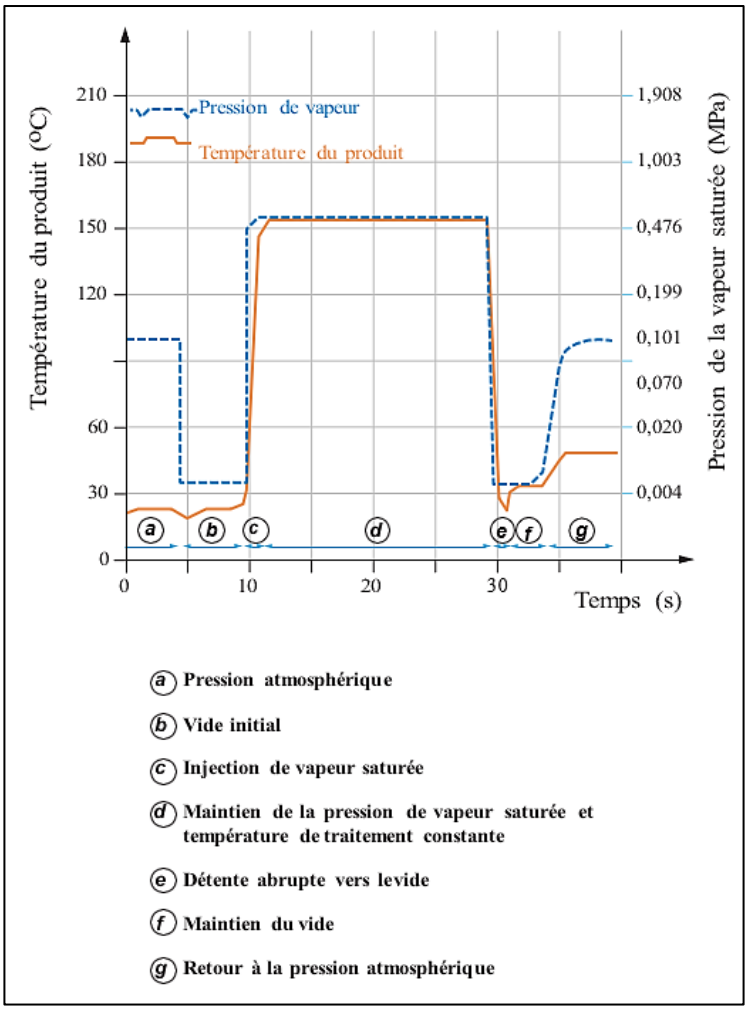


Figure 55 : Principales étapes du traitement thermomécanique

– Mise sous vide

L'enceinte de traitement est mise sous un vide initial de 50 mbar avant l'injection de la vapeur sous pression. L'intérêt de cette étape est la réduction de la résistance de l'air, par conséquent, les phénomènes de transfert sont grandement intensifiés grâce à la pénétration plus aisée de la vapeur d'eau au sein de la matière. Un chauffage plus rapide est obtenu, dû principalement à l'absorption de la chaleur latente de condensation.

– Injection de la vapeur

La vapeur d'eau saturée est injectée à la surface de la matière, à la pression de traitement. Un contact direct est obtenu entre la vapeur d'eau et le produit, qui en quelques secondes atteint la valeur de la température d'équilibre. La pression dans le réacteur de traitement est maintenue constante durant une durée bien déterminée, appelée temps de traitement.

– Détente rapide vers le vide

Il s'agit d'instaurer un passage ultra-rapide du système vers une pression réduite de 50 mbar. Ce passage assure un refroidissement rapide du produit dû au phénomène d'autovaporisation, responsable également de la perte d'une partie de l'eau du substrat.

– Remise à la pression atmosphérique

La mise à la pression atmosphérique du réacteur de traitement est obtenue par l'ouverture d'une vanne d'entrée de l'air atmosphérique afin de récupérer le matériau traité.

6.2.3 Description de l'installation DIC

Le schéma du dispositif expérimental DIC (Figure 56) est composé d'un réacteur dans lequel la matière lignocellulosique est traitée. Il s'agit d'un autoclave en inox de forme cylindrique de 22 cm de diamètre et de 12 litres de volume (1). La chambre de traitement est munie d'une double enveloppe extérieure, permettant la thermostatation en surchauffe à l'aide de la vapeur d'eau ou en refroidissement par l'utilisation de l'eau froide. L'alimentation de l'autoclave par la vapeur d'eau sous pression est assurée par l'intermédiaire d'une chaudière (2) qui peut arriver jusqu'à une pression de 8 bar. L'injection de la vapeur se fait par le haut à travers une porte à fermeture étanche, qui est obtenue à l'aide d'un double joint, gonflable par de l'air comprimé. La porte d'ouverture est munie d'une soupape de sécurité, d'un vérin de blocage en cas de marche et d'une poignée d'ouverture. Le dispositif expérimental comporte des électrovannes permettant d'assurer manuellement ou automatiquement, l'ouverture et la fermeture des entrées des fluides. Des systèmes de purge sont installés pour évacuer les condensats (3). Le système à vide est formé d'une pompe à anneau liquide (5) "Hibon" (4 kW), capable d'établir un niveau de vide voisin de 4 kPa dans un réservoir de volume de 1600 litres en inox (4) soit 133 fois supérieur à celui de la chambre de traitement. La détente vers les pressions réduites est obtenue par la connexion de la chambre de traitement au réservoir à vide, par l'intermédiaire d'une grosse vanne papillon électro-pneumatique de ¼ de tour, de 200 mm de diamètre à grande vitesse de rotation. Le dispositif comporte une armoire électrique de commande automatique munie d'un automate, de quatre régulateurs de température et de pression, ainsi que de cartes d'acquisition reliée à un ordinateur pour la visualisation des acquisitions et leur stockage (6). Le paramétrage et le fonctionnement sont gérés par un boîtier d'automate programmable.

6.2.4 Protocole de prétraitement thermomécanique appliqué

La matière lignocellulosique (chènevotte ou l'alfa), préalablement imprégnée par le catalyseur est introduite dans le réacteur de traitement préalablement chauffé, à une teneur en eau de 40% pour les échantillons imprégnés par aspersion et environs 400% pour les échantillons imprégnés par immersion. La matière est ensuite soumise à un cycle de traitement thermomécanique, comme décrit précédemment, à une pression de vapeur saturée de 0,7 MPa, pendant un temps de traitement de 30 minutes. A la fin de ce cycle, l'air est injecté dans la chambre de traitement pour revenir à la pression atmosphérique, afin de récupérer l'échantillon. Ce dernier est obtenu sous forme solide ne nécessitant aucune étape de séparation. En raison de l'absorption d'eau pendant le prétraitement, les échantillons ont été séchés dans un four à 40 ° C pendant 24 h, afin d'éviter toute croissance de microorganisme, et stockés ensuite à la température ambiante pour les étapes ultérieures d'analyses et d'hydrolyse enzymatique.

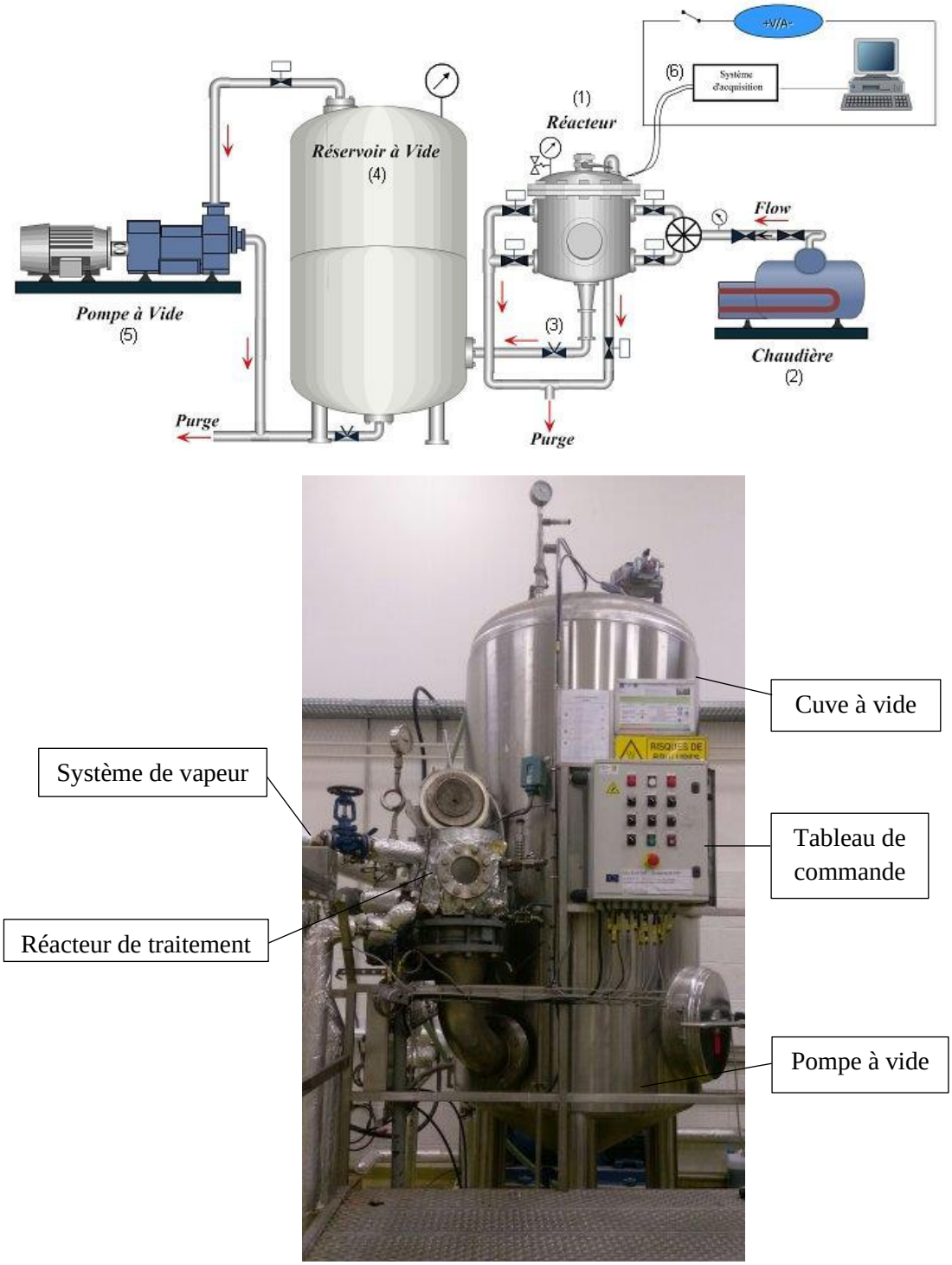


Figure 56 *:* Schéma et photo du dispositif expérimental utilisé pour le traitement thermomécanique

6.2.5 Etude de l'effet de la présence des étapes de mise sous vide

L'étude de l'effet du vide final et initial sur les modifications physico-chimiques de la matière prétraitée a été réalisée selon trois types de procédés hydro-thermo-mécaniques. Elle a été

menée sur des échantillons de chènevotte imprégnés par une solution d'acide sulfurique à 15% par aspersion.

Les procédés hydro-thermo-mécaniques utilisés se distinguent par des différences de modalités, liées à la présence d'étapes de mise sous pression réduite avant et après le début du traitement à la vapeur sous pression (Figure 57). Le premier procédé, DIC est caractérisé par l'application du vide avant et après le traitement thermique. Le deuxième procédé, RP-HMT (Reduced Pressurized-Heat Moisture Treatment), consiste à appliquer un vide initial avant l'injection de la vapeur sous pression et se termine par une détente finale vers la pression atmosphérique. Le troisième procédé, DV-HMT (Direct Vapor-Heat Moisture Treatment), se caractérise par un traitement thermique sans présence des étapes initiale et finale de mise sous vide. Pour ce procédé, la vapeur saturée à la pression de consigne est injectée au-dessus du substrat, placé dans un réacteur maintenu à la pression atmosphérique, contrairement aux deux autres. En effet, pour les procédés DIC et RP-HMT, une étape d'instauration d'une pression réduite de 50 mbar est ajoutée avant la mise sous pression du réacteur. L'intérêt de la mise sous vide de l'enceinte de traitement avant l'injection de la vapeur sous pression est de réduire la résistance de l'air. Cette réduction intensifie les phénomènes de transfert en facilitant la diffusion de la vapeur d'eau au sein du matériau, et par conséquent un chauffage plus rapide est obtenu, dû principalement à l'absorption de la chaleur latente de condensation. Le traitement ensuite se termine par une détente lente vers la pression atmosphérique pour le procédé RP-HMT et une détente rapide vers une pression réduite de 50 mbar pour le procédé DIC. L'application du vide final crée un effet mécanique lors de la détente brusque et le phénomène d'auto-vaporisation provoque un refroidissement intense de la matière, en dessous des températures de transition vitreuse (Tg).

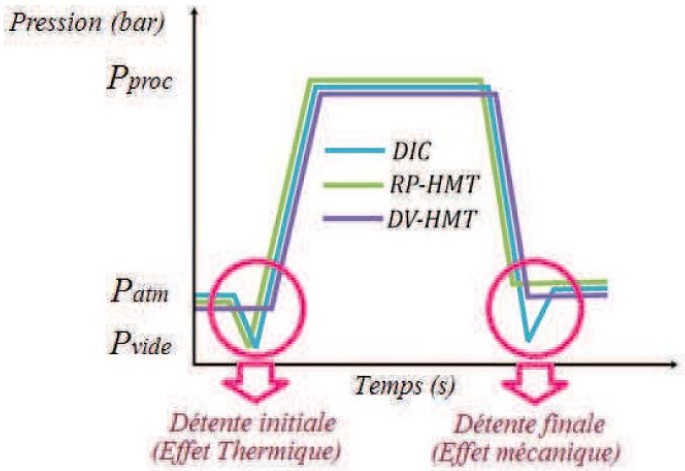


Figure 57 : Schéma de principe des traitements hydrothermique DV-HMT, RP-HMT et DIC.

6.2.6 Etude de l'effet du nombre de détentes

L'étude de l'effet du nombre de détente final selon le cycle de traitement thermomécanique DIC a été réalisé sur la chènevotte imprégnés par solution d'acide sulfurique à 15% par

aspersion. Des essais ont été effectués en variant le nombre de détente finale (1, 2, 3, 4 et 5 détentes sous vide) après que le temps du traitement hydrothérmique ait découlé.

6.3 Conditions du plan d'expériences

Le plan centré composite a été adopté afin d'étudier l'impact des paramètres opératoires du prétraitement combiné, à savoir : la concentration en catalyseurs, la température (ou pression) et le temps de traitement, sur le rendement en sucres simples récupérés après hydrolyse enzymatique. Le plan établit est constitué de 8 essais pour le plan factoriel complet, six essais en étoile, et quatre répétitions au centre du domaine expérimental. Les essais ont été menés dans un ordre aléatoire afin de minimiser les effets de variabilité inattendue des réponses observées due à des facteurs externes. Une première étude a été menée avec des échantillons imprégnés par aspersion jusqu'à une teneur de 40%, de solutions diluées d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium. L'intervalle de variation de chaque facteur est présenté dans le Tableau 2 .

Tableau 2 : Niveaux de variation des facteurs de la première étude par plan d'expériences.

Paramètres/Niveaux	-α	-1	0	+1	+α
Pourcentage en catalyseur (% massique)	1,3	2	3	4	4,7
Température (°C)	133	139	151	159	165
Temps de traitement (min)	5	16	32,5	49	60

Une deuxième étude a été menée avec des échantillons imprégnés jusqu'à une teneur de 200% par des solutions diluées d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium. Dans le cas de l'aspersion par acide sulfurique, la température a été maintenue fixe durant toute l'étude, ce qui a conduit à considérer un plan composite centré à 2 paramètres : la concentration en H_2SO_4 dans la solution d'imprégnation et le temps de traitement. L'intervalle de variation de chaque facteur est présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Niveaux de variation des facteurs de la deuxième étude par plan d'expériences-Cas de l'acide sulfurique

Paramètres/Niveaux	-α	-1	0	+1	+α
Pourcentage en catalyseur (% massique)	0,6	1,2	2,5	3,9	4,4
Temps de traitement (min)	5	16	32,5	49	60

Dans le cas de l'étude par hydroxyde de sodium, nous avons pris en compte la variation des trois facteurs. L'intervalle de variation est présenté dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Niveaux de variation des facteurs de la deuxième étude par plan d'expériences-Cas d'hydroxyde de sodium

Domaine d'étude	-α	-1	0	+1	+α
Pourcentage en catalyseur (%)	0,4	1,8	3,8	6	7,3

Température (°C)	120	134	148	158	165
Temps de traitement (min)	5	16	32,5	49	60

L'analyse des résultats a été réalisée avec le programme statistique (Statgraphics, Centurion XV). Les modèles empiriques ont la forme suivante :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^{n} a_i x_i + \sum_{i=1}^{n} a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=2}^{n} a_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad \text{Eq. 30}$$

Où :

Y est la réponse, a_i , a_{ii} et a_{ij} sont les coefficients de régression, x_i et x_j sont les facteurs et ε est l'erreur aléatoire. L'analyse des résultats s'est basée sur:

- L'analyse de variance (ANOVA) pour identifier les variables statiquement significatives sur la réponse, avec un intervalle de confiance de 95% (p-value fixée à 0,05). Les différentes probabilités sont obtenues à partir du test de Fisher (F-ratio),
- Le graphique de Pareto qui permet de classer les paramètres, leurs interactions ainsi que les influences quadratiques, selon leur ordre d'influence sur la réponse. La ligne verticale permet de visualiser les effets qui ont une influence statistiquement significative avec un degré de confiance de 95%,
- Les surfaces de réponses qui permettent de visualiser le comportement de la réponse dans un espace expérimental délimité par 2 des 3 paramètres et d'identifier la présence d'optimums,
- La détermination du coefficient de corrélation des modèles empiriques (R^2). Un autre coefficient est aussi utilisé, le R^2 ajusté qui tient compte du nombre de coefficients du modèle.

6.4 Calcul de l'indice de sévérité :

L'indice de sévérité combiné CS est un paramètre qui permet d'évaluer l'intensité de chaque condition de prétraitement et de comparer les essais entre eux. A l'aide d'une relation mathématique, fonction de la température (T en °C), du temps réactionnel (t en min) et du pH du substrat, l'indice CS a été calculé pour les essais faisant intervenir l'acide sulfurique comme réactif chimique lors du prétraitement DIC. La formule de calcul est la suivante (Chen et Liu, 2015) :

$$CS = log(R_0) - pH \qquad \text{Eq. 31}$$

$$Avec : R_0 = t * exp(\frac{T-100}{14,75}) \qquad \text{Eq. 32}$$

Le pH utilisé dans la relation est celui de la matière avant le traitement thermomécanique, mesuré en solution aqueuse après décantation de la phase solide, selon le protocole défini précédemment.

6.5 Calcul de la charge en catalyseur chimique

La charge en agent chimique a été calculée afin de déterminer l'apport en masse en réactif chimique par rapport au substrat sec après imprégnation par les techniques aspersion ou immersion. Ce paramètre est calculé selon l'équation suivante :

$$charge\ en\ agent\ chimique\ (\%) = \frac{Masse\ solution\ absorbée\ (g) * concentration\ en\ réactif\ (massique)}{Masse\ du\ substrat\ sec\ (g)} * 100 \quad \text{Eq. 33}$$

7. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA MATIERE PRETRAITEE

L'hydrolyse enzymatique des échantillons prétraités a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité du prétraitement à améliorer la libération des sucres monomères. Le déroulement de l'hydrolyse enzymatique nécessite un milieu tampon à pH = 4,6. Le dosage des sucres obtenus a été effectué en utilisant la méthode DNS (dinitrosalicylique).

7.1 Préparation des réactifs

7.1.1 Tampon citrate-phosphate

La solution tampon citrate-phosphate à pH=4,6 et 50 mM a été préparée en ajoutant 26,7 mL d'une solution d'acide citrique à 0,1 M et 23,3 ml d'une solution de phosphate de sodium dibasique à 0,2 M. Le volume final est ajusté avec une quantité suffisante d'eau distillée pour atteindre un volume de 200 mL.

7.1.2 Réactifs DNS (dinitrosalicylique)

Le réactif DNS a été préparé selon la méthode de (Saqib et Whitney, 2011). 10 g d'acide dinitrosalicylique et 300 g de tartrate de sodium et de potassium ont été ajoutés à 200 mL de NaOH à 2 M, le mélange a été agité et chauffé doucement pour dissoudre les réactifs. Le volume a ensuite été complété à 1 L avec de l'eau distillée.

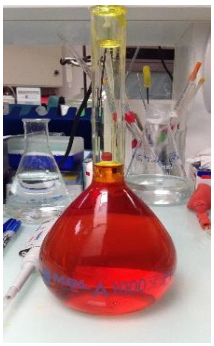


Figure 58 : Solution DNS

7.2 Les enzymes

La solution enzymatique utilisée pour l'hydrolyse de la cellulose est la Cellulast-1,5L. Produite à l'origine par le champignon *Trichoderma reesei*.
La solution est une préparation de cellulase contenant des endo-glucanase, des exoglucanases et des cellobiohydrolases. Cette préparation est un liquide brun avec une densité d'approximativement 1,2 g/mL, fournies par Novozymes (Bagsvaerd, Danmark) et stockées à 4 °C avant leur utilisation en hydrolyse. Les caractéristiques des enzymes cellulases sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 5 : Caractéristiques des enzymes cellulases utilisés lors de l'hydrolyse enzymatique

Enzymes	Activité enzymatique	pH optimal	Température optimale (°C)	Teneur en protéines (mg/mL)
Cellulast 1,5L	96 FPU[a]/mL	4,5-5,0	55-65	191

[a] Une unité FPU est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol d'équivalent glucose sur papier Whatman n°1, en une minute.

7.3 Protocole de l'hydrolyse enzymatique

Les échantillons prétraités ont été placés dans des tubes en verre avec 10 mL de tampon à raison de 10 $g.l^{-1}$, soit 0,1 g de substrat pour 10 mL de tampon. Les tubes ont ensuite été placés dans un réacteur (Figure 59) de 12 tubes (Radley, 50 °C, 300 rpm). Après 10 minutes d'attente, afin d'atteindre l'équilibre thermique, un premier prélèvement de 200 µL est effectué (t_0). C'est à ce moment qu'est ajouté 200 µL d'enzyme (diluée au ¼ de concentration), l'incubation s'est déroulée pendant 24 h.

Figure 59 : Réacteur Radleys

Un suivi de la cinétique d'hydrolyse enzymatique a été effectué via des prélèvements réguliers à différents temps d'hydrolyse. Chaque prélèvement est dilué au ⅕ (dans 800 µL d'eau) dans un tube Eppendorf, avant d'être chauffé au bain marie durant 5 minutes à 100 °C, afin de dénaturer l'enzyme. Ensuite une centrifugation pendant 5 minutes à 12000 rpm (Centrifugeuse à Eppendorf, Himac CT 15E) a permis de séparer le surnageant contenant les sucres et le substrat résiduelle.

7.4 Dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS

Cette méthode utilise les propriétés réductrices des oses (sucres simples). A chaud et en milieu alcalin, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (jaune) est réduit par les oses en acide 3-amino 5-nitrosalicylique (rouge-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des sucres, dont le dosage est ensuite effectué par spectrophotométrie. La quantité de sucres dans chaque échantillon est déterminée en fonction d'une gamme étalon glucose. 0,5 mL de surnageant de chaque échantillon ont été transférés dans un tube en verre pyrex avec 0,5 mL du réactif DNS. Les tubes ont été alors mis durant 10 minutes à 100 °C dans un bain marie, préalablement chauffé. Les tubes ont ensuite été refroidis dans la glace afin de stopper la réaction du DNS. Finalement, un volume de 5 mL d'eau est ajouté aux échantillons. Une quantité adéquate de chaque échantillon est disposée dans une microplaque pour analyse de l'absorbance par le spectrophotomètre (Fluostar Omega). La longueur d'onde du faisceau a été fixée à 550 nm.

La concentration en sucres réducteurs est alors calculée en utilisant une droite étalon de glucose. Cette droite, a été obtenue à l'aide d'une gamme étalon à différentes concentrations [0-3] g/L, préparée à partir d'une solution mère de glucose. Le dosage de DNS est ensuite effectué sur

chaque échantillon de la gamme comme décrit précédemment. On obtient alors la droite DO = f [glucose], qui permet de déterminer les concentrations en sucres réducteurs des échantillons.

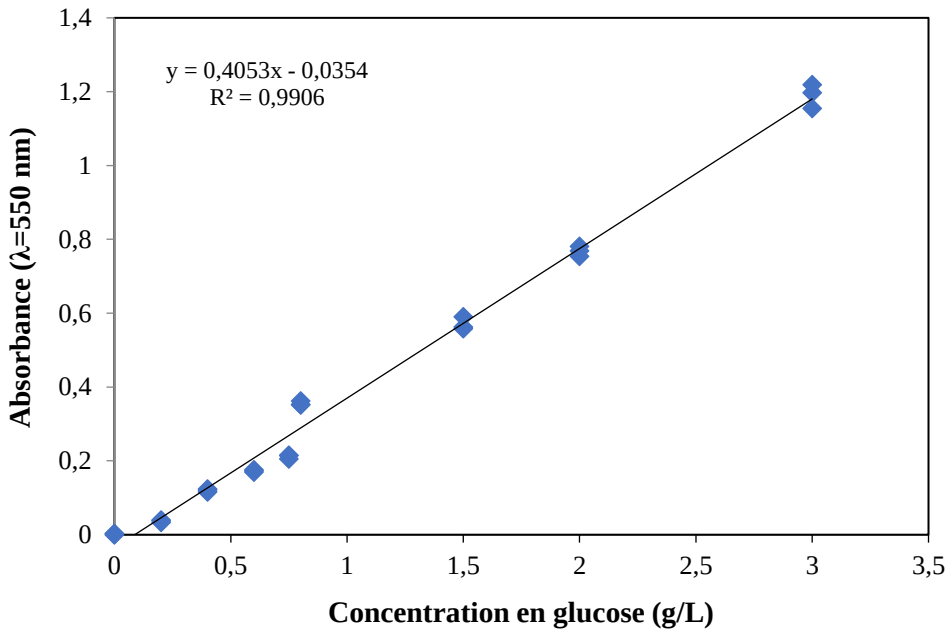


Figure 60 : Droite d'étalonnage pour le dosage spectrophotométrique du glucose

7.5 Analyse de l'hydrolysat par Chromatographie Liquide à Haute Performance

7.5.1 Principe

L'analyse chimique des hydrolysats obtenus à partir des différents substrats prétraités a permis la détermination des concentrations en sucres monomères libérés (majoritairement glucose et xylose) ainsi que les composés de dégradation des sucres (Furfural et HMF). La technique d'analyse utilisée est la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), basée sur le partage des éléments à analyser (analytes) entre une phase liquide mobile et une phase stationnaire solide très finement divisée (colonne). Ce partage dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques des analytes (polarité), permettant leur séparation et quantification avec une grande précision. Avant chaque analyse, une quantité adéquate des hydrolysats a été filtrée à travers des filtres de type PTFE (0,45 µm) et disposée par la suite dans des vials.

7.5.2 Dispositif expérimental

Pour la quantification des monosaccharides, nous avons utilisé le système HPLC (Agilent, 1260 Infinity series) équipé d'une colonne ICSep transgénomique ORH-801 (300 mm x 6,5 mm, Interchim) et couplée au détecteur par réfractométrie différentielle. L'indice de réfraction est mesuré à 35 °C. La phase mobile est constituée d'acide sulfurique dilué à 0,01 M et injecté à température ambiante à un débit de 0,6 mL/min.

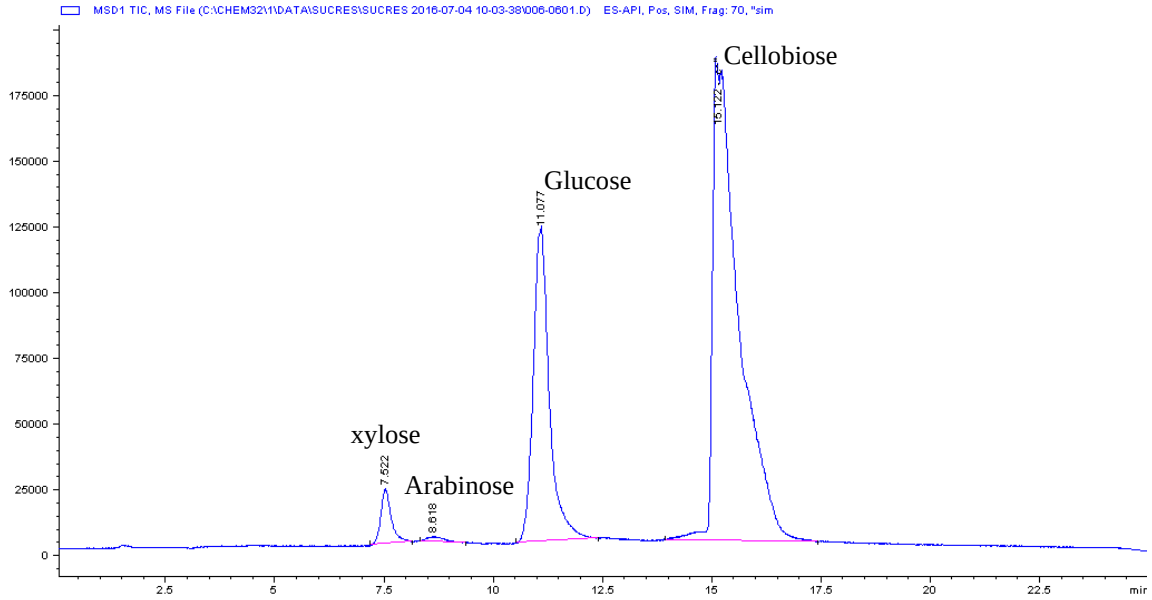


Figure 61 : Exemple de chromatogramme d'un mélange de sucres standards

Figure 62 : Système HPLC

Les composés de dégradation des sucres (Furfural et HMF) ont été quantifiés en utilisant le système HPLC (Agilent, 1100 series) équipé d'une colonne Synergi Hydro RP 80A (250 mm × 4,6 mm, 4,0, Phenomenex, USA) et couplé au détecteur par spectrophotométrie UV/Visible (PDA, Agilent 1100) à une longueur d'onde de 280 nm. La phase mobile est composée d'un tampon phosphate de potassium à 30 mM (pH 2,5) et du méthanol à 80:20 (v/v). Le débit a été fixé à 1 mL/min et la température à 45 °C.

Dans les deux cas d'analyses, l'élution a été effectuée en mode isocratique. Les produits standards des composés analysés ont été utilisés comme étalons dans la calibration. L'acquisition et le traitement des données (détermination des temps de rétention et intégration de l'air des pics) ont été effectués grâce au logiciel ChemStation.

7.6 Calcul du rendement global en sucres réducteurs

Le rendement global en sucres réducteurs libérés après le prétraitement et l'hydrolyse enzymatique a été calculé en se basant sur la quantité de polysaccharides présente initialement dans le substrat, selon la relation ci-dessous (Abraham et al., 2013) :

$$Rendement\ global\ en\ sucres\ réducteurs\ (\%) = \frac{Sucres\ réducteurs\ libérés\ (g)}{polysaccharides\ dans\ le\ substrat\ (g)} * 100 \quad \text{Eq. 34}$$

7.7 Calcul du rendement de conversion cellulosique

Le rendement de conversion cellulosique ayant lieu pendant l'hydrolyse enzymatique a été calculé en se basant sur la quantité en cellulose présente initialement dans le substrat, selon la relation ci-dessous :

$$Rendement\ de\ conversion\ cellulosique\ (\%) = \frac{glucose\ libéré\ (g)}{cellulose\ initiale\ dans\ le\ substrat\ (g)} * 100 \quad \text{Eq. 35}$$

8. FERMENTATION DES HYDROLYSATS

Le processus de fermentation a été réalisé afin de convertir les sucres monomères libérés lors de l'hydrolyse enzymatique, en l'occurrence l'hydrolysat, en éthanol. Avant la fermentation, une étape préliminaire de conditionnement de l'hydrolysat a été menée, afin de favoriser la fermentation alcoolique via les souches de levure.

8.1 Conditionnement de l'hydrolysat avant fermentation

8.1.1 Ajustement du pH

L'ajustement du pH des hydrolysats a été nécessaire afin de s'approcher des conditions favorables pour la croissance de la levure. Nous avons modifié alors ce paramètre par ajout de solution dilué d'acide sulfurique ou d'hydroxyde de sodium pour atteindre le pH désiré.

8.1.2 Concentration des sucres

La concentration des sucres présents dans l'hydrolysat obtenus après hydrolyse enzymatique constitue une étape de conditionnement avant fermentation. Elle a été effectuée par évaporation d'un volume bien déterminé d'eau, tout en gardant un volume d'hydrolysat suffisant pour la fermentation. Le rotavapeur utilisé (Buchi, Rotavapor R210) a été réglé à une température de 50 °C et à une pression de 80 mbar.

8.2 Protocole de fermentation

Avant de démarrer la fermentation, le matériel utilisé a été stérilisé dans un autoclave à vapeur pendant 20 minutes à la température de 120 °C afin d'éviter toute sorte de contamination. La préculture de la souche de levure *Saccharomyces cerivisae* a été effectuée dans 5 mL du milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose). Ce dernier est composé d'éléments nécessaires pour le développement du microorganisme (Peptone pancréatique de viande 10 g/L, glucose 20 g/L, sulfate d'ammonium 1,2 g/L, extrait de levure 10 g/L). La levure a été incubée dans une étuve à 30 °C pendant 24 h. La fermentation de l'hydrolysat préalablement préparé et filtré à 0,22 µm a été ensuite réalisée dans un erlenmeyer stérilisé à un volume total de 20 ml. Les conditions de fermentation ont été déterminées en étudiant l'effet d'un certain nombre de facteurs sur la fermentation du glucose standard, à savoir : La concentration initiale en glucose, la concentration volumique en levure, le pH, l'ajour des nutriments, la température, le temps d'agitation et le temps de fermentation.

8.3 Analyse du taux de croissance des cellules de levure

La mesure de la densité cellulaire avant et après fermentation indique l'aptitude de la levure à se développer dans le mélange préparé. Cette mesure a été réalisée par détermination de la densité optique (DO) par la technique de spectrophotométrie, à une longueur d'onde de 620 nm. Des prélèvements du milieu de fermentation ont été effectués avant fermentation (juste après l'inoculation des levures dans le mélange) et après fermentation (72h).

Figure 63 : Incubateur de fermentation (Ecotron, INFORS HT)

8.4 Dosage de l'éthanol

Afin d'évaluer la quantité d'éthanol produit lors de la fermentation, des analyses de l'hydrolysat fermenté ont été conduites en utilisant le système de détermination du taux d'alcool Alcolyzer Plus (Anton Paar). Ces analyses ont été effectuées dans la plateforme de la brasserie du département de biotechnologies de l'Université de La Rochelle.

8.5 Calcul du rendement en éthanol

Les rendements en éthanol ont été calculés en se basant sur la concentration en sucres présente initialement dans l'hydrolysat avant fermentation. L'équation est comme suit :

$$Rendement\ en\ éthanol\ (\%) = \frac{Ethanol\ produit\ (g)}{Masse\ initiale\ en\ glucose\ (g) * 0{,}51} * 100 \qquad \text{Eq. 36}$$

9. SCHEMA GLOBAL DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE DU PROCEDE DE BIOCONVERSION ETUDIE

Ce travail de thèse repose sur le développement d'un procédé de bioconversion de la matière lignocellulosique en éthanol. Le schéma de la démarche expérimentale adoptée est résumé dans la figure ci-dessous.

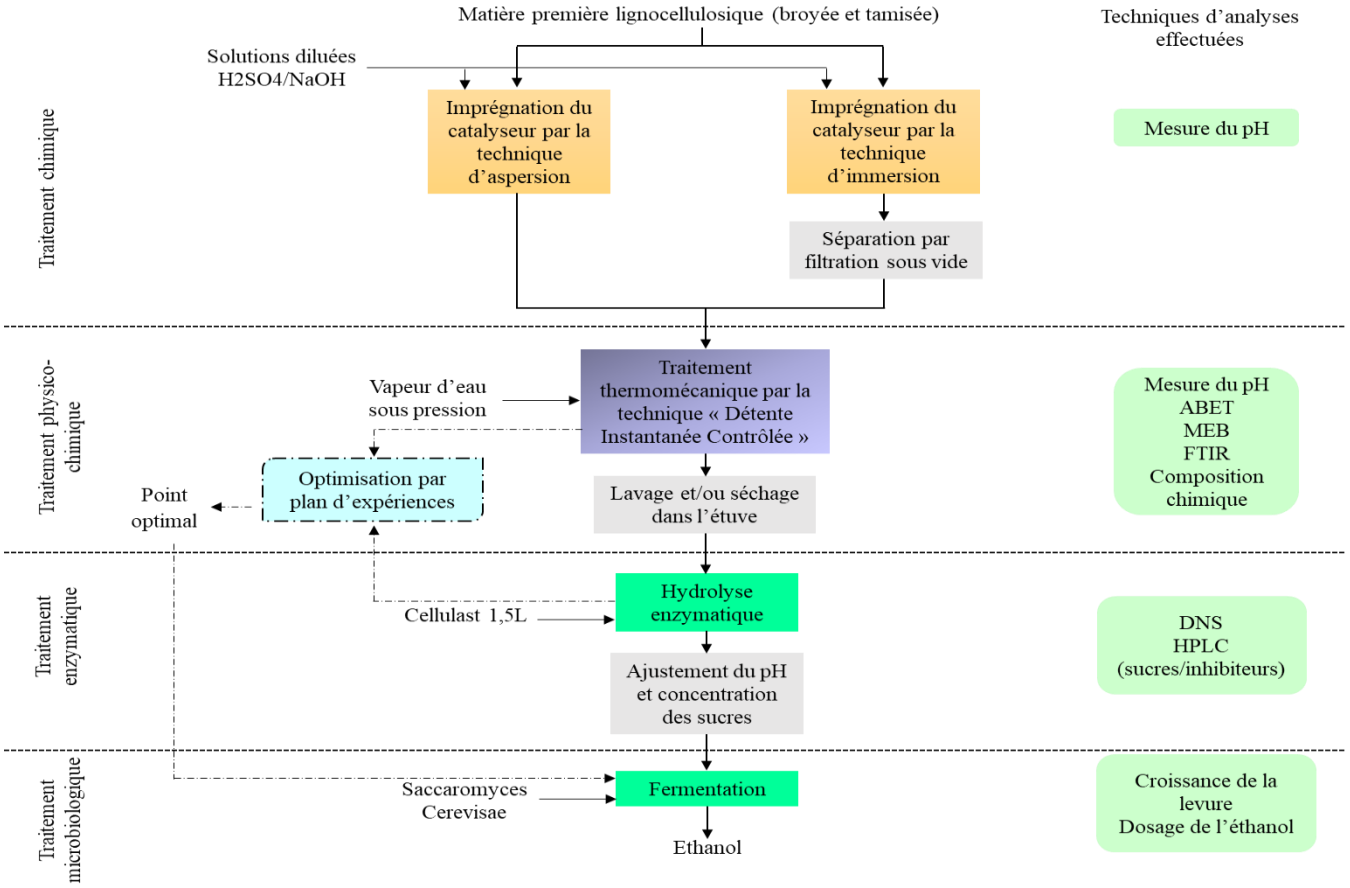


Figure 64 : Schéma global de la démarche expérimentale adoptée dans le procédé de bioconversion étudié.

Chapitre 3 :

Caractérisation physique et chimique et impact du prétraitement combiné sur la modification structurale de la biomasse d'étude

Table des matières

1. INTRODUCTION 105
2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA MATIERE 105
2.1 Caractérisation microscopique 105
2.1.1 Observation sous loupe binoculaire 105
2.1.2 Observation sous microscope électronique à balayage 105
2.2 Caractérisation structurale et texturale 106
2.2.1 Analyse structurale par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier 106
2.2.2 Analyse de la surface spécifique par la méthode BET 108
2.3 Détermination de la composition chimique 109
2.3.1 Matière sèche, taux en matières organique et minérale 109
2.3.2 Composition pariétale : Cellulose, hémicellulose et lignine 110
2.4 Détermination de la capacité d'absorption 111
3. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR LA CHENEVOTTE 112
3.1 Prétraitement du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion 112
3.1.1 Modification structurale et chimique 113
3.1.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier 117
3.1.3 Diffraction par rayons X 120
3.1.4 Observation par microscopie électronique à balayage 122
3.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion ou immersion 125
3.2.1 Modifications structurales et chimiques 126
3.2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier 130
3.2.3 Diffraction par rayons X 132
3.2.4 Observations par microscopie électronique à balayage 134
4. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR L'ALFA 136
4.1 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion 137
4.1.1 Modifications structurales et texturales 138
4.1.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier 139
4.1.3 Diffraction par rayons X 142
4.1.4 Observations par microscopie électronique à balayage 144
4.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion et immersion 146
4.2.1 Modifications structurales et texturales 147
4.2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier 149
4.2.3 Diffraction par rayons X 151
4.2.4 Observations par microscopie électronique à balayage 152
5. CONCLUSION 153

Liste des figures

Figure 65 : Matière première observée sous loupe binoculaire. (a): chènevotte, (b): alfa (Barre échelle: 2mm, grossissement X11)..... 106

Figure 66 : Structure en microscopie électronique à balayage d'une coupe longitudinale de la chènevotte (a) et de l'alfa (a)..... 106

Figure 67 : Spectres FTIR des matières lignocellulosiques étudiées. (a) : chènevotte, (b) : alfa 107

Figure 68 : Surface spécifique des deux substrats étudiés en comparaison avec d'autres matières lignocellulosique. Intervalle de la taille des particules : (a) : 1-8 mm (Maache-Rezzoug et al., 2015), (b) : 0,15-0,5 (Nitsos et al., 2013) et (c) : ≥ 0,42 mm(Wei Hsin Chen et al., 2011). 109

Figure 69 : Cinétique de la variation de la teneur en eau de la chènevotte et de l'alfa 111

Figure 70 *:* Photos de la chènevotte native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions acides..... 113

Figure 71 : Variation de la composition chimique et la surface spécifique de la chènevotte prétraitée par DIC en conditions acides à différentes concentrations par les deux techniques d'imprégnation : aspersion (a), immersion pendant 10 min (b) et 30 min (c) 116

Figure 72 : Spectres FTIR de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique imprégné à différentes concentrations par aspersion (A) et immersion (B) 119

Figure 73 : Evolution des spectres de diffraction des rayons X de la chènevotte native et prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique par aspersion (A), et immersion (B). 121

Figure 74 : Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par aspersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif (A), sans catalyseur à X300 (B_1) et X1000 (B_2), 10% à X300 (C_1) et X1000 (C_2), 20% à X300 (D_1) et X1000 (D_2), 30% à X300 (E_1) et X1000 (E_2) 123

Figure 75 : Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par immersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif à X300 (A), 0,6% à X300 (B_1) et X1000 (B_2), 1% à X300 (C_1) et X1000 (C_2), 2% à X300 (D_1) et X1000 (D_2), 3% à X300 (E_1) et X1000 (E_2) 124

Figure 76 : Photos de la chènevotte native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions alcalines 125

Figure 77 *:* Variation de la composition chimique et de la surface spécifique de la chènevotte imprégnée par de l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (a) et immersion pendant 10 min (b) et 30 min (c) et prétraitée par DIC. 129

Figure 78 : Spectres FTIR de la chènevotte préalablement imprégnée à différentes concentrations de l'hydroxyde de sodium (aspersion (A) et immersion (B)) et traitée thermomécaniquement par le procédé DIC. 131

Figure 79 : Spectres de diffraction des rayons X de la chènevotte non traitée et prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium imprégné par aspersion(A) et immersion (B). 133

Figure 80: Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; imprégnation par aspersion à différentes concentrations en hydroxyde de sodium : natif à X300 (A), sans agent alcalin (0%) à X300 (B_1) et X500 (B_2) ; 10% à X300 (C_1) et X500 (C_2) ; 20% à X300 (D_1) et X500 (D_2) ; 30% à X300 (E_1) et X500 (E_2) 135

Figure 81: Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par immersion à différentes concentrations en hydroxyde de sodium : natif à X300(A) ; 0,6% X300 (B1) et X1000 (B2) ; 1% à X300 (C1) et X1000 (C2) ; 2% à X300 (D1) et X1000 (D2) ; 3% à X300 (E1) et X1000 (E2) 136

Figure 82 : Photos de l'alfa native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de H_2SO_4 137

Figure 83 : Variation de la composition chimique et de la surface spécifique de l'alfa prétraitée par DIC combiné à l'imprégnation de l'acide sulfurique à différentes concentrations, (a) : aspersion et (b) : immersion. 141

Figure 84 *:* Spectres FTIR de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique imprégné par aspersion à différentes concentrations 142

Figure 85 : Spectres de diffraction des rayons X de l'alfa non traitée et prétraitée en présence de l'acide sulfurique par aspersion (A) et immersion(B) 144

Figure 86 : Images par MEB à différents grossissements de l'alfa prétraitée ; imprégnation par aspersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif à X300(A), 0% à X300(B_1) et X1000(B_2), 5% à X200(C), 10% à X300(D_1) et X1000(D_2), 15% à X500(E_1) et X10000(E_2). 145

Figure 87 : Photos de l'alfa native et de celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions alcaines. 146

Figure 88 : Variation de la composition chimique de l'alfa imprégnée par l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (a) et immersion (b) et prétraitée par DIC 149

Figure 89 : Spectres FTIR de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium imprégné par aspersion à différentes concentrations 150

Figure 90 : Diagrammes de diffraction des rayons X de l'alfa native et prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (A) et immersion (B) 151

Figure 91 *:* Images par MEB de l'alfa imprégnée de l'hydroxyde de sodium par aspersion et thermomécaniquement traitée : natif à X200(A) ; 5% à X200(B) ; 10% à X200(C_1) et X1000(C_2) ; 15% à X200(D_1) et X1000(D_2). 153

1. INTRODUCTION

Ce chapitre porte dans un premier temps sur la caractérisation des deux matières lignocellulosiques objet de l'étude en tant que sources d'hollocelulose, à savoir la chènevotte et l'alfa. L'objectif de la caractérisation de la matière à l'état natif est d'acquérir les connaissances nécessaires pour évaluer son potentiel pour une valorisation dans le procédé de bioconversion en bioéthanol. Dans un second temps, différentes techniques physico-chimiques de caractérisation ont été étudiées qui visent à analyser l'impact des prétraitements appliqués sur les modifications des caractéristiques structurale, chimique et morphologique des substrats prétraités. Les facteurs clés influençant l'étape ultérieure de saccharification enzymatique ont été particulièrement appréhendés, à savoir la variation de la composition (teneur en hémicellulose, lignine et cellulose) ainsi que la surface spécifique développée par le substrat et qui permet l'accès aux différents sites actifs. L'impact du prétraitement thermomécanique par le procédé DIC combiné à la présence d'un catalyseur chimique (acide sulfurique ou l'hydroxyde de sodium de la chènevotte) ainsi que leur mode d'imprégnation a été alors évalué et les résultats ont été analysés en termes de modifications structurales, chimiques et morphologiques produites au sein des deux types de biomasses.

2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA MATIERE

2.1 Caractérisation microscopique

2.1.1 Observation sous loupe binoculaire

L'observation sous loupe binoculaire de la chènevotte et de l'alfa, préalablement broyées et tamisées, a permis d'analyser les reliefs de leurs morphologies externes (Figure 65). On peut remarquer que la chènevotte se présente sous forme de morceaux solides de couleur jaunâtre qui s'apparentent à des copeaux de bois. Tandis que l'alfa se présente plutôt sous forme de fragments fibreux de couleur brunâtre. Les dimensions des deux matières premières ont été analysées par le logiciel LAS (Leica Application Suite). La chènevotte a une longueur moyenne de 6,3 ± 0,9 mm et un diamètre moyen de 1,9 ± 0,5 mm, tandis que l'alfa a une longueur et un diamètre moyen de 11 ± 2,2 mm et 0.7 ± 0.1 mm, respectivement.

2.1.2 Observation sous microscope électronique à balayage

Les observations de la microstructure de la chènevotte et de l'alfa à l'état natif ont été réalisées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). La Figure 66, (a) montre un aspect intact de la chènevotte avec une surface externe lisse et une surface interne qui fait apparaitre une structure fibrillaire ainsi que des faisceaux vasculaires de cellules végétales. La Figure 66, (b) montre la surface d'une tige d'alfa avec une structure particulière ; la présence de plusieurs poils répartie de façon homogène. La présence de ces poils permet à l'alfa, plante qui pousse

dans des milieux arides et semi arides, d'empêcher le processus d'évaporation de l'eau (Hanana et al., 2015).

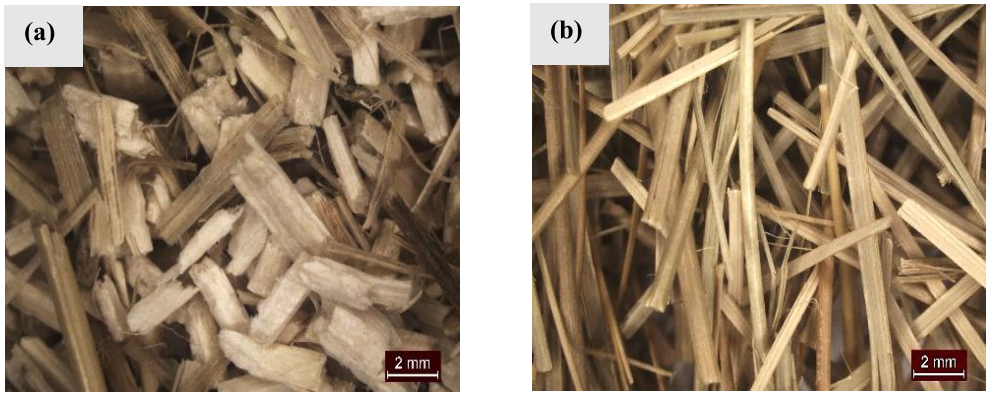


Figure 65 : Matière première observée sous loupe binoculaire. (a): chènevotte, (b): alfa (Barre échelle: 2mm, grossissement X11)

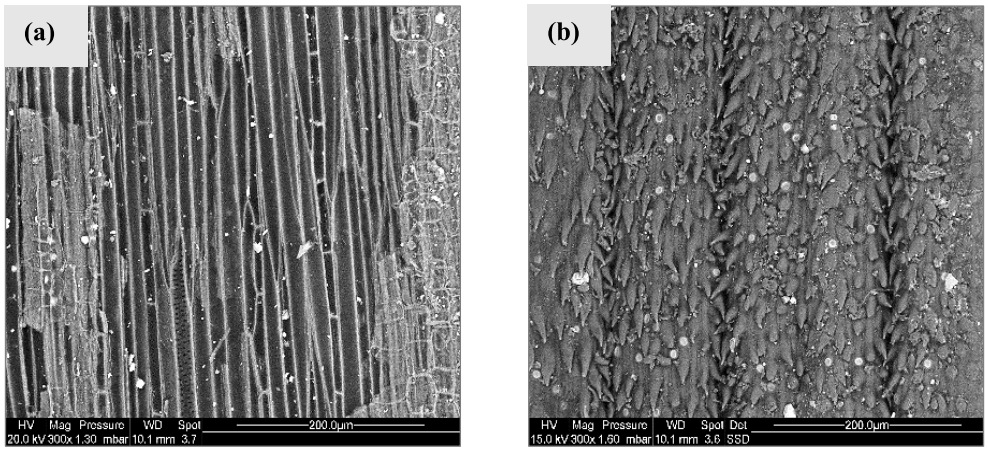


Figure 66 : Structure en microscopie électronique à balayage d'une coupe longitudinale de la chènevotte (a) et de l'alfa (a).

2.2 Caractérisation structurale et texturale

2.2.1 Analyse structurale par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est l'un des outils spectroscopiques les plus utilisés pour l'étude des matières biologiques car elle permet l'identification des molécules organiques via la détermination des différents types de liaisons et groupements fonctionnels structurant la matière. En effet, chaque liaison chimique est caractérisée par une fréquence de résonnance qui lui est propre. Lorsque la matière reçoit un rayonnement à une fréquence identique, elle absorbe cette radiation, en générant un spectre d'absorbance ou de transmittance du signal initialement émis. L'intervalle du nombre d'onde correspondant au domaine infrarouge s'étend de 400 à 4000 cm^{-1}.

Lors de cette étude, l'analyse structurale par FTIR a été d'abords utilisée pour évaluer la structure de la chènevotte et de l'alfa avant prétraitement pour ensuite les comparer avec celles prétraitées, dans le but de mettre en évidence des différences liées aux conditions de prétraitement appliqué. Les spectres obtenus sont présentés dans la Figure 67, où les pics ont été attribués en se basant sur des données de la littérature.

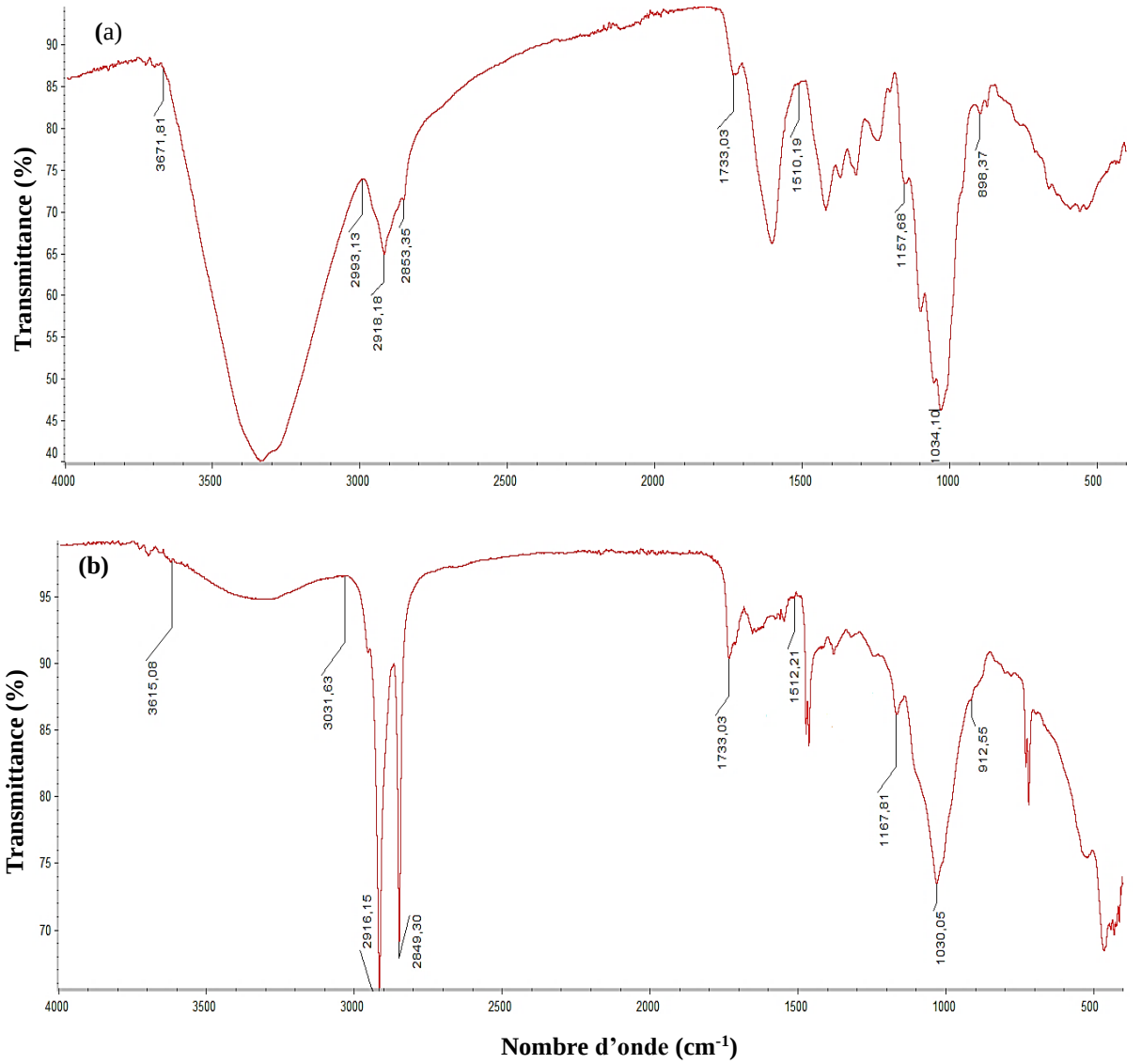


Figure 67 : Spectres FTIR des matières lignocellulosiques étudiées. (a) : chènevotte, (b) : alfa

Le balayage des spectres de la chènevotte et de l'alfa permet d'identifier un certain nombre de pics d'absorbance semblables entre les deux spectres. Les pics aux nombres d'ondes de 1030 et 1160 cm^{-1} sont attribués respectivement aux vibrations d'élongation des liaisons C-O et C-O-C, caractéristiques des fractions cellulosiques et hémicellulosique. Le pic à 1733 cm^{-1} est attribué aux groupements acétyles contenus dans les hémicelluloses. Le pic à 1510 cm^{-1} est attribué à la vibration de la double liaison C=C contenue dans la lignine. Les bandes intenses d'absorption se situant dans l'intervalle 3031-3615 cm^{-1}, 2849 et 2916 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongation des liaisons O-H, C-H et C-H_2, fortement présentes dans la biomasse lignocellulosique (Borchani et al., 2015; Dallel, 2012; El Achaby et al., 2018;

Gandolfi et al., 2013b; Stevulova et al., 2014). La présence de ces différents pics dans nos deux substrats est cohérente avec la littérature (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). Les pics à 1425, 1376 et 1323 cm^{-1} ont été attribués à la cellulose cristalline, tandis que celui à 912 cm^{-1} a été attribué par Pereira et al. (2016) à la cellulose amorphe.

Parmi les différences que nous avons observées entre les deux spectres est que l'intensité du pic à 1733 cm^{-1}, caractéristique des groupements acétyles contenus dans les hémicelluloses, est plus intense pour l'alfa suggérant une proportion plus importante de ces groupements. Ce résultat est validé par le fait que les plantes herbacées (herbes ou résidus agricoles) se caractérisent par une teneur en hémicelluloses plus élevée que dans le bois (R. Kumar et al., 2009a). Inversement, le pic à environ 3300 cm^{-1}, correspondant aux groupements hydroxyles présents dans les trois fractions lignocellulosiques mais avec une présence importante dans la lignine, est plus intense dans la structure de la chènevotte. Ce résultat corrobore l'analyse de la composition des deux matériaux qui a montré une plus grande proportion de lignine dans la chènevotte.

2.2.2 Analyse de la surface spécifique par la méthode BET

L'analyse de la surface spécifique de la chènevotte et l'alfa, permet de déterminer la surface réelle des ports ouverts disponibles aux différents échanges mis en jeu. Une surface d'échange plus importante contribue à favoriser les mécanismes réactionnels lors des opérations de prétraitement et d'hydrolyse enzymatique ultérieures.

La Figure 68 illustre les résultats obtenus pour la chènevotte et l'alfa, ainsi qu'une comparaison avec d'autres matières lignocellulosiques utilisées pour la bioconversion en éthanol. Nous remarquons que la chènevotte possède une surface spécifique trois fois plus importante que celle de l'alfa. Il est à noter que les dimensions des particules de la chènevotte sont inférieures à celles de l'alfa. En général, la surface spécifique d'un substrat lignocellulosique augmente inversement à la taille des particules divisées lors du broyage. Cette augmentation améliore les phénomènes de transfert de masse et de chaleur lors des traitements physico-chimiques, mais aussi facilite l'accessibilité à la matrice par les enzymes lors de l'hydrolyse enzymatique. La digestibilité du substrat peut être aussi renforcé lorsque le volume des pores est suffisamment grand, pour contenir les enzymes de différentes tailles et maintenir l'action synergique du système des cellulases (Sun et al., 2016).

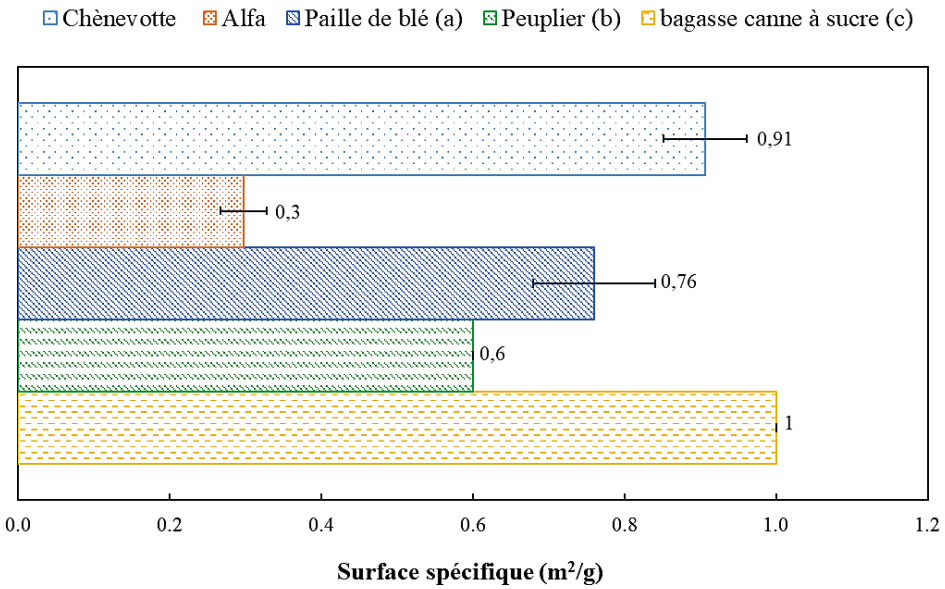


Figure 68 : Surface spécifique des deux substrats étudiés en comparaison avec d'autres matières lignocellulosique. Intervalle de la taille des particules : (a) : 1-8 mm (Maache-Rezzoug et al., 2015), (b) : 0,15-0,5 (Nitsos et al., 2013) et (c) : ≥ 0,42 mm(Wei Hsin Chen et al., 2011).

2.3 Détermination de la composition chimique

La détermination de la composition chimique a été effectuée selon deux protocoles expérimentaux (Van soest et NREL), afin de quantifier les principales fractions contenues dans les deux substrats étudiés. Nous avons déterminé dans un premier temps la teneur en matière sèche, en matière organique et minérale. Les informations obtenues suite à cette caractérisation ont permis d'évaluer le potentiel des deux matières premières dans le procédé de bioconversion en bioéthanol.

2.3.1 Matière sèche, taux en matières organique et minérale

Les résultats de la teneur en matière sèche, organique et minérale de la chènevotte et de l'alfa sont regroupés dans le Tableau 6. Nous remarquons que la matière sèche est majoritaire pour les deux matières premières avec des teneurs en eau de 8,47±0.04 et 9,33±0.21 g H_2O/g MS, pour la chènevotte et l'alfa, respectivement. La teneur en matière minérale est légèrement plus élevée pour la chènevotte. Malester et al. (1988) et Morinelly et al. (2009) ont montré que les propriétés intrinsèques de la matière lignocellulosique, notamment sa teneur en matière minérale, lui procure une certaine capacité de neutralisation, influençant ainsi l'activité d'un agent acide susceptible d'être impliqué dans le procédé de prétraitement.

Tableau 6 : Teneur en matière sèche, organique et minérale de la chènevotte et de l'alfa

Matières premières	%MS	%MO	%MM
Chènevotte	92,19±0,04	95,26±0,28	4,74±0,28
Alfa	92,18±0,55	96,67±0,02	3,33±0,02

2.3.2 Composition pariétale : Cellulose, hémicellulose et lignine

Le dosage des constituants de la chènevotte et l'alfa a été effectué selon deux protocoles. Le premier protocole réalisé est celui de Van Soest (Van Soest et al., 1991), basé sur des attaques successives par des détergents neutre et acide, contribuant à solubiliser différentes fractions à savoir les extractibles, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Le pourcentage massique de chaque fraction et déduit par perte de masse. Le deuxième protocole est basé sur l'hydrolyse acide en deux étapes des polymères de cellulose et hémicelluloses dans deux solutions d'acide sulfurique à concentrations et températures différentes. Les monosaccharides obtenus sont quantifiés par HPLC, la lignine étant le résidu restant après hydrolyse acide est quantifié par gravimétrie après élimination de la masse des cendres.

La composition chimique de la chènevotte et l'alfa déterminée sur la base de la matière sèche est présentée dans le Tableau 7. Nous pouvons relever que les résultats obtenus par la méthode Van Soest, en comparaison avec la méthode NREL montrent une surestimation de la fraction cellulosique, et une sous-estimation de la fraction hémicellulosique. La méthode de Van Soest fournit peu d'informations structurales des fractions extraites. Elle pourra être utilisée comme méthode de prédiction approximative de la teneur en holocellulose. En revanche, la méthode NREL permet de fournir des informations à la fois qualitatifs et quantitatifs avec plus de précision en termes de molécules de sucres qui entrent dans la composition du substrat lignocellulosique. Cette dernière méthode est alors retenue pour l'analyse de la composition du substrat après prétraitement.

Les résultats montrent que la fraction majoritaire dans les deux matières à l'état natif est l'holocellulose, comprenant la cellulose et les hémicelluloses. Cette fraction est de 73,3 et 73,14% pour la chènevotte et l'alfa, respectivement. Ces résultats concorde avec ceux obtenus par Bassil (2015), Brazdausks et al. (2015) et Hanana et al. (2015). La teneur en lignine est plus importante pour la chènevotte alors que la teneur en hémicellulose est plus élevée pour l'alfa. Ce constat vient appuyer le fait que la chènevotte appartient à la famille des plantes ligneuses (le bois). La lignine mesurée lors de cette étude pour les deux matières premières correspond à la lignine insoluble dans l'acide ou lignine de Klason. Il convient de mentionner que, dans le cas de la chènevotte, la teneur en composants pariétaux peut varier en fonction de la hauteur de la tige de chanvre et du temps de la récolte (Rehman et al., 2013). Les résultats obtenus sont comparables à ceux rapportés pour d'autres matières lignocellulosiques (Gaur et al., 2016; Maache-Rezzoug et al., 2015; Zaafouri et al., 2016). Au regard de la composition de la chènevotte et de l'alfa, nous pouvons conclure qu'ils constituent des ressources potentielles pour la bioconversion.

Tableau 7 : Composition chimique des deux substrats lignocellulosiques étudiés en (%MS)

Matière première	Fraction pariétale	Méthodes utilisées		Autres travaux
		Van soest	NREL	
Chènevotte	Extractibles	9,59±2,88	---	5,1[(a)]
	Cellulose	58,91±3,61	56,38±2,94	47,3[(a)]
	Hémicelluloses	12,69±4,23	17,78±0,54	24,6[(a)]
	Lignine	14,07±1,35	21,22±2,53	22,4[(a)]
Alfa	Extractibles	12,17±0,30	---	---
	Cellulose	65,57±1,58	47,47±1,98	43,9± 0,53 [(b)]
	Hémicelluloses	9,61±0,49	25,19±1,27	27,67± 0,35 [(b)]
	Lignine	12,65±0,79	17,01±0,71	17,96± 0,5 [(b)]

(a), (b) : Etudes réalisés par la méthode NREL/TP-510-42618 par les auteurs (Brazdausks et al., 2015) et (Hanana et al., 2015), respectivement.

2.4 Détermination de la capacité d'absorption

La capacité d'absorption de la chènevotte et de l'alfa a été déterminée par suivi de la variation de la teneur en eau après immersion dans l'eau à différents temps jusqu'à absorption maximale (Figure 69). La capacité d'hydratation est gouvernée par la structure du substrat, notamment sa surface spécifique, mais aussi par sa teneur en composés hydrophiles. La teneur en eau maximale obtenue pour la chènevotte et l'alfa est de 4,3 et 4,5 (g H_2O/g MS), respectivement.

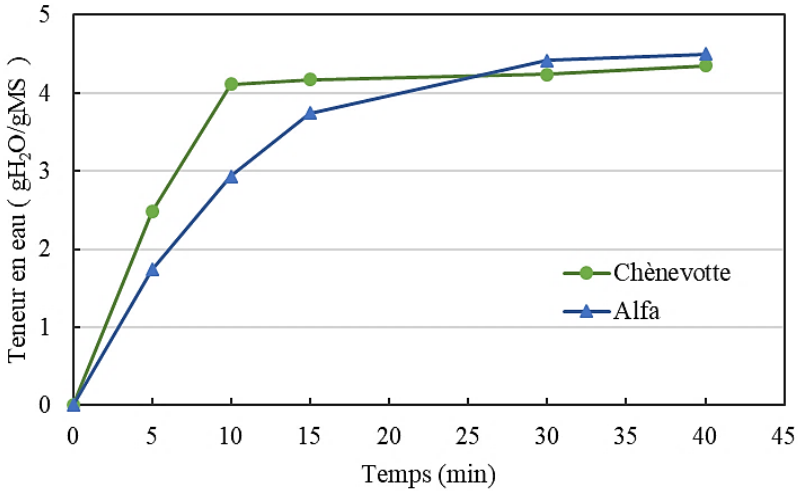


Figure 69 : Cinétique de la variation de la teneur en eau de la chènevotte et de l'alfa

Le suivi de la cinétique permet d'observer une première phase rapide, où une quantité importante d'eau est absorbée dès les premières minutes d'immersion, elle correspond au remplissage des pores les plus volumineux dans la matière. Cette phase est suivie par une deuxième plus lente correspondant au remplissage des pores peu volumineux. Nous pouvons remarquer que la première phase d'absorption est plus rapide pour la chènevotte. Par ailleurs, l'alfa avec une vitesse d'absorption moins rapide a fini après 25 minutes d'immersion

d'atteindre le taux d'absorption de la chènevotte, ce qui est en cohérence avec les résultats d'analyse de la surface spécifique précédemment présentées. Nous remarquons un gonflement sensible du volume de la chènevotte liée à l'absorption du liquide.

3. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR LA CHENEVOTTE

L'impact du prétraitement thermomécanique combiné à des conditions acides ou basiques a été analysé par comparaison avec le substrat natif. La concentration de l'agent chimique ainsi que la technique de son imprégnation au sein de la matière ont été évalués. Les modifications structurales, chimiques et morphologiques ont été analysées, notamment la variation de la teneur en hémicelluloses et lignine, ainsi que la surface spécifique, principaux facteurs affectant l'efficacité du procédé de bioconversion.

3.1 Prétraitement du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion

L'activité de l'acide sulfurique a été combinée au traitement thermomécanique. En effet, le prétraitement par le procédé hydro-thermo-mécanique DIC « Détente Instantanée Contrôlée » est obtenu par une montée rapide de la température par injection de la vapeur d'eau sous pression ne dépassant pas 0,7 MPa, suivie par une chute brutale de la pression vers le vide, entraînant une flash évaporation de l'eau et donc une baisse de la température (de l'ordre de 30 °C). La détente vers le vide contribue à intensifier l'effet mécanique obtenu par cisaillement de la matière. Ce procédé est considéré comme une variante de la technique d'explosion à la vapeur (*Steam explosion*), technique conventionnelle largement utilisée pour le prétraitement de la matière lignocellulosique (Auxenfans et al., 2017b; Wood et al., 2014). L'explosion à la vapeur utilise cependant des pressions plus élevées, généralement supérieures à 5 MPa (Talebnia et al., 2010), et contrairement au procédé DIC, se termine par une détente vers la pression atmosphérique. Opérant à des températures élevées, l'explosion à la vapeur conduit à des réactions de pyrolyse de la cellulose, et à la formation de composés inhibiteurs de la fermentation qui sont issus de la dégradation des sucres et de la lignine. Afin de diminuer sa sévérité, l'explosion à la vapeur est souvent combinée à une acidification du substrat avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou du dioxyde de soufre (SO_2) (Silverstein et al, 2007 ; Rodriguez et al, 2007)

L'utilisation de H_2SO_4, considéré comme l'un des agents chimiques les plus puissants pour la déstructuration de la matière lignocellulosique, présente alors l'avantage de pouvoir opérer à des températures plus basses (150 à 200 °C contre 250 °C sans catalyseur). H_2SO_4 intervient en tant que catalyseur dans la réaction de dégradation de la liaison glycosidique présente dans la fraction hémicellulosique, en conduisant à sa solubilisation par une hydrolyse en monomères, permettant ainsi de récupérer une solution enrichie en xylose. En revanche, une très grande sévérité du prétraitement peut entraîner une perte non négligeable en pentoses.

En se basant sur les travaux antérieurs traitant de l'explosion à la vapeur et ceux réalisés par Maache-Rezzoug et al. (2011) sur l'application du traitement thermomécanique DIC à la paille

de blé, un domaine de concentration avec du H_2SO_4 a été fixé. L'imprégnation préalable de la biomasse avant le traitement thermique a été effectuée à l'aide des deux techniques : aspersion et immersion. L'intérêt de l'aspersion en comparaison avec l'immersion est qu'elle permet d'éviter de générer des fractions liquides, nécessitant une étape de séparation, réduisant ainsi l'impact environnemental du traitement. La température a été fixée à 165 °C, correspondant à une pression de vapeur d'eau saturée de 0,7 MPa, et le temps de traitement à 30 min. La sévérité du traitement a été estimée par le calcul de l'indice de sévérité combinée (CS) (Maache-Rezzoug et al., 2015).

Les photos suivantes illustrent des changements significatifs dans l'aspect visuel de la matière (Figure 70) après traitement dans les deux cas d'imprégnation ; aspersion (photos du haut) et immersion (photos du bas) par comparaison à la chènevotte non traitée. Le traitement de la chènevotte préalablement acidifiée a provoqué une déstructuration et un brunissement progressif de la matière au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en acide sulfurique. Contrairement au substrat prétraité sans catalyseur, où l'aspect est légèrement modifié par rapport à celui de la matière native.

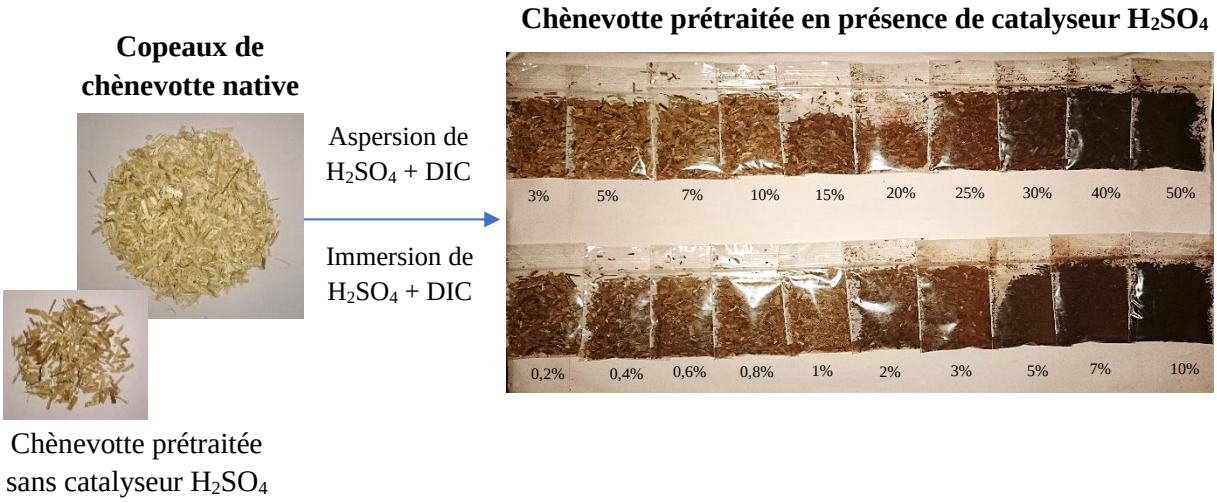


Figure 70 *:* Photos de la chènevotte native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions acides.

3.1.1 Modification structurale et chimique

Le Tableau 8 présente les données des analyses effectuées sur la chènevotte ; le pH avant et après prétraitement thermomécanique, la surface spécifique et la composition chimique. Les concentrations d'acide sulfurique étudiées ont été variées de 3 à 30% (massique) pour l'aspersion et de 0,2 à 10% (massique) pour l'immersion. Comme l'imprégnation par aspersion mobilise de faibles volumes par rapport à la méthode d'immersion, les concentrations utilisées étaient plus élevées. Afin de faciliter la comparaison entre les deux techniques d'imprégnation, les concentrations ont été exprimées en charge d'acide pour 100 g de MS, correspondant à des valeurs allant de 0,94 à 15,73% et 0,58 à 40,02% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement (Tableau 8).

L'indice CS permet une estimation de la sévérité du prétraitement car il combine l'effet des trois conditions du procédé (température, durée et pH). Comme la durée et la température ont été fixées, le seul paramètre qui a varié est le pH, fonction de la concentration d'acide. L'utilisation du CS permet de faciliter la comparaison entre les conditions de notre prétraitement avec ceux cités dans la littérature. On peut remarquer sur le tableau 8, que les valeurs de CS ont augmenté après traitement au fur et à mesure de l'augmentation de l'acidité de l'échantillon ; en passant de -3,3 à 2,2 en tenant en compte des deux techniques d'imprégnation. Ces valeurs restent relativement faibles comparées à ceux mentionnées pour d'autres types de prétraitement. En effet, pour l'explosion à la vapeur d'eau où les températures appliquées sont assez élevées (>160 °C) favorisant le phénomène d'autohydrolyse, l'indice de sévérité atteint des valeurs de 3 à 4,5, ce qui correspond à des conditions sévères de prétraitement pouvant engendrer la dégradation des sucres (Balat, 2011; Chen and Liu, 2015). Comme les températures dans notre étude sont plus basses que celles opérées par l'explosion à la vapeur, l'intégration d'ions H^+ permet l'amélioration du phénomène d'autohydrolyse, favorisant ainsi la déstructuration de la biomasse en brisant les liaisons osidiques du réseau lignocellulosique. Contrairement aux échantillons imprégnés par l'acide sulfurique où le pH reste quasiment identique avant et après traitement DIC, le pH de l'échantillon traité sans imprégnation H_2SO_4, passe d'un pH neutre à une valeur de 5,1 après traitement. Cela est dû au phénomène d'auto-ionisation de l'eau à haute température qui génèrent des ions hydrogène au cours du traitement hydrothermique, ces ions favorisent la libération des acides acétiques contenus dans la fraction hémicellulosique sous forme de groupements acétyles, participant à la baisse des valeurs du pH (Faik, 2013).

La surface spécifique qui est un indicateur de l'accessibilité des enzymes à la cellulose, a été mesurée après le prétraitement. Les valeurs de surfaces spécifiques maximales ont atteint 2,3 m^2/g, 2,1 m^2/g et 2 m^2/g pour les concentrations en H_2SO_4 de 30%, 3% et 3% appliquées par les techniques d'aspersion, immersion à 10 min et à 30 min, respectivement (Tableau 8). Ces valeurs sont environ 2,5 fois plus importantes que celle de l'échantillon natif (0,91 m^2/g). La Figure 71 montre l'augmentation de la surface spécifique en fonction de la concentration en acide sulfurique pour les deux modes d'imprégnations. Une corrélation est alors établie entre la surface spécifique et la concentration en acide sulfurique.

Tableau 8 : Valeurs du pH, indice CS, A_{BET} et la composition chimique de la chènevotte prétraitée en présence de l'acide sulfurique. pH^a et pH^b ont été mesurés avant et après traitement thermomécanique, respectivement.

Essais	IMP	Concentration en H_2SO_4 (%)	Charge en H_2SO_4 (%)	pH^a	pH^b	CS	A_{BET} (m^2/g)	Composition chimique (%MS)		
								CEL	HEM	LIG
Natif	---	---	---	6,7±0,01		---	0,90±0,05	56,38	17,78	21,2
1	---	0	0,00	6,67±0,03	5,07±0,00	-3,3	0,87±0,04	56,17	17,05	19,3
2	Aspersion	3	0,94	4,04±0,04	3,94±0,06	-0,6	1,07±0,04	57,27	17,18	19,4
3		5	1,57	3,27±0,03	3,36±0,04	0,1	1,10±0,04	56,25	17,09	19,0
4		7	2,20	3,05±0,13	3,63±0,39	0,3	1,34±0,04	58,23	13,58	18,6
5		10	3,15	2,63±0,04	2,64±0,1	0,8	1,40±0,04	57,79	11,06	17,5
6		15	4,72	2,29±0,00	2,31±0,01	1,1	1,87±0,04	59,84	10,35	15,6
7		20	6,29	2,21±0,03	2,24±0,02	1,2	2,00±0,04	59,98	9,10	13,2
8		25	7,86	1,99±0,02	2,15±0,07	1,4	1,81±0,04	59,44	8,92	9,8
9		30	9,44	1,80±0,01	2,03±0,11	1,6	2,30±0,07	59,07	8,79	9,5
10		40	12,58	1,44±0,04	1,53±0,04	2,0	---	60,36	8,82	9,5
11		50	15,73	1,15±0,07	1,34±0,01	2,2	---	59,34	8,73	9,6
12	Immersion (10min)	**0,2**	0,66	4,91±0,04	4,79±0,06	-1,5	1,13±0,04	58,44	17,03	19,4
13		0,4	1,49	4,41±0,03	4,47±0,02	-1,0	1,34±0,05	58,56	16,58	19,7
14		0,6	2,01	3,74±0,04	3,68±0,04	-0,4	1,45±0,03	58,66	10,49	16,7
15		0,8	3,08	2,93±0,06	3,01±0,01	0,5	1,45±0,05	59,06	10,30	13,5
16		1	3,93	2,41±0,06	2,14±0,01	1,0	1,82±0,07	59,13	9,98	10,3
17		2	6,66	2,21±0,02	2,13±0,01	1,2	1,45±0,04	59,21	9,26	9,5
18		3	11,78	2,15±0,03	1,61±0,02	1,2	2,08±0,05	59,28	8,75	6,3
19		5	18,10	1,99±0,04	1,61±0,01	1,4	2,07±0,04	59,39	8,40	6,5
20		7	25,97	1,90±0,01	1,55±0,01	1,5	2,06±0,04	59,36	8,28	6,3
21		10	34,46	1,87±0,01	1,51±0,01	1,5	1,31±0,05	59,32	7,85	6,2
22	Immersion (30min)	**0,2**	0,58	4,95±0,05	5,00±0,02	-1,6	1,11±0,07	58,46	17,26	19,6
23		0,4	1,30	4,42±0,03	4,38±0,02	-1,0	1,32±0,04	58,59	17,09	18,7
24		0,6	1,76	3,74±0,03	3,77±0,01	-0,4	1,43±0,03	58,64	15,56	18,3
25		0,8	2,60	3,10±0,02	3,04±0,01	0,3	1,45±0,04	59,10	13,43	14,5
26		1	3,99	2,35±0,02	1,89±0,01	1,1	1,75±0,05	59,17	10,23	12,5
27		2	6,68	2,27±0,03	2,13±0,03	1,1	1,45±0,04	59,28	10,04	9,4
28		3	9,93	2,13±0,01	1,71±0,01	1,3	1,98±0,05	59,30	9,32	5,8
29		5	19,42	2,01±0,01	1,53±0,01	1,4	1,69±0,07	59,32	8,77	5,8
30		7	21,87	1,93±0,01	1,46±0,01	1,5	1,61±0,04	59,29	8,35	5,6
31		10	40,02	1,49±0,01	1,36±0,01	1,9	1,34±0,03	59,23	7,64	5,5

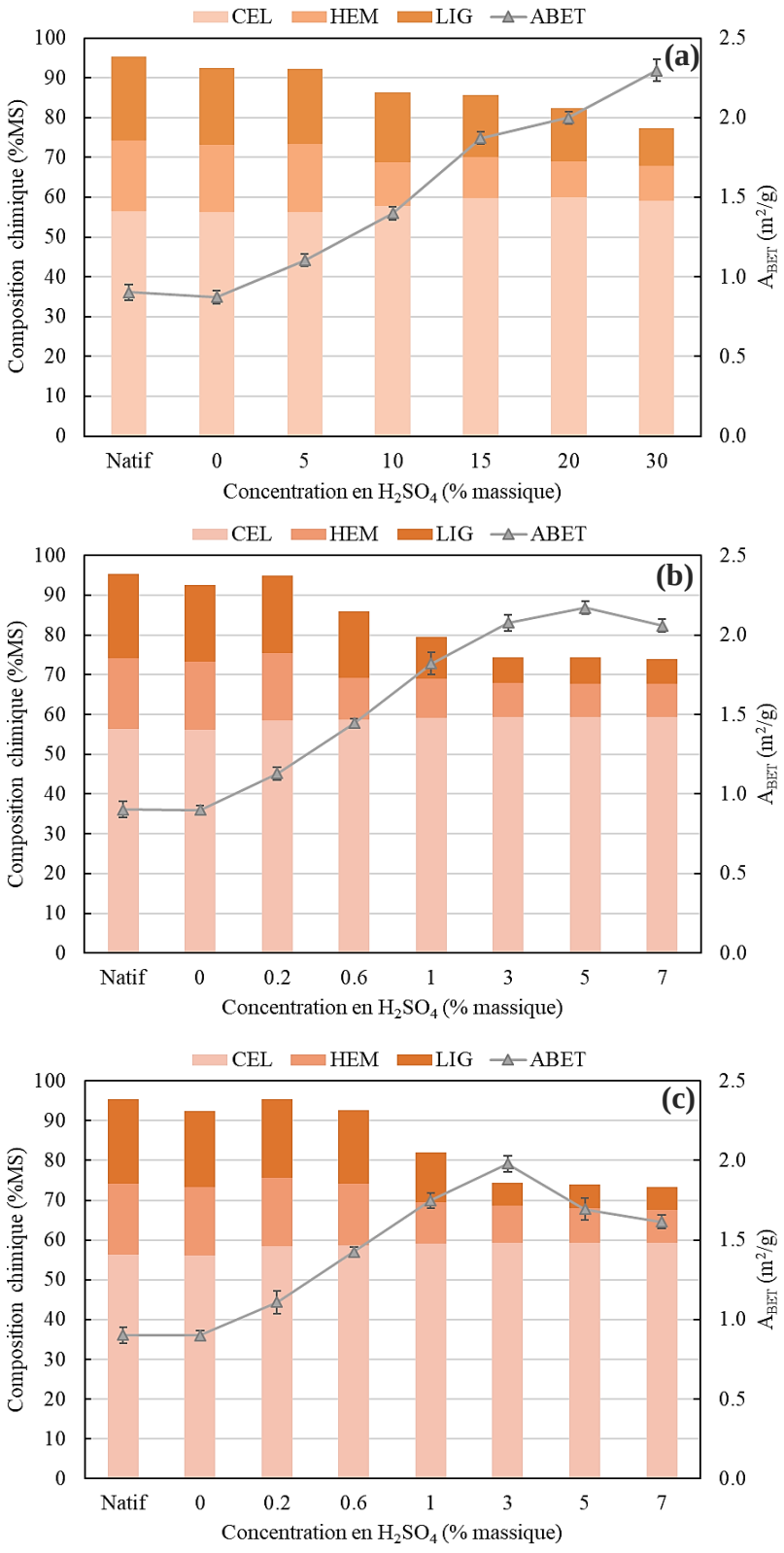


Figure 71 : Variation de la composition chimique et la surface spécifique de la chènevotte prétraitée par DIC en conditions acides à différentes concentrations par les deux techniques d'imprégnation : aspersion (a), immersion pendant 10 min (b) et 30 min (c)

La modification de la surface spécifique est due principalement au phénomène de solubilisation des hémicelluloses, résultat de l'action conjointe du traitement thermique en conditions acides.

En effet, le catalyseur agit en combinaison avec la chaleur apportée par la vapeur saturée, sur la biomasse lignocellulosique par solubilisation de la fraction des hémicelluloses qui est la plus susceptible à cette attaque en raison de son faible poids moléculaire, du faible degré de polymérisation et de la présence de zones amorphes. Ce résultat a été confirmé par l'analyse de la composition des substrats après prétraitement (Tableau 8). Le maximum de réduction de la proportion en hémicelluloses qui est de 48%, 50% et 50% a été obtenu pour des concentrations en acide sulfurique de 20%, 3% et 5% appliqué par aspersion, immersion à 10 min et à 30 min, respectivement. L'échantillon non catalysé, quant à lui, a présenté une valeur de surface spécifique égale à celle du substrat natif et une réduction en hémicelluloses de seulement 4%.

Par-ailleurs, la teneur en cellulose n'a eu qu'une légère augmentation pour les substrats traités, d'une valeur maximale d'environ 4%. Cette augmentation de la teneur en cellulose a été progressive pour les substrats imprégnés par aspersion contrairement à ceux imprégnés par immersion. En revanche la réduction des teneurs en lignine est significative lorsque les concentrations en acide sulfurique augmentent, principalement avec l'imprégnation du substrat par immersion. Il a été rapporté que le prétraitement hydrothermique en conditions acide peut causer la fragmentation de la lignine résultant à une délignification en fonction de la sévérité du traitement (El Hage et al., 2010; Silverstein et al., 2007). Silverstein et al. (2007) ont observé une réduction de la proportion en lignine de 2 à 24% après prétraitement à l'acide dilué des tiges de cotons. L'élimination de la lignine pendant le prétraitement hydrothermique en conditions acides a été démontré parmi les facteurs contribuant à l'amélioration de la digestibilité de la cellulose (Bajpai, 2016; Chen and Liu, 2015; Karimi et al., 2014).

3.1.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier

A l'aide de l'analyse FTIR, nous avons essayé de mette en évidence des différences au niveau de la structure chimique de la chènevotte traitée par le procédé DIC en présence du catalyseur acide, pour les deux techniques d'imprégnation. Dans les Figure 72A et 72B les spectres obtenus après analyse des échantillons traités respectivement par aspersion et immersion pendant 30 minutes sont présentés. Les spectres ont été normalisés afin de pallier aux problèmes de dispersion et avoir une bonne visualisation des différences entre eux. La concentration massique en acide sulfurique a été fixée comme paramètre de comparaison entre les différents essais.

L'identification des pics a été effectuée en se basant sur les données de la littérature et en se référant aux résultats de caractérisation de la chènevotte à l'état natif. Globalement, les spectres obtenus ainsi que la répartition des pics sont similaires à ceux donnés pour d'autres matières lignocellulosiques (Singh et al., 2017, Gandolfi et al., 2014). Deux régions principales sont observées se situant à des longueurs d'onde de 1800 à 700 cm^{-1} et de 3600 à 2700 cm^{-1}, dont certains pics présentent des différences au niveau des intensités.

Le pic observé dans la chènevotte native à la longueur d'onde de 1730 cm^{-1}, et qui correspond typiquement aux vibrations d'élongation du groupe carbonyle C=O présent dans les hémicelluloses (Gandolfi et al., 2014; Pereira et al., 2016; Tabassum et al., 2017), est resté

visible pour le substrat traité sans catalyseur et pour ceux imprégnés par des solutions de H_2SO_4 jusqu'à des concentrations de 10% et 1% par aspersion et immersion, respectivement. Ce pic disparait complètement à partir des concentrations de 15% et 3% pour l'aspersion et immersion, respectivement. Ces résultats sont corroborés avec l'analyse de la composition chimique, où à partir de ces niveaux de concentration en catalyseur, la plupart des hémicelluloses contenus au sein de la chènevotte ont été solubilisés, favorisant ainsi l'accessibilité à la cellulose lors d'une saccharification enzymatique éventuelle.

Le pic observé à la longueur d'onde de 898 cm^{-1} correspond à la présence de la cellulose amorphe, alors que ceux observés aux longueurs d'ondes de 1320, 1370 et 1425 cm^{-1} correspondent à la cellulose cristalline (Pereira et al., 2016). Dans le cas des substrats imprégnés par aspersion, une augmentation légère de l'intensité des pics correspondant à la cellulose cristalline est observée. En revanche, dans le cas de l'immersion, une légère diminution dans l'intensité des pics correspondant à la cellulose cristalline est observée au-delà de l'application d'une concentration de 3% en acide sulfurique.

Par ailleurs, les pics observés aux longueurs d'onde de 1158 et 1200 cm^{-1} sont attribués aux vibrations d'élongation asymétrique de la liaison éther C-O-C et de flexion de la liaison hydroxyle O-H de la cellulose et des hémicelluloses (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). La présence de ces pics dans les spectres de l'ensemble des traitements quelle que soit la technique d'imprégnation prouve que la fraction cellulosique a bien été conservée après le prétraitement hydrothermique combiné à l'acide sulfurique.

Les pics observés aux longueurs d'onde de 1510 et 1600 cm^{-1} sont caractéristiques de la double liaison C=C du cycle aromatique présent au sein de la lignine (Gandolfi et al., 2013; Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). Quelle que soit la technique d'imprégnation, une légère augmentation de ces pics a été observée après prétraitement. Le pic observé à la longueur d'onde de 1242 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenu dans la lignine et les hémicelluloses. Ce pic disparait après le prétraitement à partir d'une concentration en acide de 15% dans le cas de l'aspersion et 1% en immersion, ce qui indique une rupture de cette liaison dans ces conditions. En effet, le prétraitement à l'acide ne conduit pas à la solubilisation de la lignine, en revanche, des réactions de dépolymérisation, repolymérisation et condensation peuvent avoir lieu pendant ce type de prétraitement (Karimi et al., 2014).

L'important pic observé pour l'ensemble des spectres à la longueur d'onde de 1030 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenu dans les fractions de cellulose et d'hémicelluloses. Quant aux deux grandes bandes d'absorbances observées aux longueurs d'ondes de 2903 et 3338 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C-H et O-H, respectivement contenues dans la biomasse lignocellulosique (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). Par ailleurs, le pic observé à la longueur d'onde d'environ 1618 cm^{-1} est lui attribué aux vibrations de flexion de la liaison O-H présente dans la molécule d'eau. Ce pic est lié

principalement à la fraction des hémicelluloses, qui se caractérise par une forte affinité avec les molécules d'eau (Kabir et al., 2013).

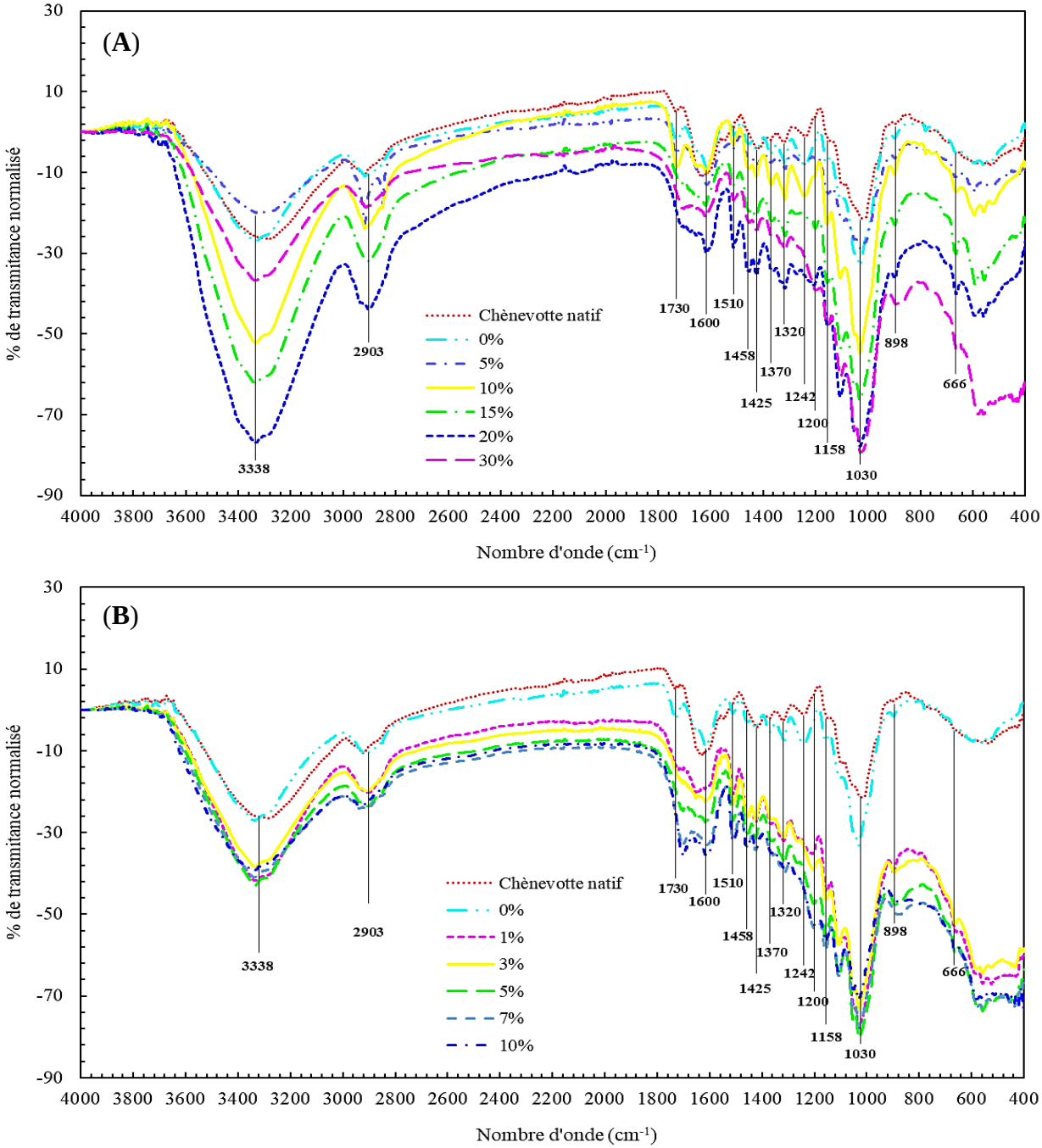


Figure 72 : Spectres FTIR de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique imprégné à différentes concentrations par aspersion (A) et immersion (B)

Ainsi, le prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique étudié a provoqué des altérations de la structure interne de la chènevotte. Cet effet est produit par contribution du chauffage à la vapeur saturée et à l'activité de l'acide sulfurique principalement dans la solubilisation des hémicelluloses et la dégradation de la lignine.

3.1.3 Diffraction par rayons X

La cellulose se représente sous forme de polymères de glucoses qui s'agglomèrent de manière structurée par la présence de liaisons hydrogène, des microfibrilles sont ainsi constituées présentant des régions hautement ordonnées (zones cristallines) et désordonnées (zone amorphe). Une éventuelle modification de la cristallinité de la cellulose peut être directement observée et mesurée par la technique d'analyse de diffraction des rayons X. Afin de collecter plus de données sur la modification de la chènevotte prétraitée, la cristallinité de celle-ci après avoir subi le prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique par aspersion (5, 10, 15, 20, 30 %) ou par immersion (1, 3, 5, 7, 10%) ont été analysés par diffraction des rayons X. La température (165°C) et le temps de traitement (30 min) sont gardés fixes pendant le prétraitement. Les diffractogrammes obtenus sont illustrés par les Figure 73A et 73B, correspondant aux prétraitements par aspersion et immersion, respectivement.

Les diffractogrammes obtenus pour la biomasse non traitée et prétraitée sont caractéristiques des matériaux semi-cristallins (Dallel, 2012; Silva et al., 2017b), présentant un pic intense dans une forme large à l'angle 2θ de 22° correspondants à la cellulose cristalline. L'intensité de ce pic diminue quand l'échantillon de chènevotte est prétraité par rapport au natif. Un deuxième pic moins intense est apparu après le prétraitement à l'angle 17° correspondant à la cellulose amorphe. La même remarque est observée pour le troisième pic qui est apparu à un angle de 34°. L'ensemble de ces pics sont bien visibles dans le cas du prétraitement par aspersion, cependant, ils disparaissent à des concentrations de 5, 7 et 10% en acide sulfurique dans le cas de l'immersion. Cela est probablement dû à une conservation de la fraction cellulosique dans le cas de l'aspersion, alors que celle-ci semble subir une solubilisation partielle à haute concentration en acide dans le cas de l'immersion.

Ces observations sont complétées par le calcul du taux de cristallinité de la cellulose des échantillons de chènevotte étudiés (Tableau 9) selon l'équation 1 (paragraphe 3.3.2 chapitre 1). Nous remarquons que la cristallinité de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'aspersion de l'acide sulfurique augmente progressivement en fonction de la concentration de l'acide ; le taux de cristallinité passe de 15% pour la chènevotte native à 25% pour celle traitée à des sévérités les plus élevées par aspersion (30% en acide), soit une augmentation de 66%. Cette augmentation est expliquée par l'élimination des fractions amorphes de la biomasse par la suite de l'action du prétraitement, notamment la fraction des hémicelluloses dans le cas du prétraitement acide. Ces observations corroborent les résultats précédemment obtenus dans l'analyse de la composition chimique (paragraphe 3.1.1) de la chènevotte prétraitée dans ces conditions, montrant que la fraction cellulosique reste conservée dans le substrat prétraité. Des remarques similaires ont été reportées par les travaux de Sun et al. (2015), montrant que le traitement par explosion à la vapeur combiné à l'acide sulfurique à 5% provoque une augmentation de 23% du taux de cristallinité de la cellulose des tiges de maïs. En revanche, dans le cas de l'immersion, la cristallinité de la chènevotte augmente à hauteur de 33% de sa valeur initiale dans l'échantillon natif à 3% en acide sulfurique, puis diminue à des concentrations élevées en acide. Le taux de cristallinité calculé régresse à 5% au-delà de l'application d'une concentration en acide de 3%. Il semble alors que la structure cristalline de

la cellulose subit des altérations pendant le prétraitement dans des conditions de concentrations en acide sulfurique élevées.

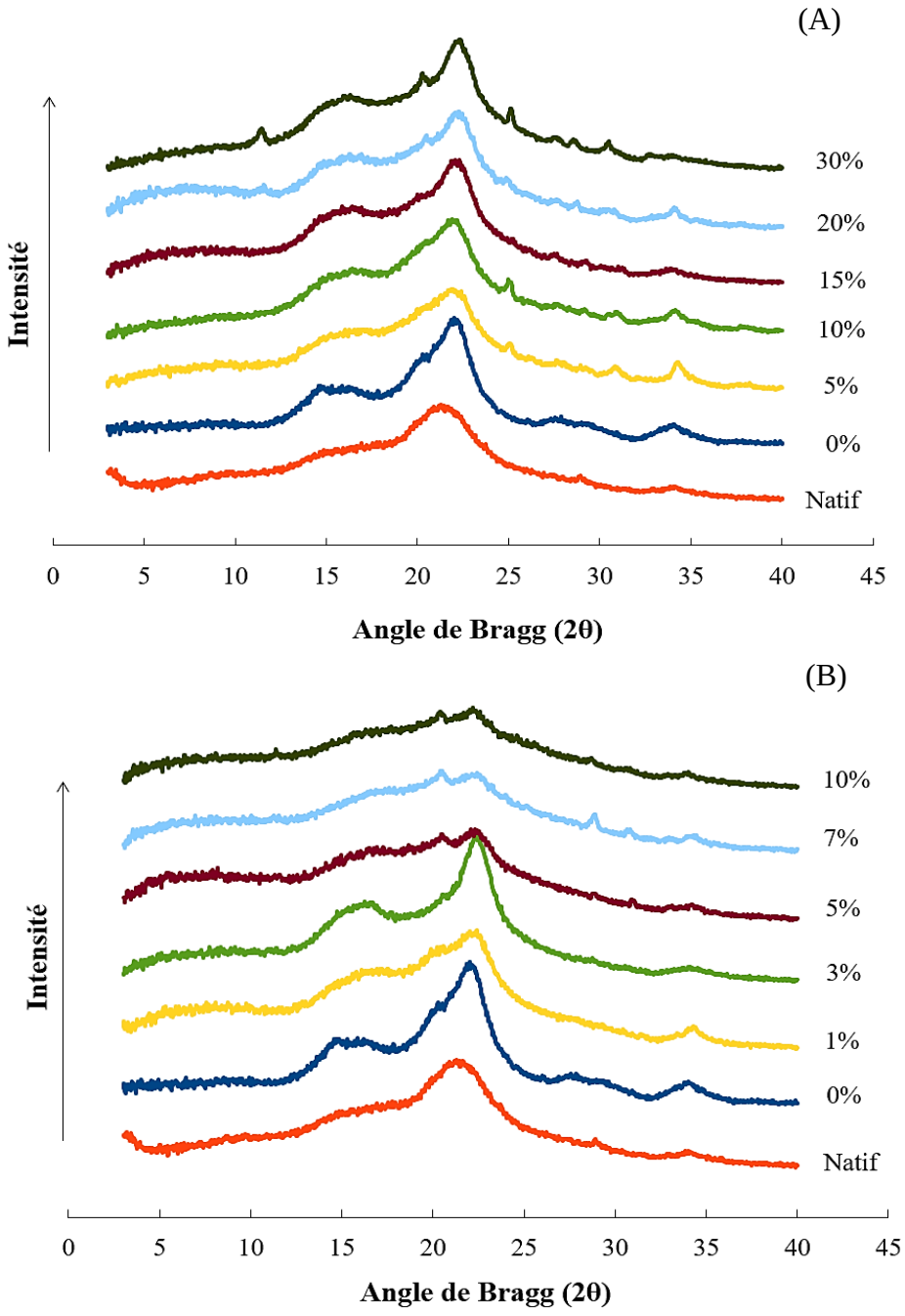


Figure 73 : Evolution des spectres de diffraction des rayons X de la chènevotte native et prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique par aspersion (A), et immersion (B).

Tableau 9 : Taux de cristallinité de la chènevotte non traitée et prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique

Essai	Imprégnation	Concentration en H_2SO_4 (%)	Taux de cristallinité (%)
Natif	---	---	15
1	---	0	25
2	Aspersion	5	15
3		10	20
4		15	20
5		20	20
6		30	25
7	Immersion	1	15
8		3	20
9		5	5
10		7	5
11		10	5

3.1.4 Observation par microscopie électronique à balayage

Les observations par microscopie électronique à balayage (Figure 74, Figure 75), effectuées sur les différents substrats préalablement imprégnés par aspersion et immersion par l'acide sulfurique et traité par DIC, ont révélé des modifications morphologiques significatives par comparaison avec l'échantillon natif. La chènevotte, comme toutes matières végétales est constituée de cellules végétales délimitées par des parois cellulaires liées entre elles pour former une structure organisée. Les parois cellulaires représentant le squelette de la matrice abritent les trois principaux composants qui sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Bouloc, 2006). Les images de la chènevotte à l'état natif (Figure 74A) et traité sans catalyseur (Figure 74B_1 et Figure 74B_2) montrent une structure compacte des faisceaux fibreux, recouverts d'une couche superficielle dense.

L'analyse de la structure microscopique confirme les résultats précédents (Tableau 8) à savoir que le traitement thermomécanique sans présence de catalyseur acide n'a pas déstructuré considérablement le réseau lignocellulosique par solubilisation des fractions hémicellulosiques et de la lignine. En revanche, après prétraitement en présence d'acide, et quelle que soit la technique d'imprégnation, la morphologie de la structure de la chènevotte a été altérée avec la présence de nombreuses fissures et des zones poreuses. Le degré de cette altération dépend fortement de la concentration en acide sulfurique. On peut aussi remarquer sur les deux types d'échantillons, la présence de dépôts de résidus blancs en quantité plus importante pour la chènevotte imprégnée par aspersion. Il parait que la présence d'acide sulfurique en quantité élevée conduit à des réactions avec du calcium initialement présent au sein de la chènevotte native en produisant du sulfate de calcium (gypse).

Dans le cas de l'imprégnation par aspersion, les vaisseaux de fibres de la chènevotte ont été endommagés et l'intensité de la déstructuration a augmenté avec la concentration en acide. En

effet, la déstructuration la plus prononcée a été obtenue à la concentration en acide de 30%, correspondant à une charge de 9,44%. On peut observer sur la Figure 74E_2 (grossissement X1000) que la structure est complètement ouverte et la présence de nombreux trous la rend plus fragile.

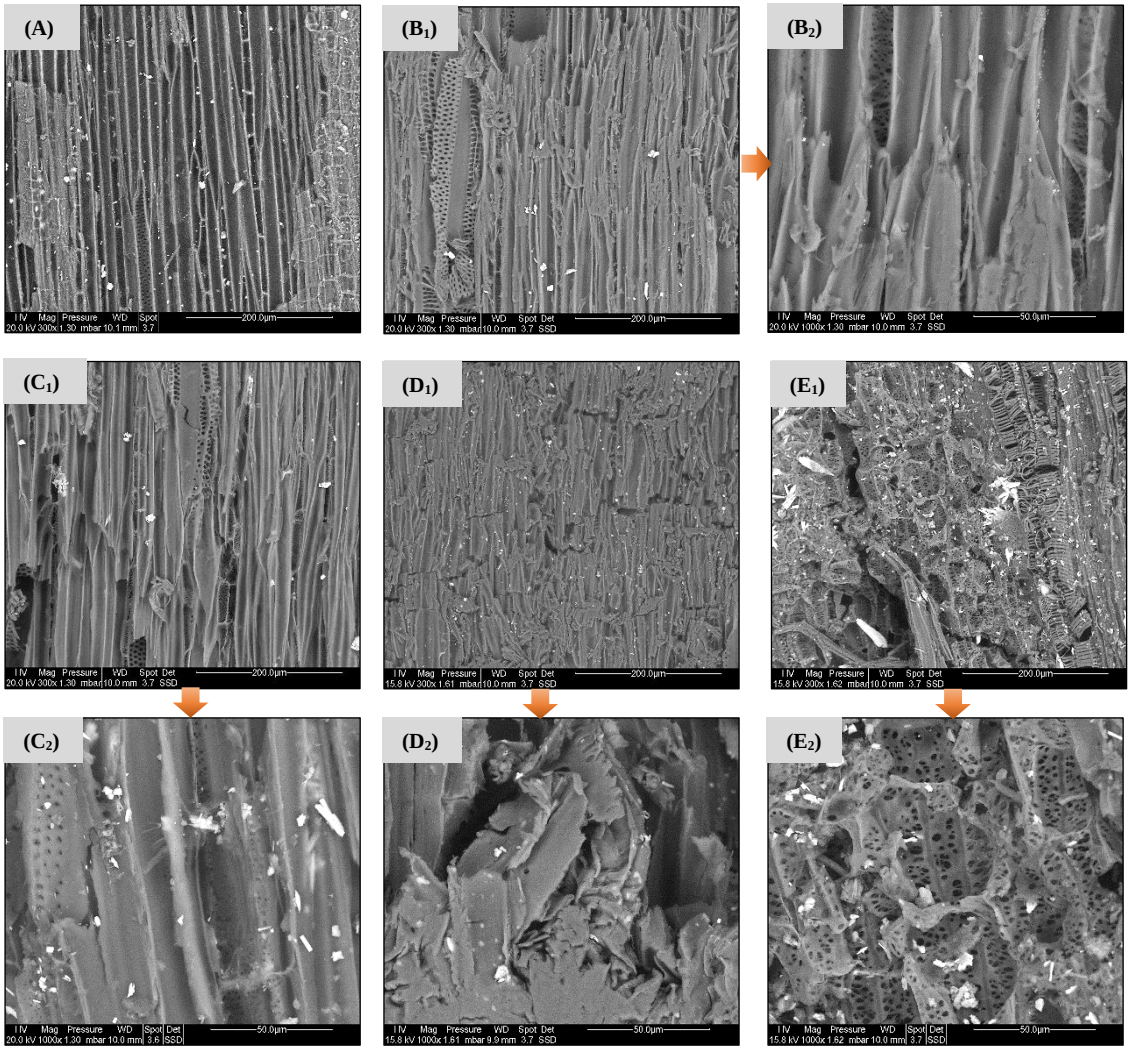


Figure 74 *:* Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par aspersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif (A), sans catalyseur à X300 (B_1) et X1000 (B_2), 10% à X300 (C_1) et X1000 (C_2), 20% à X300 (D_1) et X1000 (D_2), 30% à X300 (E_1) et X1000 (E_2)

Contrairement à l'imprégnation par aspersion, dans le cas de l'immersion la cohésion des vaisseaux de fibres a été perturbée dès les faibles concentrations en acide utilisé, ceci est certainement due à une meilleure répartition du catalyseur dans la biomasse. En effet, à une concentration de 0,6% en acide, correspondant à une charge de 2%, l'empilement des vaisseaux est déjà ouvert, les surfaces denses ont été significativement réduites et les cellules végétales sont clairement dévoilées avec l'apparition de nombreux pores dans les parois cellulaires. Au fur et à mesure de l'augmentation en acide, notamment pour le traitement à 3% en acide, nous

avons observé l'apparition de plus de zones poreuses avec fissuration de la structure témoignant d'un endommagement plus important de la masse lignocellulosique.

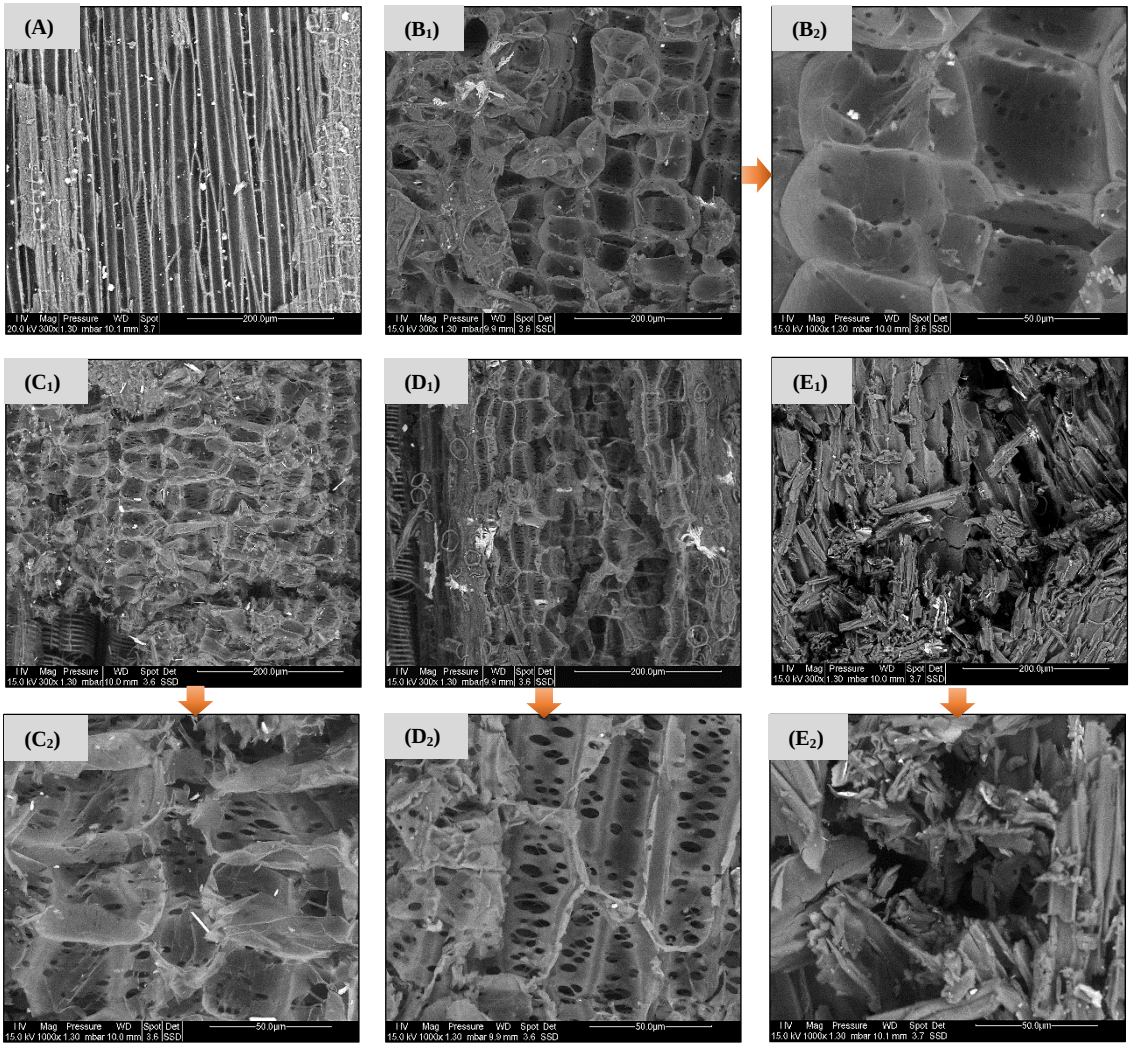


Figure 75 : Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par immersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif à X300 (A), 0,6% à X300 (B_1) et X1000 (B_2), 1% à X300 (C_1) et X1000 (C_2), 2% à X300 (D_1) et X1000 (D_2), 3% à X300 (E_1) et X1000 (E_2)

En se référant aux résultats de la composition des substrats prétraités précédemment présentés (Tableau 8), il a été montré qu'en aspersion à 30% et immersion (10 min) à 3% en acide, la proportion en hémicelluloses avait diminué de 63% et 64%, respectivement. Les observations microscopiques corroborent ces résultats puisque ces conditions traduisent une solubilisation importante des hémicelluloses favorisée principalement par l'activité de l'acide sulfurique présent en concentration suffisante combiné au traitement thermique. Par ailleurs, la décompression explosive provoquée par la chute brutale de la pression de 7 bars vers une pression réduite de 50 mbar conduit à la vaporisation rapide d'une partie de l'eau contenue dans le matériau. Cette détente abrupte de la pression exerce un effet mécanique important sur la

matrice et donc les forces de cisaillement contribuent à la fragilisation de la structure. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par Silva et al. (2017), sur la bagasse de la canne à sucres. Les auteurs ont montré que l'explosion à la vapeur appliquée sans catalyseur cause peu de déstructuration de la bagasse, alors qu'en présence d'acide citrique imprégné, une formation de fissures a eu lieu au niveau des fibres par solubilisation de 41,5% de la fraction hémicellulosique.

3.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion ou immersion

En bioraffinerie, le traitement basique est essentiellement utilisé pour son action à la délignification dans l'objectif d'améliorer l'accessibilité et la digestibilité des polysaccharides pendant l'hydrolyse enzymatique. De nombreux travaux ont montré l'efficacité de la présence de l'hydroxyde de sodium dans ce type de traitement (Kumar and Sharma, 2017; Xu et al., 2016). Afin de vérifier son efficacité et la comparer à celle des conditions acides, nous avons combiné le prétraitement thermomécanique à des conditions alcalines à différentes concentrations.

Avant le traitement thermomécanique, des substrats de chènevotte ont été imprégnés par des solutions diluées d'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion ou par immersion. Les domaines de variation des concentrations ont été de 3 à 50% et de 0,2 à 10% (en pourcentage massique), pour l'aspersion et l'immersion, respectivement. De la même manière que précédemment, la température au cours du traitement thermomécanique a été fixée à 165 °C et le temps de traitement à 30 min. Les modifications structurales, chimiques et morphologiques déterminées après prétraitement sont présentées ci-dessous.

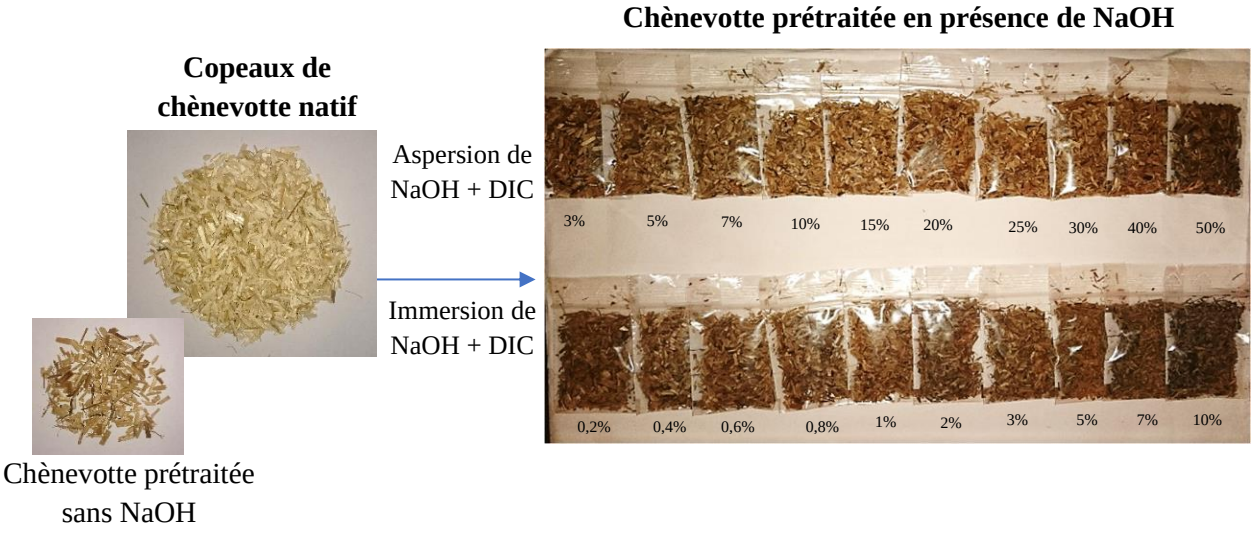


Figure 76 : Photos de la chènevotte native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions alcalines

Les photos (Figure 76) montrent clairement l'effet de la présence du catalyseur sur le changement de la couleur du substrat après traitement dans les deux cas d'imprégnation ;

aspersion (photos du haut) et immersion (photos du bas). La différence de couleur avec le substrat prétraité sans catalyseur est significative, où l'aspect est légèrement modifié par rapport à celui de la matière native. Par-ailleurs, contrairement au traitement de la chènevotte en conditions acides le brunissement de la matière est plus homogène et moins intense, sauf pour la dernière condition de concentration pour les deux types d'imprégnation, 50% et 10% pour respectivement l'aspersion et l'immersion.

3.2.1 Modifications structurales et chimiques

Le Tableau 10 présente les résultats de l'analyse de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique à 165 °C pendant 30 min combiné à l'hydroxyde de sodium utilisé comme agent chimique. La concentration en NaOH et son mode d'imprégnation ont été étudiés. Les éléments analysés sont le pH avant et après traitement thermomécanique, la surface spécifique et la composition chimique après prétraitement. Les résultats obtenus ont été analysés en se référant aux données de la chènevotte native. Pour faciliter la comparaison entre les différents traitements, les concentrations ont été exprimées par charge en NaOH par rapport à 100 g de la matière sèche, ce qui correspond à des valeurs allant de 0,94 à 15,73% et 0,7 à 34,1% pour les techniques par aspersion et par immersion, respectivement. Les valeurs de pH de la chènevotte, après imprégnation de l'agent chimique alcalin, ont augmenté en fonction de la concentration des solutions d'hydroxyde de sodium quelle que soit la technique d'imprégnation appliquée. Une diminution systématique de ces valeurs après le traitement thermomécanique a été obtenue. Cette diminution est liée à la libération d'acides pendant le traitement thermique conduisant ainsi à la neutralisation d'une partie de l'hydroxyde de sodium présente au sein de la biomasse.

La détermination de la composition chimique de la chènevotte prétraitée fournit des informations sur la modification des proportions en cellulose, hémicelluloses et lignine. Initialement, la chènevotte est composée de 56,38% de cellulose, 17,78% d'hémicelluloses et 21,2% de lignine. Après prétraitement en présence d'hydroxyde de sodium, les résultats des analyses de la composition chimique montrent une réduction de la proportion des hémicelluloses et de la lignine, contrairement à la proportion en cellulose qui a légèrement augmentée, pour les deux techniques d'imprégnation. Nous pouvons relever également à partir des résultats d'analyse de la composition que le substrat prétraité en absence de l'agent chimique NaOH a une faible variation de la composition comparé aux substrats imprégnés par NaOH.

La réduction maximale en hémicelluloses et lignine a été obtenue à des concentrations en NaOH de 30% et 5% massique pour l'aspersion et l'immersion pendant 10 et 30 min, respectivement. Au-delà de ces niveaux de concentration, il n'y a pas de variation notable de la composition du substrat prétraité (Tableau 10). Les résultats montrent que la réduction des hémicelluloses a été de 35%, 38% et 40% pour la chènevotte imprégnée par 9,44%, 11,8% et 10,2% de NaOH par aspersion, immersion à 10 min et 30 min, respectivement. Par ailleurs, l'élimination de la lignine a été plus prononcée que celle des hémicelluloses ; la réduction a été de 44%, 62% et 67% pour une imprégnation du substrat par une charge de NaOH de 9,44%, 11,8% et 10,2% par aspersion, immersion à 10 min et 30 min, respectivement. Ces résultats montrent alors

qu'une modification importante du réseau lignocellulosique de la chènevotte a eu lieu, due principalement à l'efficacité de l'imprégnation des ions hydroxyle au sein de la matière, ainsi que leur capacité à briser les liaisons inter et intrapolymères lignocellulosiques lors du traitement thermomécanique. Des résultats similaires ont été observés par Barman et al. (2014) et par Silva et al. (2017) pour d'autres matériaux lignocellulosiques. Afin de réduire le coût du procédé de bioconversion de la chènevotte en bioéthanol, il parait judicieux de récupérer les hémicelluloses et la lignine éliminés et de les convertir en composés saccharidiques et phénoliques à haute valeur biochimique.

Contrairement à l'acide sulfurique, où la différence entre les deux techniques d'imprégnation était modérée, il apparaît clairement des différences plus importantes entre la technique d'aspersion d'une part et l'immersion d'autre part. Notons que la matière imprégnée par aspersion est faiblement humidifiée que celle imprégnée par immersion. Ce qui joue un rôle dans la répartition et la diffusions de l'agent basique au sein de la matière lignocellulosique.

La Figure 77 illustre la variation de la composition chimique et de la surface spécifique de la chènevotte prétraité à différentes concentrations d'hydroxyde de sodium imprégnée par aspersion et immersion (10 et 30 min). Le taux de réduction des fractions hémicellulosiques et de la lignine est plus prononcé lors du traitement par immersion que par aspersion. Cette figure montre d'une part que l'évolution de la surface spécifique est similaire pour les deux techniques d'imprégnation et d'autre part que celle-ci a diminué légèrement avec l'augmentation de la concentration des solutions d'imprégnation d'hydroxyde de sodium. Cette baisse de la surface spécifique est probablement due à un phénomène de condensation de la lignine libérée en milieu alcalin à haute température, obstruant ainsi l'accès aux pores ouverts.

En effet, le mécanisme du traitement alcalin fait intervenir les ions hydroxyles qui ont un caractère très nucléophile attaquant particulièrement les hétéropolymères (hémicelluloses et lignine). Ces attaques engendrent la rupture des liaisons ester contenues dans les hémicelluloses par la réaction de saponification, générant des extrémités réductrices. Par la suite, une autre réaction dite « peeling » peut avoir lieu. Celle-ci consiste en la substitution d'une extrémité réductrice du polymère des hémicelluloses, engendrant ainsi une perte du degré de polymérisation et la déstructuration des hémicelluloses.

En plus, la rupture des liaisons ester existantes entre les hémicelluloses et la lignine peut avoir lieu. Les ions hydroxyles interviennent aussi au niveau du clivage de la liaison β-O-4, liaison prédominante dans la fraction lignine. Il en résulte des composés phénoliques fragmentés qui peuvent réagir entre eux et se condenser diminuant ainsi leur solubilité. D'après Boucher (2016) et Karimi et al. (2014), ces effets conduisent à une destruction de la matrice lignocellulosique, et provoquent la rupture des liaisons hydrogènes présentes dans la cellulose, diminuant ainsi son degré de cristallinité.

Tableau 10 *:* Valeurs du pH, A_{BET} et la composition chimique de la chènevotte prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium. pH^b et pH^c ont été mesurés avant et après traitement thermomécanique, respectivement.

Essais	IMP	Concentration en NaOH (%)	Charge en NaOH (%)	pH^a	pH^b	A_{BET} (m^2/g)	Composition chimique (%MS)		
							CEL	HEM	LIG
Natif	---	---	---	6,7±0,01		0,90±0,05	56,38	17,78	21,2
1	---	0	0,00	6,67±0,03	5,07±0,00	0,87±0,04	56,17	17,05	19,3
2	Aspersion	3	0,94	8,2±0,04	6,3±0,01	0,90±0,04	56,94	16,99	19,1
3		5	1,57	8,6±0,02	6,4±0,01	0,92±0,04	56,29	16,82	19,3
4		7	2,20	8,8±0,01	6,4±0,01	0,86±0,04	57,72	16,68	19,0
5		10	3,15	9,2±0,04	6,6±0,01	0,85±0,04	58,19	16,07	18,6
6		15	4,72	10,0±0,01	7,1±0,01	0,81±0,04	59,36	15,87	17,5
7		20	6,29	10,1±0,04	7,1±0,01	0,81±0,04	58,60	15,08	16,7
8		25	7,86	10,3±0,01	7,2±0,01	0,74±0,04	59,38	14,52	14,9
9		30	9,44	10,3±0,01	7,3±0,01	0,70±0,07	59,90	11,65	11,8
10		40	12,58	10,5±0,01	7,4±0,02	---	59,32	11,48	11,0
11		50	15,73	10,7±0,01	7,5±0,01	---	60,20	11,40	11,3
12	Immersion (10min)	**0,2**	0,8	6,79±0,01	6,05±0,03	1,13±0,04	57,26	19,45	20,1
13		0,4	1,5	6,97±0,01	6,26±0,05	1,06±0,05	58,94	19,32	20,0
14		0,6	2,3	7,32±0,04	6,84±0,03	0,70±0,03	58,99	18,07	19,4
15		0,8	3,1	8,35±0,02	7,52±0,01	0,77±0,05	60,81	16,86	18,0
16		1	4,1	9,42±0,01	8,13±0,01	0,80±0,07	61,92	14,98	13,1
17		2	7,4	10,4±0,01	9,35±0,02	0,96±0,04	62,52	12,89	11,4
18		3	11,8	12,1±0,01	10,2±0,01	0,97±0,05	62,98	11,10	8,1
19		5	20,2	12,4±0,04	10,3±0,01	0,90±0,03	63,23	10,95	8,0
20		7	26,2	12,6±0,04	10,4±0,01	0,75±0,04	63,52	10,91	8,0
21		10	34,1	12,8±0,01	11,3±0,00	0,32±0,05	63,72	10,81	7,8
22	Immersion (30min)	**0,2**	0,7	6,96±0,03	6,05±0,06	1,10±0,07	58,11	19,69	19,6
23		0,4	1,5	7,67±0,03	6,84±0,02	1,08±0,04	58,57	19,63	19,4
24		0,6	2,3	8,01±0,02	7,20±0,01	0,78±0,03	58,82	18,90	17,6
25		0,8	2,7	9,10±0,02	8,38±0,01	0,75±0,04	59,12	17,53	15,4
26		1	3,8	9,95±0,01	8,42±0,01	0,71±0,05	60,25	14,65	13,1
27		2	6,9	11,3±0,04	10,4±0,03	0,93±0,04	60,98	12,13	9,4
28		3	10,2	12,2±0,01	10,4±0,01	0,87±0,05	61,69	10,58	6,9
29		5	17,1	12,5±0,01	10,5±0,01	0,78±0,07	62,40	10,51	6,7
30		7	23,9	12,8±0,02	11,1±0,04	0,60±0,04	62,97	10,46	6,6
31		10	27,1	13,0±0,01	11,4±0,00	0,30±0,03	63,56	10,39	6,2

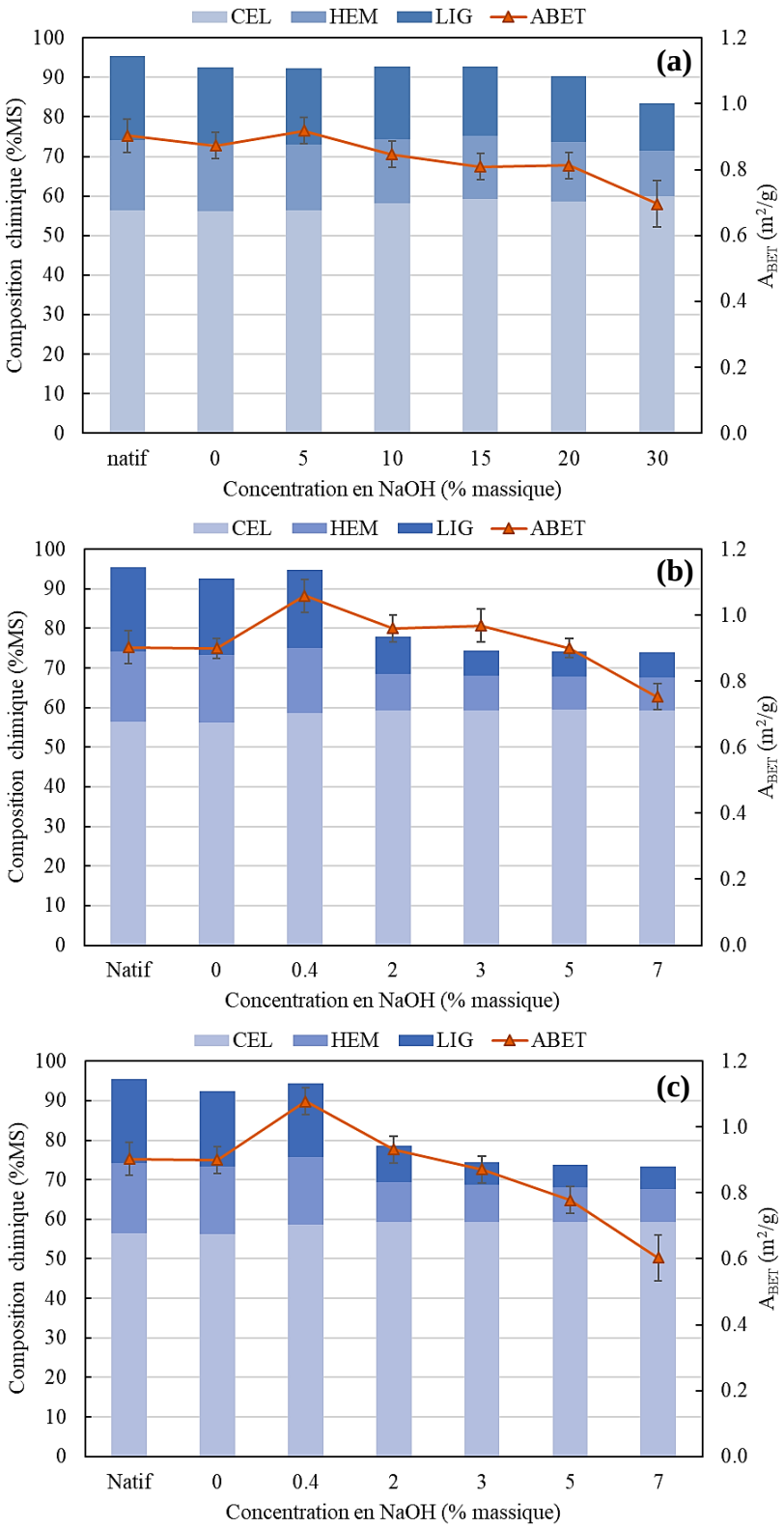


Figure 77 : Variation de la composition chimique et de la surface spécifique de la chènevotte imprégnée par de l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (a) et immersion pendant 10 min (b) et 30 min (c) et prétraitée par DIC.

3.2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier

L'analyse par FTIR a été utilisée afin de mette en évidence les variations de la structure chimique des différents échantillons thermomécaniquement prétraités en présence de l'hydroxyde de sodium. Les Figure 78A et Figure 78B montrent les spectres obtenus pour les substrats imprégnés par aspersion et immersion, respectivement. L'examen des spectres montre des différences au niveau de l'intensité de certains pics.

Le pic observé à la longueur d'ondes de 1730 cm^{-1} qui est attribué typiquement aux vibrations d'élongation du groupe carbonyle C=O présent dans la fraction hémicellulosique (Gandolfi et a., 2014; Pereira et al., 2016; Tabassum et al., 2017), est bien présent dans la chènevotte native et a disparu après traitement pour les substrats imprégnés par aspersion et immersion à partir de la concentration de 10 et 1%, respectivement. Ce résultat met évidence que sous ces conditions le traitement alcalin a contribué à la déstructuration des hémicelluloses.

En revanche, le pic observé à la longueur d'onde de 898 cm^{-1} correspondant à la cellulose amorphe est quasiment identique pour l'ensemble des échantillons. Ceux observés aux longueurs d'ondes de 1320, 1370 et 1425 cm^{-1} et qui correspondent à la cellulose cristalline sont identiques pour les échantillons prétraités par aspersion contrairement à ceux imprégnés par immersion où ces pics disparaissent à partir d'une concentration de 1% en NaOH. Ce résultat suggère donc que l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium par la technique d'immersion provoque une diminution considérable de la cristallinité de la cellulose.

Les pics observés aux longueurs d'onde de 1158 cm^{-1} sont attribués aux vibrations d'élongation asymétrique de la liaison éther C-O-C de la cellulose. La présence de ces pics dans les spectres de l'ensemble des échantillons prétraités quelle et que soit la technique d'imprégnation prouve que la fraction cellulosique a bien été conservée après le prétraitement hydrothermique combiné à l'hydroxyde de sodium. Résultat en accord avec l'analyse de la composition (Tableau 10). Néanmoins, l'intensité de ce pic est plus prononcée dans le cas du traitement par immersion qu'en aspersion, ce qui reflète une cellulose plus exposée suite à une meilleure diffusion du réactif chimique dans une biomasse largement hydratée.

Les pics observés aux longueurs d'onde de 1510 cm^{-1} et qui sont caractéristiques de la double liaison C=C du cycle aromatique de la lignine (Gandolfi et al., 2013; Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013) disparaissent à des concentration en NaOH de 15% et 5% appliquées par aspersion et immersion, respectivement. Aussi, pour les mêmes concentrations en NaOH (15% et 5%) appliquées respectivement par aspersion et immersion, le pic observé à la longueur d'onde de 1242 cm^{-1}, correspondant à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenu dans la lignine et les hémicelluloses, disparait après le prétraitement. La disparition de ce pic pour ces conditions indique la rupture de cette liaison.

L'important pic observé pour l'ensemble des spectres à la longueur d'onde de 1030 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenu dans les fractions cellulosiques et hémicellulosiques. Quant aux deux grandes bandes d'absorbances observées aux longueurs

d'ondes de 2917 et 3316 cm^{-1}, elles correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C-H et O-H présentes dans les trois fractions de la biomasse lignocellulosique (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). L'intensité du pic correspondant aux liaisons O-H a augmenté dans le cas de l'imprégnation par immersion ce qui est dû probablement à une exposition plus importante de ces liaisons avec l'agent alcalin.

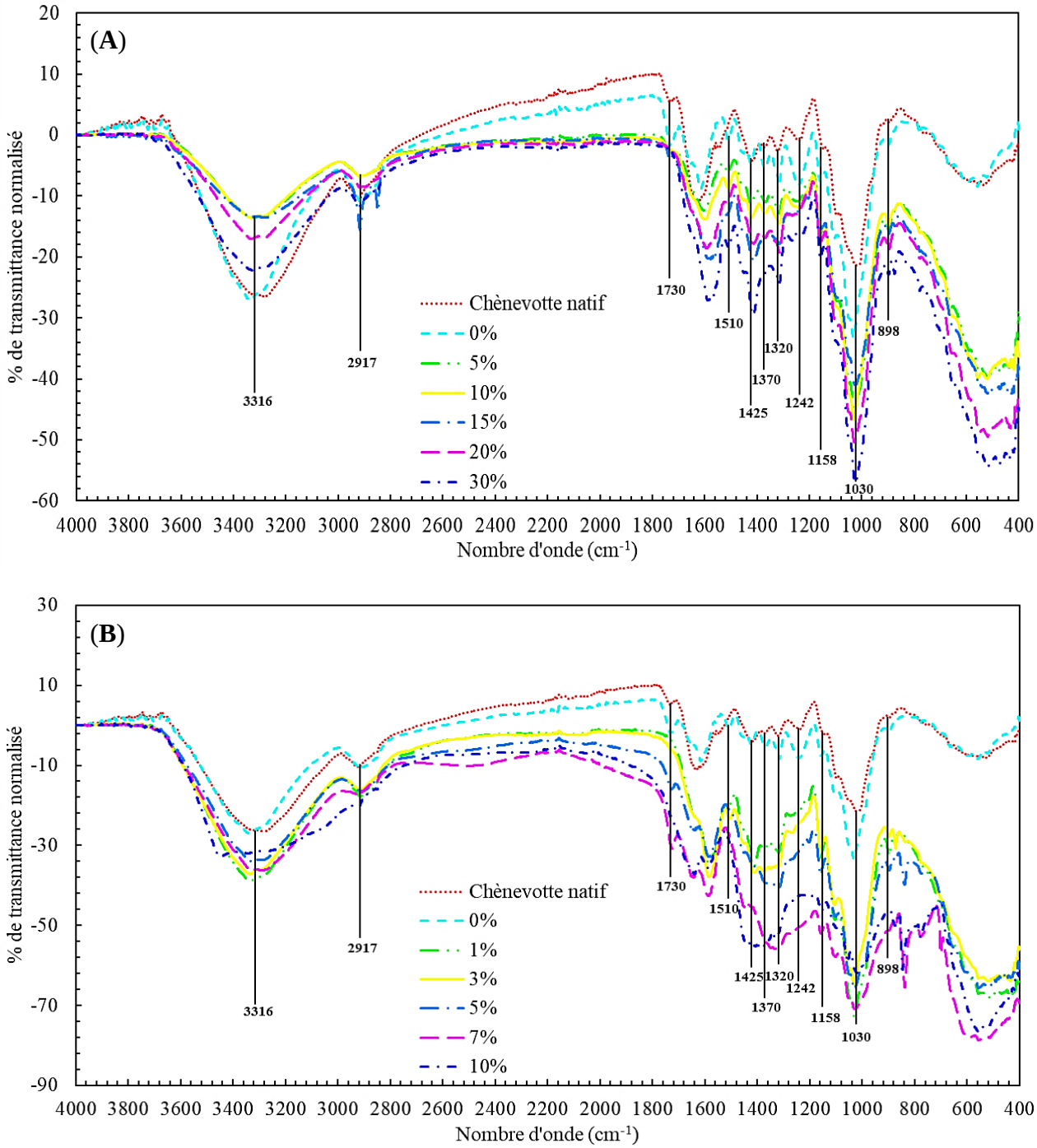


Figure 78 : Spectres FTIR de la chènevotte préalablement imprégnée à différentes concentrations de l'hydroxyde de sodium (aspersion (A) et immersion (B)) et traitée thermomécaniquement par le procédé DIC.

Il est à noter que le spectre de la chènevotte prétraité sans catalyseur est quasiment similaire à celui du natif. Dans ces conditions l'altération des composants récalcitrants de la chènevotte a été très peu significative par comparaison aux autres spectres, démontrant ainsi l'efficacité de la présence de l'hydroxyde de sodium en combinaison avec le prétraitement thermomécanique dans la déstructuration de la matrice du substrat. Cet effet est produit par la contribution concomitante du chauffage avec de la vapeur saturée à 165 °C et de l'activité des ions hydroxyles dans la dépolymérisation de la fraction hémicellulosique sous forme d'oligomères, et dans la dépolymérisation de la lignine par rupture de sa liaison β O-4 la plus prédominante et sa transformation éventuelle.

3.2.3 Diffraction par rayons X

Afin d'évaluer l'impact du prétraitement alcalin sur la modification de la cristallinité de la chènevotte, des échantillons de chènevotte prétraitée à différentes concentrations en hydroxyde de sodium ont été analysés par diffraction des rayons X. Les diagrammes obtenus sont illustrés par les Figures 79A et 79B correspondant aux prétraitements par aspersion (5, 10, 15, 20, 30 %) et par immersion (1, 3, 5, 7, 10%), respectivement.

Comme dans le cas du traitement en présence de l'acide, sur les diffractogrammes nous observons la présence d'un pic intense à l'angle 2θ de 22°, correspondants à la structure de la cellulose cristalline, d'un deuxième pic moins intense qui apparaît après le prétraitement à 17° relatif à la présence de la cellulose amorphe, et d'un troisième pic à 34° correspondant aussi à la structure cristalline, après le prétraitement. L'ensemble de ces pics sont bien visibles dans le cas du prétraitement par aspersion sauf pour la concentration à 30% en NaOH. Pour le cas de l'immersion, ces pics commencent à se réduire au-delà de l'application d'une concentration en NaOH de 3%. Cette diminution est dûe principalement au fait que le prétraitement alcalin engendre une perturbation de la structure de la cellulose suite à la solubilisation des fractions amorphes du substrat lignocellulosique.

Ces observations sont complétées par le calcul du taux de cristallinité de la cellulose des échantillons de chènevotte étudiés (Tableau 11). Nous remarquons que la cristallinité de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium augmente après le prétraitement dans le cas des deux techniques d'imprégnation. Le taux de cristallinité a augmenté de 33 et 100% dans le cas de l'aspersion (20% en NaOH) et l'immersion (5% en NaOH), respectivement, révélant qu'à ces conditions, ce type de prétraitement permet d'améliorer la conservation et l'exposition des polymères cellulosiques. L'augmentation du taux de cristallinité après le prétraitement alcalin a été reporté aussi par Barman et al., (2014) dans le prétraitement alcalin de la plante de roseau et par Sindhu et al., (2014) dans le prétraitement alcalin de partie haute de la canne à sucres. En effet, le taux de cristallinité exprimé traduit la cristallinité de l'ensemble de la biomasse. Dès lors, la raison de cette augmentation est l'élimination des fractions des hemicelluloses et de lignine dans la biomasse suite au prétraitement alcalin. Des conclusions similaires ont été reportées par les travaux de Barman et al., (2014), montrant que le prétraitement à l'hydroxyde de sodium à 2% provoque une augmentation de 51% du taux de cristallinité de la cellulose de la paille de roseau. En

revanche, ce taux baisse à des fortes concentrations en NaOH, en l'occurrence 30% dans le cas de l'aspersion et 10% dans le cas de l'immersion, ce qui est probablement dû à un début d'altération de la structure cristalline de la cellulose après élimination des hémicelluloses et la lignine.

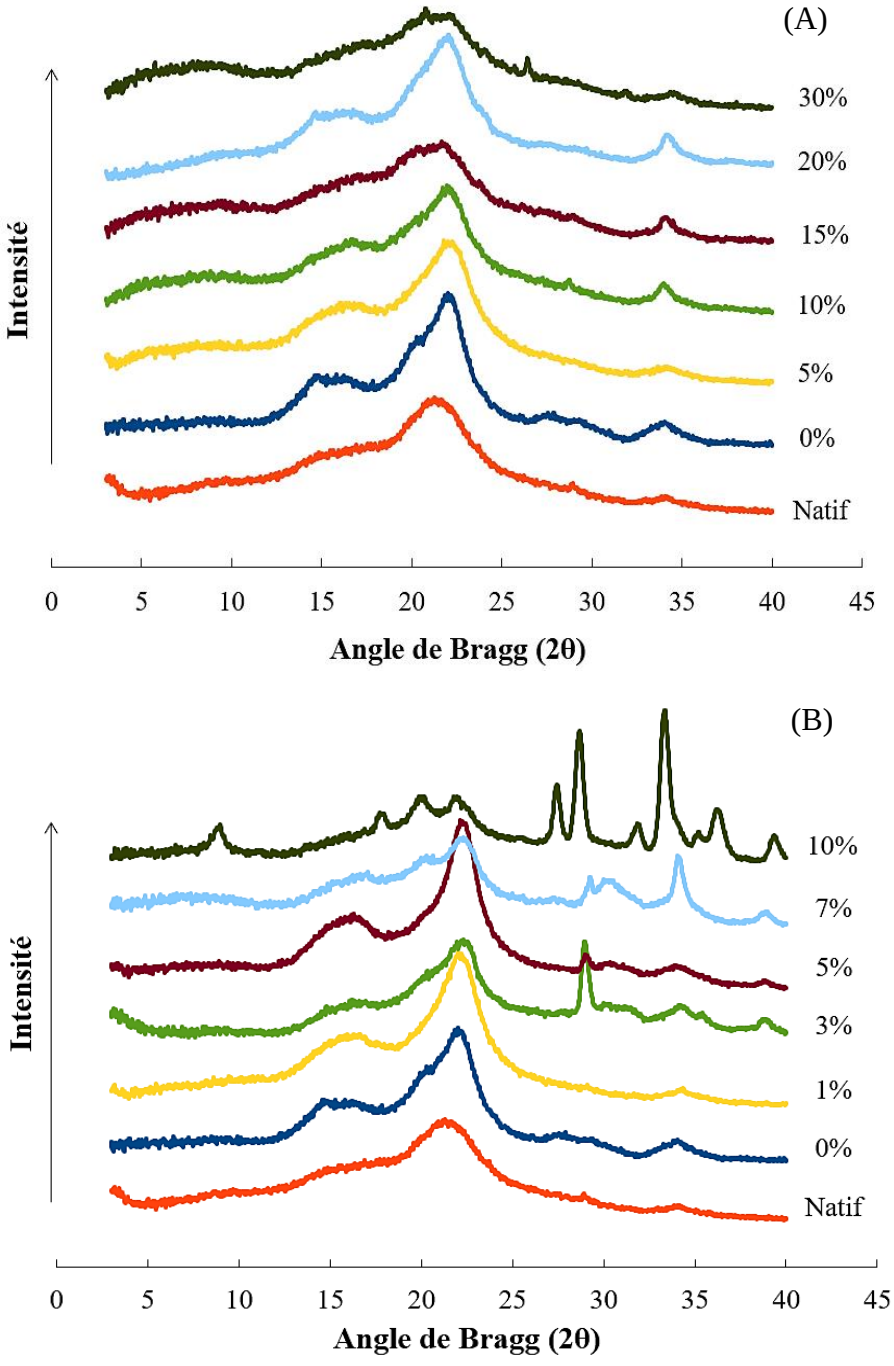


Figure 79 : Spectres de diffraction des rayons X de la chènevotte non traitée et prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium imprégné par aspersion(A) et immersion (B).

Tableau 11 : Taux de cristallinité de la chènevotte non traitée et prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium

Essai	Imprégnation	Concentration en H_2SO_4 (%)	Taux de cristallinité (%)
Natif	---	---	15%
1	---	0	25%
2	Aspersion	5	20%
3		10	20%
4		15	15%
5		20	20%
6		30	15%
7	Immersion	1	30%
8		3	25%
9		5	30%
10		7	20%
11		10	5%

3.2.4 Observations par microscopie électronique à balayage

Des observations par microscopie électronique à balayage ont été effectuées afin d'étudier les changements qui ont eu lieu au sein de la chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium par comparaison au substrat natif. Les figures ci-dessous montrent les différentes images obtenues pour différentes concentrations en hydroxyde de sodium imprégné par les deux techniques (Figure 80 et 81).

Les images de la chènevotte à l'état natif (Figure 80A) et prétraitée par le procédé thermomécanique en absence de l'agent alcalin (Figure 80B_1 et B_2) montrent une structure intacte, bien organisée, des faisceaux fibreux qui sont recouverts d'une couche superficielle dense. Après traitement thermomécanique en présence de l'hydroxyde de sodium, la structure a subi un changement important au niveau de sa morphologie. La désorganisation des faisceaux fibreux est systématique pour les deux modes d'imprégnation, dont l'intensité est fonction de la concentration en hydroxyde de sodium. La couche cireuse enveloppant les faisceaux lignocellulosiques a été éliminée et la structure interne dévoilée.

Les images montrent un éclatement des cellules et apparition des pores au niveau de la paroi cellulaire pour les traitements à 30% et 0,6% appliqués par aspersion et immersion, respectivement. L'apparition des pores au niveau de la structure est directement liée aux phénomènes de dissolution des hémicelluloses et de la lignine suite à l'action des ions hydroxyles dans les réactions d'hydrolyse alcaline. Asghar et al. (2015) ont observé le même phénomène sur la paille de blé imprégné à 2,5% en NaOH et traité à l'autoclave. Ces travaux ont aussi démontré que le prétraitement alcalin engendre l'apparition des pores suite à la dissolution de la lignine et des hémicelluloses au sein de la paille de blé prétraité. Barman et al. (2014) ont observé un affaiblissement de la structure de la paille de roseau après le même type

de prétraitement, ils suggèrent que le prétraitement provoque un endommagement de la structure externe de la paille, augmente l'exposition de la structure interne ainsi que les fibres cellulosiques, indiquant alors que le prétraitement est la principale étape de déstructuration de la structure compact de la biomasse augmentant la surface d'échange du substrat aux enzymes cellulases.

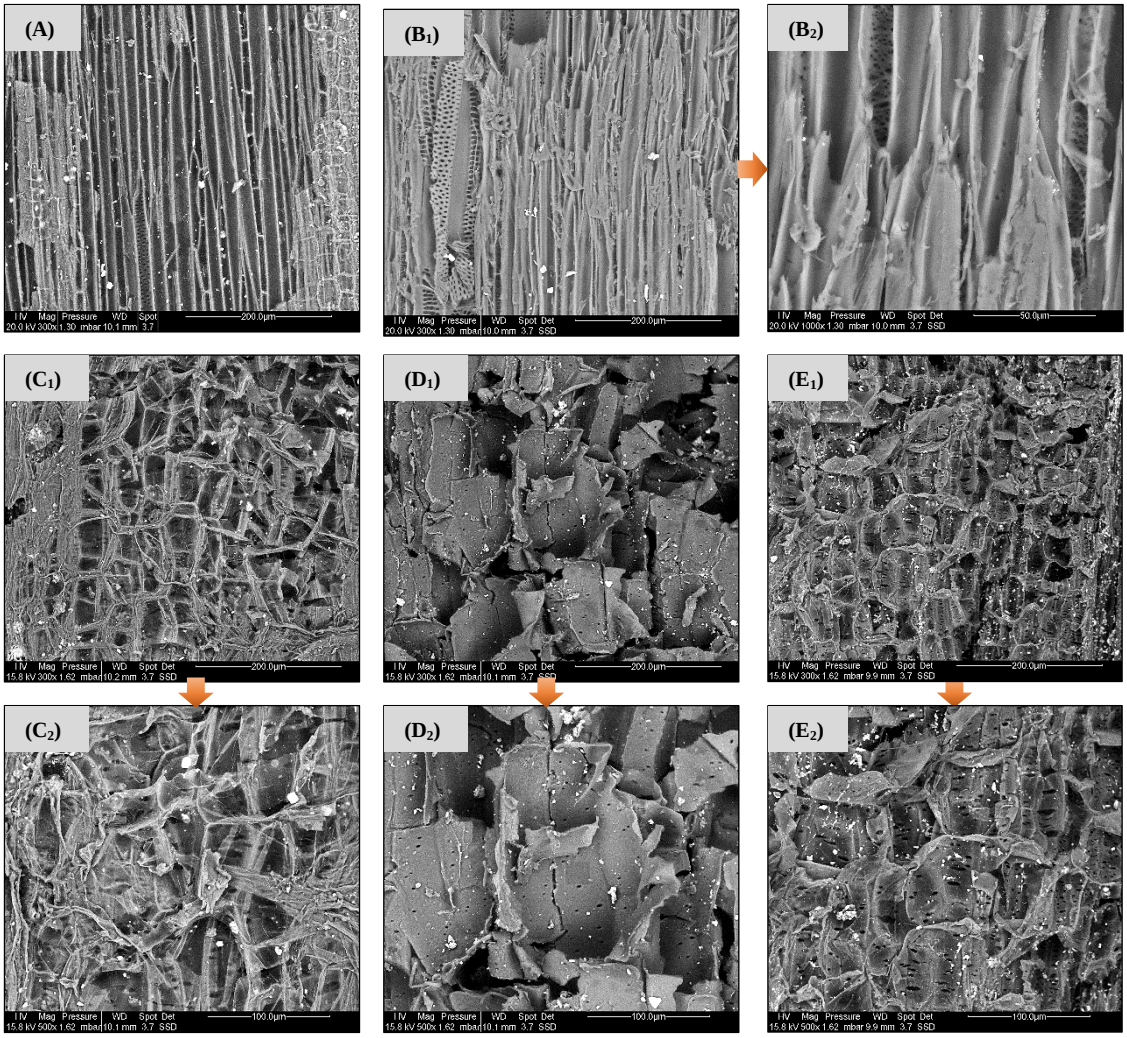


Figure 80: Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; imprégnation par aspersion à différentes concentrations en hydroxyde de sodium : natif à X300 (A), sans agent alcalin (0%) à X300 (B_1) et X500 (B_2) ; 10% à X300 (C_1) et X500 (C_2) ; 20% à X300 (D_1) et X500 (D_2) ; 30% à X300 (E_1) et X500 (E_2)

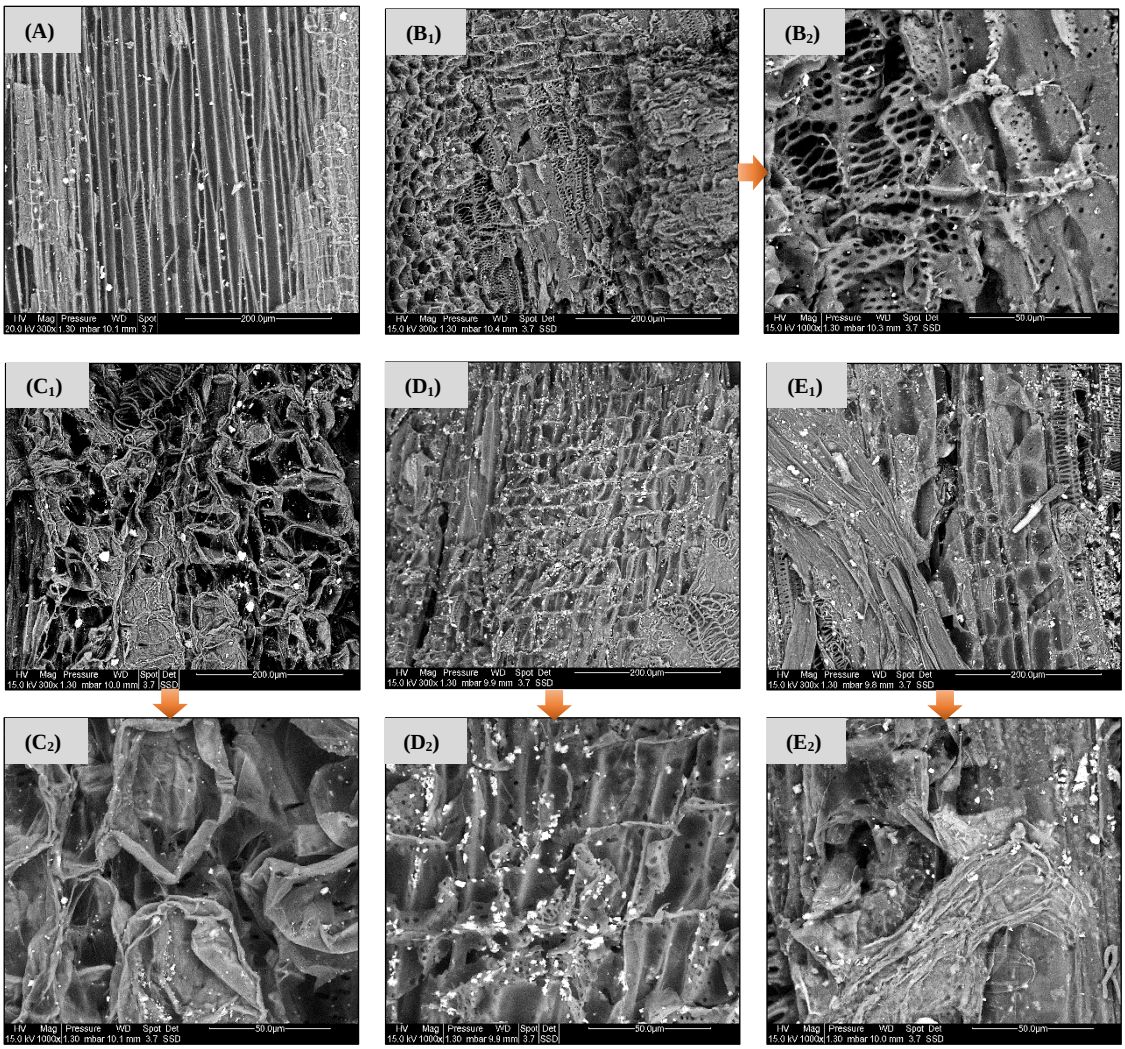


Figure 81: Images par MEB à deux grossissements de la chènevotte prétraitée ; Imprégnation par immersion à différentes concentrations en hydroxyde de sodium : natif à X300(A) ; 0,6% X300 (B1) et X1000 (B2) ; 1% à X300 (C1) et X1000 (C2) ; 2% à X300 (D1) et X1000 (D2) ; 3% à X300 (E1) et X1000 (E2)

4. EFFET DU PRETRAITEMENT THERMOMECANIQUE COMBINE A UN CATALYSEUR CHIMIQUE SUR L'ALFA

Afin d'élargir la gamme des substrats lignocellulosiques qui ont vocation à être bio-converties en bioéthanol, la plante de l'alfa a été étudiée. L'alfa est une herbe vivace qui pousse spontanément dans les milieux arides et semi arides, c'est une plante endémique de la méditerranée occidentale qui pousse en Afrique du Nord et dans le sud de l'Espagne (Belkhir et al., 2012; Khelifa et al., 2016). Bien que la composition de l'alfa soit similaire à celle de la chènevotte, elle présente des différences tant au niveau physique que chimique. Généralement, les plantes herbacées sont reconnues d'avoir des teneurs en hémicelluloses, en l'occurrence groupement acétyles, plus élevées comparativement aux plantes ligneuses (García et al., 2014). Cet aspect joue un rôle déterminant lors du procédé du prétraitement, du fait de la libération des acides acétiques ainsi que leur action contribuant à l'autohydrolyse de la biomasse. D'autre

part, les plantes herbacées présentent des teneurs en lignine relativement plus faibles (Alvira et al., 2010; Bouiri and Amrani, 2010; Galbe and Zacchi, 2012). Ces caractéristiques représentent des données de base pour l'identification du prétraitement approprié à la nature de chaque type de biomasse lignocellulosique. L'intérêt alors de l'utilisation de l'alfa est d'explorer les variations de son comportement lors des opérations de prétraitement et éventuellement d'hydrolyse enzymatique. Le comportement de l'alfa vis-à-vis du prétraitement thermomécanique en présence de l'acide sulfurique et de l'hydroxyde de sodium a été alors étudié. Les changements de structure, de composition chimique et morphologique ont été analysés afin de déterminer les conditions influençant efficacement la bioconversion.

4.1 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'acide sulfurique par aspersion ou immersion

Cette partie est consacrée à l'évaluation de l'impact du prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique qui est utilisé comme catalyseur des réactions de déstructuration du réseau lignocellulosique. La concentration et la technique d'imprégnation du catalyseur ont été également étudiées pour ce substrat pour seulement un temps d'imprégnation par immersion de 30 minutes. La température et le temps de traitement thermomécanique par DIC ont été maintenus à 165 °C et 30 min. Les modifications structurales, chimiques et morphologiques ont été également analysées.

Les photos prises de l'alfa native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de l'acide sulfurique sont illustrées dans la Figure 82. Les valeurs de concentration en H_2SO_4 ont été variées de 2 à 15% pour l'aspersion et de 0,5 à 3 % (pourcentage massique) pour l'immersion.

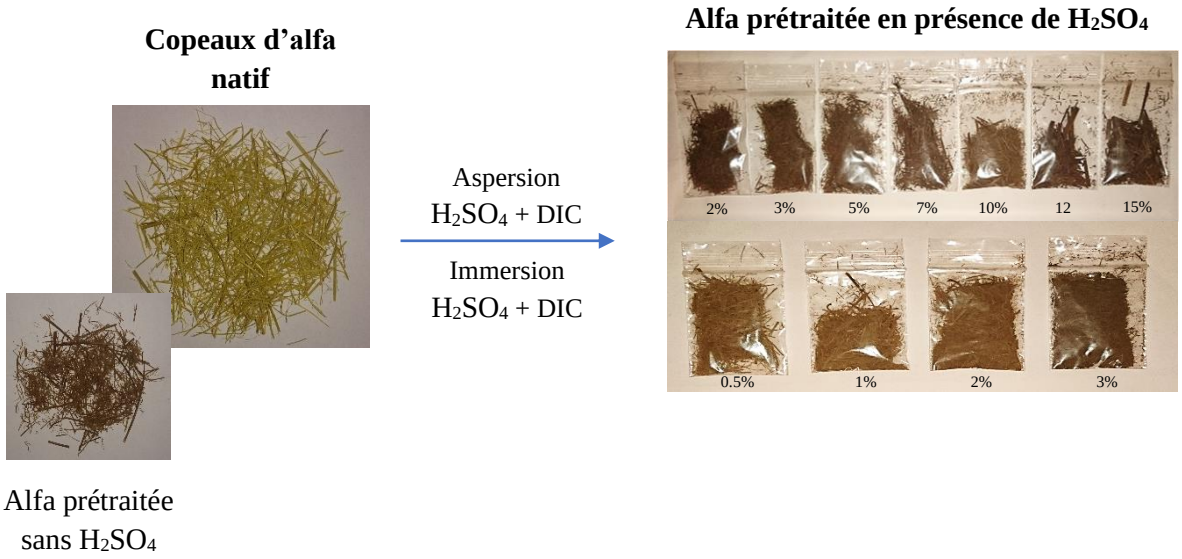


Figure 82 : Photos de l'alfa native et celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de H_2SO_4

De la même façon que sur la chènevotte, l'effet du traitement thermique combiné à des conditions acides provoque sur l'alfa prétraitée un brunissement dont le comportement semble différent de celui de la chènevotte. En effet, la couleur du substrat traité sans catalyseur a largement changé pour l'alfa native contrairement à celle de la chènevotte. Aussi, le brunissement de la matière semble homogène à l'exception du dernier échantillon dont la couleur est plus foncée. On pourrait s'attendre que l'alfa, dont la structure est différente de celle de la chènevotte en termes de teneurs en hémicelluloses et lignine ait plus de sensibilité au traitement thermique et à la présence du catalyseur.

4.1.1 Modifications structurales et texturales

Le Tableau 12 présente les résultats de l'impact du prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique. Le pH avant et après prétraitement thermomécanique, la surface spécifique et la composition chimique ont été mesurés et présentés. La plage de variation de la concentration de l'acide sulfurique s'étend de 2 à 15% massique pour l'aspersion et de 0,5 à 3 % massique pour l'immersion. Les concentrations ont été exprimées par charge de H_2SO_4 rapportée à 100 g de MS, correspondant à des valeurs allant de 0,63 à 4,74% et 0,91 à 6,1% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement (Tableau 12).

Afin d'estimer l'effet de l'intensité des conditions de traitement sur les modifications physico-chimiques, nous avons utilisé l'indice de sévérité (CS), calculé avec des valeurs de pH après imprégnation du catalyseur. CS a varié de -0,20 à 1,34 et de 0,32 à 1,82 pour l'aspersion et l'immersion, respectivement. Pour des concentrations de H_2SO_4 identiques, la valeur de pH de l'alfa mesuré après imprégnation est plus basse que celle obtenue avec la chènevotte et par conséquent cela s'est répercuté sur les valeurs de CS qui ont été plus élevées. Par exemple, l'imprégnation par aspersion avec une solution à 3% en H_2SO_4, correspondant à une charge d'environ 0,9 g/100 g MS a provoqué une baisse du pH de la chènevotte à 4,0 contre 3,0 pour l'alfa. La valeur négative du CS pour la chènevotte (-0,6) traduit le fait que les conditions de prétraitement ne sont pas suffisamment intenses pour provoquer une déstructuration significative de la biomasse lignocellulosique contrairement à l'alfa où CS est positif (0,4). Ces résultats peuvent suggérer que la structure lignocellulosique de l'alfa est moins récalcitrante que celle de la chènevotte, ou que celle-ci se caractérise peut-être par une capacité de neutralisation de l'acide moins importante. En effet, la capacité de neutralisation d'un substrat lignocellulosique dépend de sa teneur en matière minérale (Chen et al., 2012; Eklund et al., 1995; Esteghlalian et al., 1997). La dernière hypothèse peut être soutenue par l'analyse de la composition de la chènevotte en matière minérale, présentée précédemment dans le Tableau 6, (paragraphe 2.3.1) qui montre une teneur en matière minérale plus élevée que celle de l'alfa. Aussi, nous remarquons que les valeurs de pH n'ont pas varié de façon considérable avant et après traitement thermomécanique et ceci quel que soit le type d'imprégnation. En revanche, le pH de l'échantillon non catalysé, a diminué de manière significative après le traitement thermomécanique (Tableau 12). Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'échantillon non catalysé a subi une autohydrolyse durant le procédé DIC. Ce phénomène consiste à l'hydrolyse des groupements acétyles contenus dans la fraction des hémicelluloses et par la suite à la libération des acides acétiques. Cette hydrolyse est gouvernée par l'action des ions H^+

issus de l'autoionisation de l'eau à haute température qui libère des acides tel que l'acide acétique qui hydrolysent à leur tour d'avantage la fraction hémicellulosique (Faik, 2013). Ce phénomène semble plus prononcé pour l'alfa qui contient une teneur en hémicelluloses plus élevée.

La surface spécifique mesurée après le prétraitement combiné, a augmenté au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en acide sulfurique pour les deux modes d'imprégnation (Figure 83). L'accroissement de la surface spécifique qui reflète une matrice plus ouverte est dû principalement à la solubilisation des hémicelluloses, résultat de l'action concomitante du traitement thermique combiné au catalyseur acide. L'analyse de la composition de l'alfa prétraitée (Tableau 12) montre une réduction progressive de la proportion en hémicelluloses lorsque la charge dans le substrat en H_2S0_4 devient importante. Par-ailleurs, Il est à souligner que les teneurs en cellulose et en lignine ont légèrement variées ; une baisse d'environ 5% pour la lignine et une augmentation de 5% pour la cellulose pour le substrat imprégné par aspersion et une teneur quasi-constante pour l'immersion. Par conséquent, la corrélation peut être établit entre la surface spécifique et la solubilisation de la fraction hémicellulosique, qui est elle-même fonction de la charge du substrat par l'agent chimique. En effet, les valeurs maximales de surface spécifique atteintes ont été de 1,6 m^2/g et 2,2 m^2/g pour les échantillons traités thermiquement après imprégnation par aspersion et immersion, respectivement. Correspondant à une augmentation de la surface spécifique de 83,1% et 87,5% et à une réduction de la fraction hémicellulosique de 67,3% et 75,6% pour les concentrations en H_2SO_4 de 15% et 3% par aspersion et immersion, respectivement. En revanche, l'échantillon non catalysé quant à lui présente une valeur de surface spécifique similaire à celle de l'alfa natif. Des résultats similaires ont été rapportés par les travaux de Chen et al., (2011) sur la paille de riz, où une réduction de 93% en hémicellulose et une augmentation de la surface spécifique de sept fois par rapport à l'échantillon natif ont été obtenue après prétraitement à 5% en acide sulfurique combiné à l'explosion à la vapeur.

4.1.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier

Comme précédemment, les analyses structurales de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique imprégné par aspersion ont été effectuées par spectroscopie infrarouge (Figure 84), ainsi que l'attribution des pics effectuée en se basant sur les données de la littérature.

Le pic observé à la longueur d'onde de 1730 cm^{-1} et qui correspond typiquement aux vibrations d'élongation du groupe carbonyle C=O, présent dans la fraction hémicelluloses (Gandolfi et al., 2014; Pereira et al., 2016; Tabassum et al., 2017) est bien visible sur le spectre de l'alfa native. Ce spectre disparait complètement à une concentration de 10% en H_2SO_4, suggérant qu'à ce niveau de concentration en catalyseur, une désacétylation complète a eu lieu, favorisant ainsi l'accessibilité à la cellulose pour les enzymes de saccharification.

Tableau 12 : Valeurs du pH, indice CS, A_{BET} et la composition chimique de l'alfa prétraitée en présence d'acide sulfurique. pH^a et pH^b ont été mesurés avant et après traitement thermomécanique, respectivement.

Essais	IMP	Concentration en H_2SO_4 (%)	Charge de H_2SO_4 (%)	pH^a	pH^b	CS	A_{BET} (m^2/g)	Composition chimique (%MS)		
								CEL	HEM	LIG
Natif	---	---	---	6,03±0,02		---	0,203	47,47	25,19	17,0
1	---	0	0,00	5,99±0,04	4,8±0,01	-2,60	0,272	47,0	24,2	17,3
2	Aspersion	2	0,63	3,59±0,07	3,8±0,01	-0,20	0,363	47,7	23,1	17,1
3		3	0,95	2,99±0,15	3,5±0,01	0,40	0,446	48,4	19,5	16,6
4		5	1,58	2,66±0,02	2,7±0,04	0,73	0,736	48,8	14,2	16,2
5		7	2,21	2,45±0,05	2,6±0,02	0,94	0,963	49,7	10,1	16,4
6		10	3,16	2,20±0,01	2,3±0,01	1,19	1,366	50,1	9,3	13,4
7		12	3,79	2,12±0,03	2,2±0,07	1,27	1,457	52,5	8,6	12,5
8		15	4,74	2,05±0,04	2,1±0,01	1,34	1,613	51,2	7,9	11,7
12	Immersion	0,5	0,91	3,08±0,02	3,23±0,01	0,32	0,921	50,3	18,4	16,9
13		1	2,12	1,96±0,01	2,01±0,02	1,43	1,317	48,8	13,7	15,8
14		2	4,56	1,76±0,01	1,83±0,01	1,64	1,675	49,3	7,8	14,2
15		3	6,10	1,57±0,01	1,72±0,01	1,82	2,171	49,7	5,9	12,1

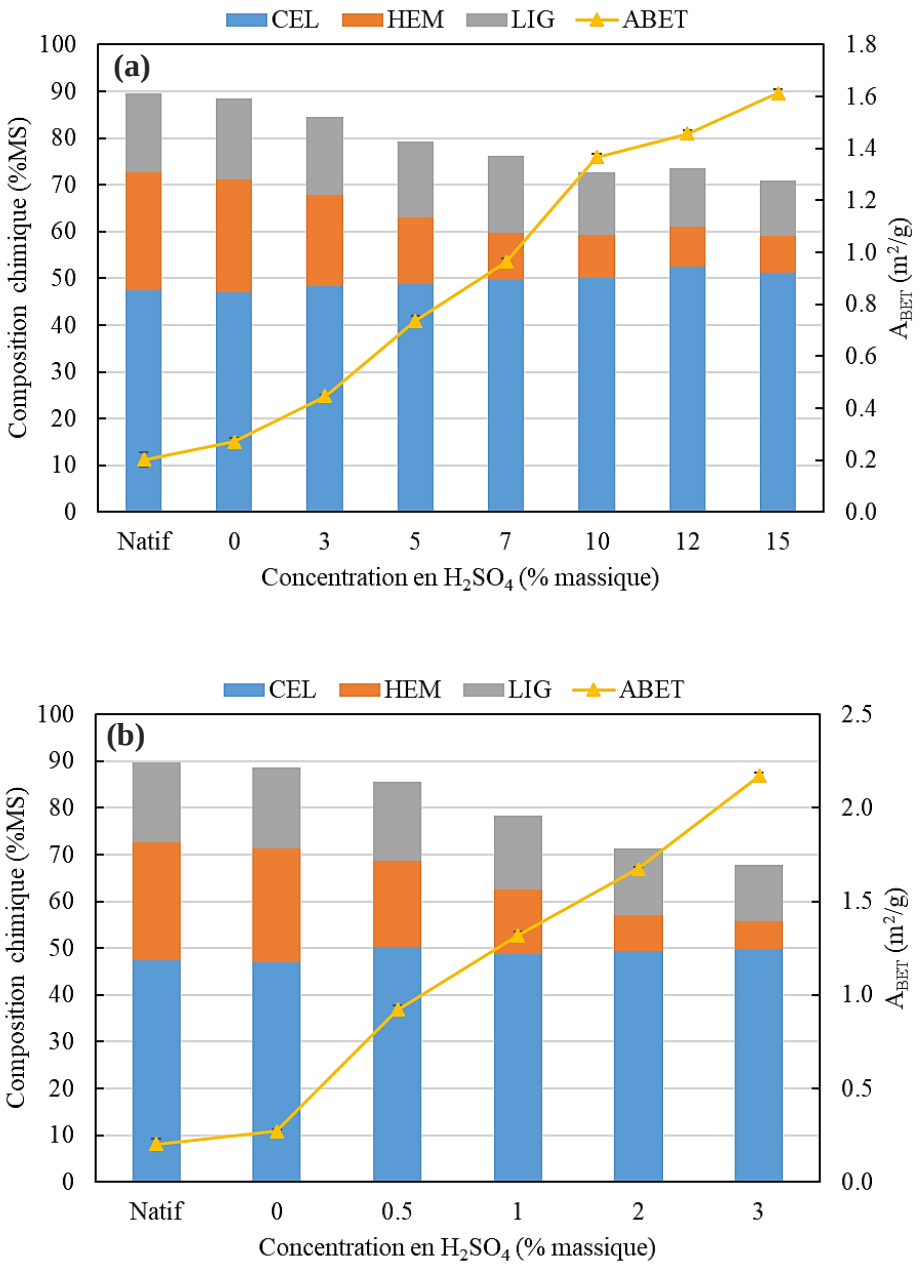


Figure 83 : Variation de la composition chimique et de la surface spécifique de l'alfa prétraitée par DIC combiné à l'imprégnation de l'acide sulfurique à différentes concentrations, (a) : aspersion et (b) : immersion.

Le pic observé à la longueur d'onde de 898 cm^{-1} et qui correspond à la cellulose amorphe reste invariable pour l'ensemble des prétraitements. Alors que ceux observés aux longueurs d'onde de 1320 et 1425 cm^{-1} et qui correspondent à la cellulose cristalline (Pereira et al., 2016) augmentent légèrement au niveau de leur intensité traduisant une probable augmentation de la cristallinité de la cellulose après le prétraitement.

Le pic observé à la longueur d'onde de 1158 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'élongation asymétrique de la liaison éther C-O-C contenue au sein de la cellulose et des hémicelluloses (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). La présence de ce pic dans les spectres de l'ensemble des traitements prouve que la fraction cellulosique a bien été conservée. Quant au pic visible à la

longueur d'onde de 1510 cm^{-1} il correspond à la double liaison C=C présente dans le cycle aromatique de la lignine (Gandolfi et al., 2013; Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013). Ce pic apparait légèrement au niveau des spectres de l'alfa natif et traité sans catalyseur, en revanche, il est observé d'une manière plus prononcée à partir du traitement à 5% en acide sulfurique. L'impact majeur du prétraitement en condition acide est la solubilisation des hémicelluloses, par conséquent, le groupement fonctionnel associé à la lignine est distingué sur des substrats prétraités qu'à des concentrations élevées en acide. C'est la raison pour laquelle l'augmentation de la concentration en acide rend ce pic plus prononcé. Il est à noter que la structure de la lignine est faiblement affectée par le traitement acide comparativement à la fraction hémicellulosique.

Le pic observé à la longueur d'onde de 1242 cm^{-1}, correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenue dans la lignine et les hémicelluloses. Ce pic disparait après le prétraitement à partir d'une concentration en H_2SO_4 de 10%, ce qui indique une rupture de cette liaison dans ces conditions.

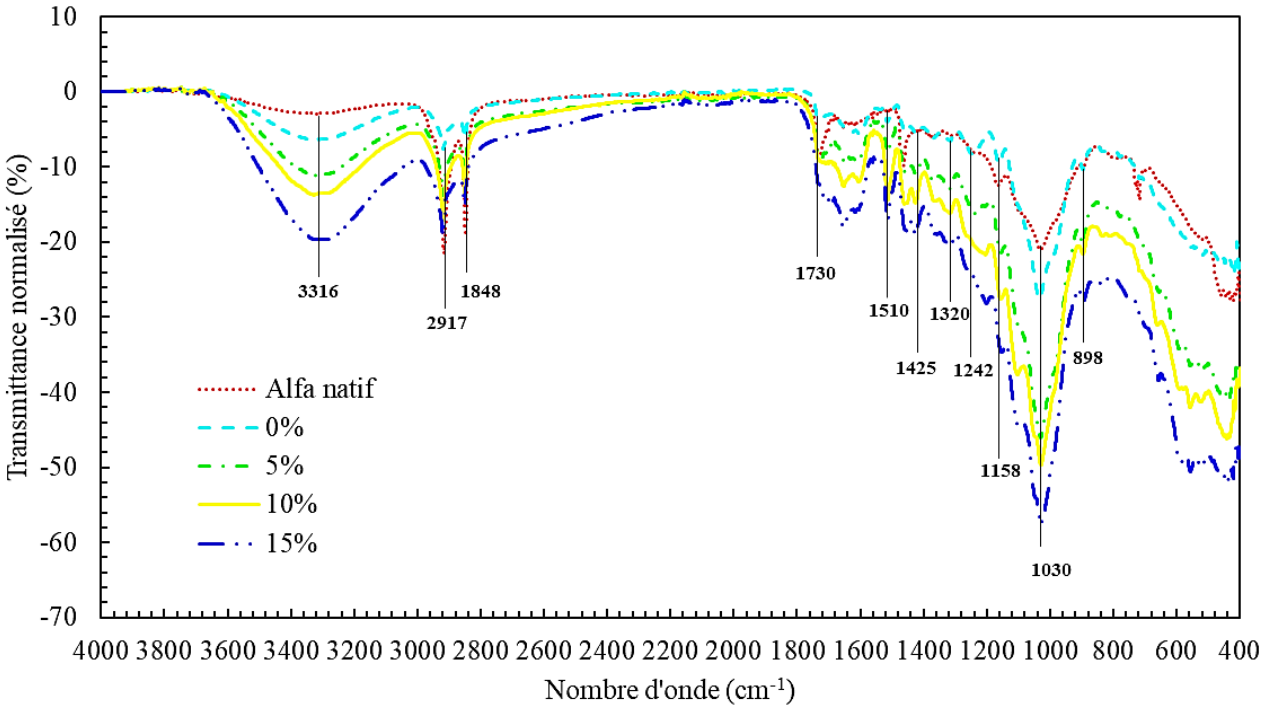


Figure 84 *:* Spectres FTIR de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique imprégné par aspersion à différentes concentrations

4.1.3 Diffraction par rayons X

La cristallinité de l'alfa prétraitée en conditions acides a été évaluée par les analyses à la diffraction aux rayons X. Des échantillons de l'alfa prétraitée à traitement thermomécanique à 165°C pendant 30 min après imprégnation à différentes concentrations en acide sulfurique par aspersion (5, 7, 10, 15%) ou par immersion (0,5, 1, 2, 3%) ont été analysés. Les diagrammes obtenus sont illustrés par les Figure 85A et Figure 85B, correspondant aux prétraitements par aspersion et immersion, respectivement.

La cristallinité de l'alfa à l'état natif et prétraité est représentée par le pic à l'angle 2θ de 22°, correspondants à la présence de la cellulose cristalline. Ce pic augmente d'intensité et devient plus étroit après prétraitement à 5% en acide sulfurique dans le cas de l'aspersion. Au-delà de cette concentration, une baisse de l'intensité de ce pic est observée montrant l'effet des niveaux de concentration élevés en acide sulfurique sur la rupture des liaisons glycosidiques au sein de la cellulose dans l'alfa. Ce qui est le cas aussi pour le pic à l'angle de 17° qui correspond à la cellulose amorphe. En revanche, dans le cas du prétraitement par immersion, ces deux pics restent bien visibles dans l'ensemble des conditions de prétraitement, montrant que probablement l'application de faibles concentrations en acide sulfurique n'a pas affecté la structure de la cellulose dans l'alfa. Des tendances d'observations similaires ont été reportées par les travaux de Wei Hsin Chen et al., (2011) sur le prétraitement à l'acide sulfurique dilué de la bagasse de canne à sucre et aussi par et les travaux de Fan et al., (2014b) sur le prétraitement par explosion à la vapeur en présence d'acide des rafles de maïs.

Le calcul du taux de cristallinité de la cellulose des échantillons de l'alfa étudiés a été effectué (Tableau 13). Nous remarquons que la cristallinité de l'alfa à l'état natif est supérieure à celle de la chènevotte. Cela pourrait être dû à sa faible teneur en lignine comparé à la chènevotte. En se référant à l'alfa non traitée, l'indice de cristallinité de l'alfa prétraitée a légèrement augmenté après prétraitement en présence de l'acide sulfurique à de faible concentration dans le cas de l'aspersion, en l'occurrence à une concentration de 5% et au-delà, l'indice de cristallinité a progressivement régressé. Dans le cas de l'immersion et quel que soit la concentration de l'acide nous avons déjà remarqué que l'indice de cristallinité a généralement diminué. Il semble alors que le prétraitement de l'alfa dans des conditions modérées engendre de légères modifications de son indice de cristallinité.

Tableau 13 : Taux de cristallinité de l'alfa non traitée et prétraitée en présence de l'acide sulfurique.

Essai	Imprégnation	Concentration en H_2SO_4 (%)	Taux de cristallinité (%)
Natif	---	---	25%
1	---	0	20%
2	Aspersion	5	30%
3		7	20%
4		10	20%
5		15	25%
6	Immersion	0,5	15%
7		1	25%
8		2	15%
9		3	20%

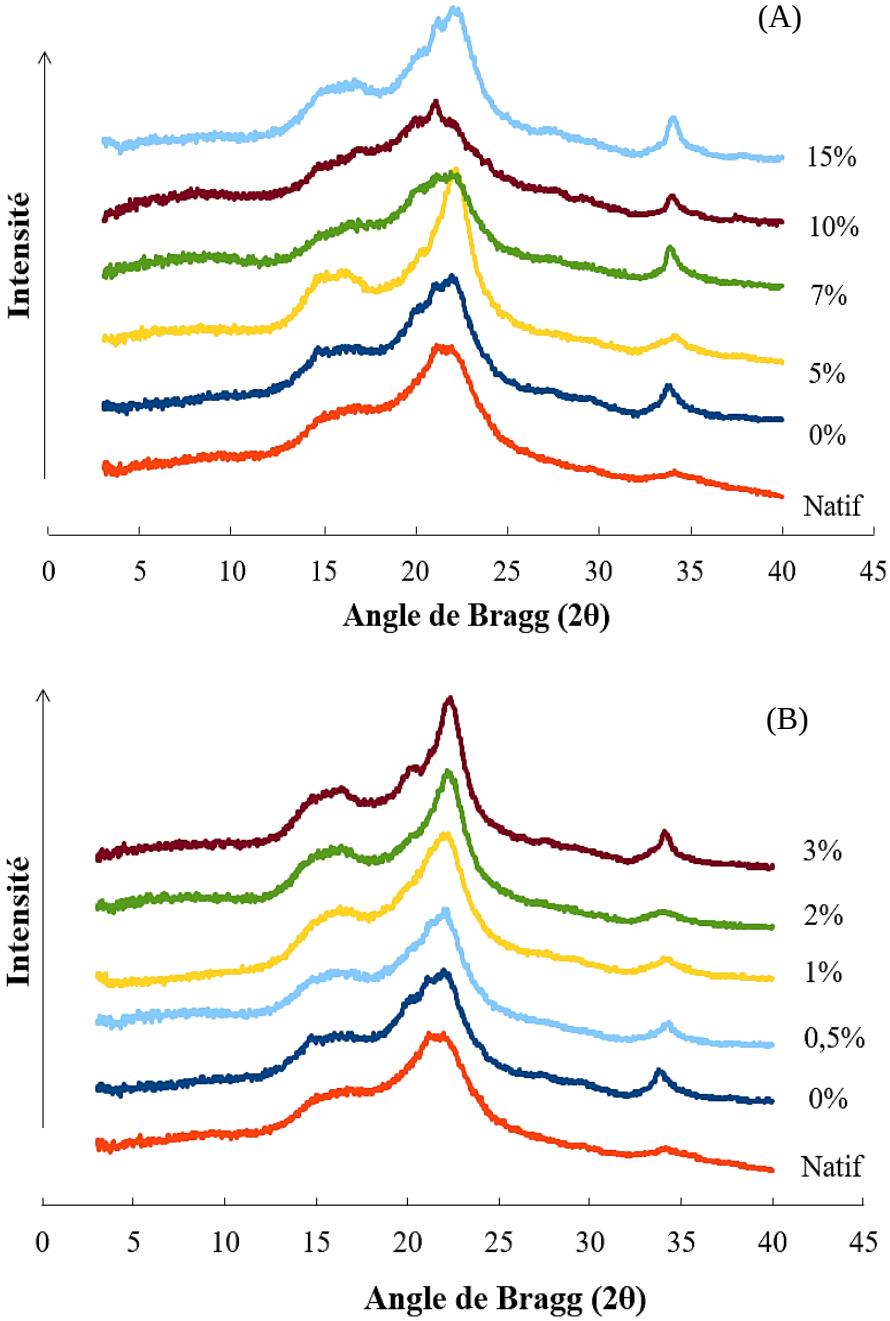


Figure 85 : Spectres de diffraction des rayons X de l'alfa non traitée et prétraitée en présence de l'acide sulfurique par aspersion (A) et immersion(B)

4.1.4 Observations par microscopie électronique à balayage

Les modifications morphologiques de l'alfa prétraitée à différentes concentrations en acide sulfurique imprégné par aspersion ont été observées par microscopie électroniques à balayage. Les images données dans la Figure 86 illustrent les résultats obtenus de ces observations. La microstructure de l'alfa à l'état natif (Figure 86A) montre plusieurs fibres liées entre elles, de forme régulière et uniforme avec une surface recouverte de poils dont la fonction est de minimiser les pertes d'eau excessives et donc de protéger la plante dans son environnement aride. Nous observons également, des cires et des matières gommeuses, communément

identifiés à la surface de la biomasse herbacée, qui forment une couche superficielle. L'alfa prétraitée sans catalyseur (Figure 86B_1 et 86B_2) présente une morphologie quasiment similaire à celle de l'alfa natif, la structure est intacte avec un début de dissociation des fibres et apparition de pores au niveau de la surface externe.

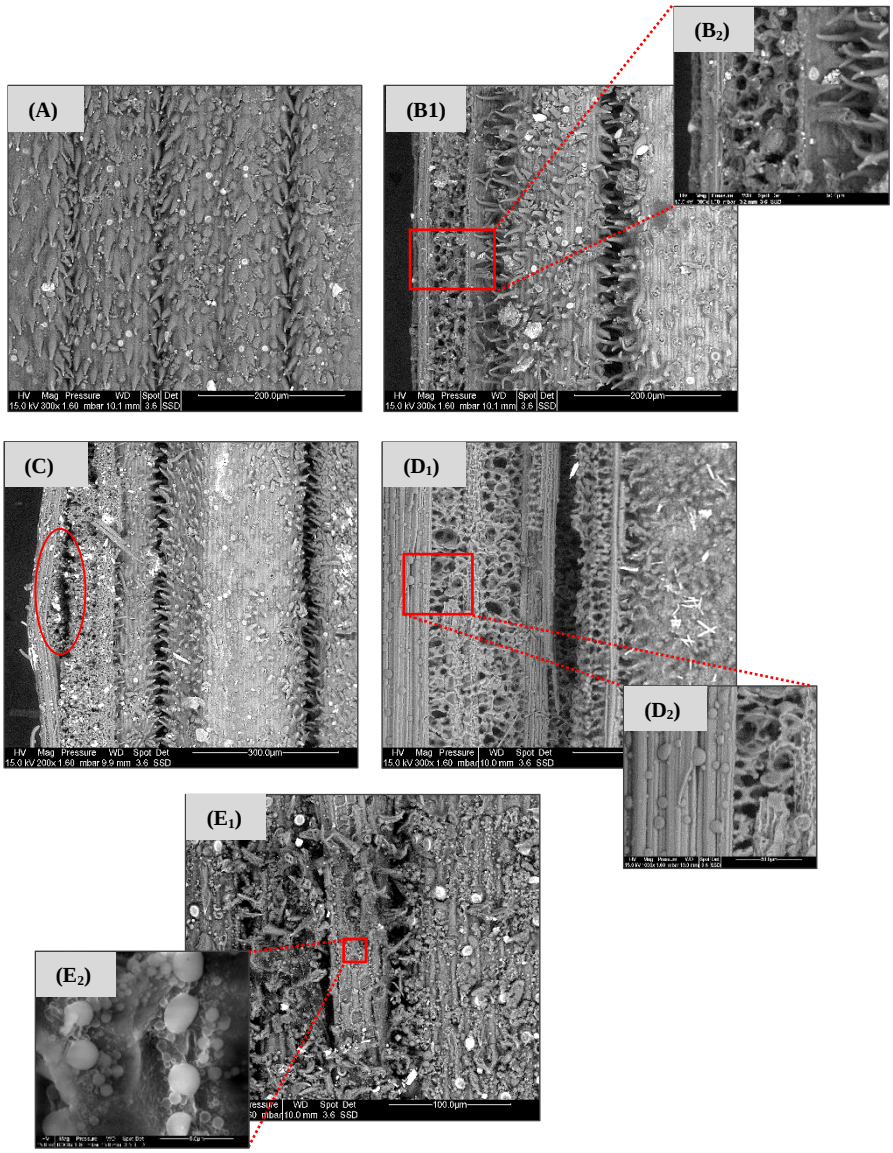


Figure 86 : Images par MEB à différents grossissements de l'alfa prétraitée ; imprégnation par aspersion à différentes concentrations en acide sulfurique : natif à X300(A), 0% à X300(B_1) et X1000(B_2), 5% à X200(C), 10% à X300(D_1) et X1000(D_2), 15% à X500(E_1) et X10000(E_2).

En revanche, les images de l'alfa prétraitée en présence de l'acide sulfurique révèlent des changements au niveau de la morphologie générale lorsque la concentration en acide sulfurique a augmenté ; une désorganisation des faisceaux fibreux apparaît avec la dissociation des fibres, la couche superficielle disparaît et l'apparition des pores augmente. L'alfa prétraitée à partir de 10% en H_2SO_4 laisse apparaître, à un grossissement de X1000 (Figure 86D_2), des formes

sphériques. Ces formes apparaissent aussi à un traitement à 15% en acide et semblent émerger de la paroi cellulaire et se déposer sur la surface (Figure 86E_2, X1000). Selig et al. (2007) ont observé sur les tiges de maïs prétraité par l'acide dilué la formation de ces gouttelettes. Les auteurs ont rapporté que ces gouttelettes proviennent de la matrice lignocellulosique et plus précisément d'un phénomène de migration de la lignine vers la surface après plusieurs réactions au cours d'un prétraitement à haute température sous des conditions acides. D'après les mêmes auteurs, ce phénomène peut impacter négativement la saccharification de la cellulose, car ces gouttelettes de « pseudo-lignine » peuvent former d'une part un obstacle pour les enzymes en formant des liaisons non productives, et d'autre part créer une barrière aux sites actifs des polymères cellulosiques. L'augmentation progressive de la surface spécifique mesurée sur nos échantillons d'alfa traités (Figure 86) montre que les sites actifs ne sont pas entravés par la présence de ces gouttelettes. L'effet barrière a été peut-être neutralisé par les contraintes mécaniques provoquées lors de la détente abrupte.

4.2 Prétraitement thermomécanique du substrat imprégné à l'hydroxyde de sodium par aspersion et immersion

Cette partie du travail est consacrée à l'évaluation de l'impact du prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium sur l'alfa. La concentration et la technique d'imprégnation du catalyseur ont été étudiées. Le temps d'immersion a été fixé à 30 min. La température et le temps du traitement thermomécanique ont été fixés à 165 °C pendant 30 min, respectivement. Les modifications structurales, chimique et morphologiques ont été analysées et sont présentées ci-dessous.

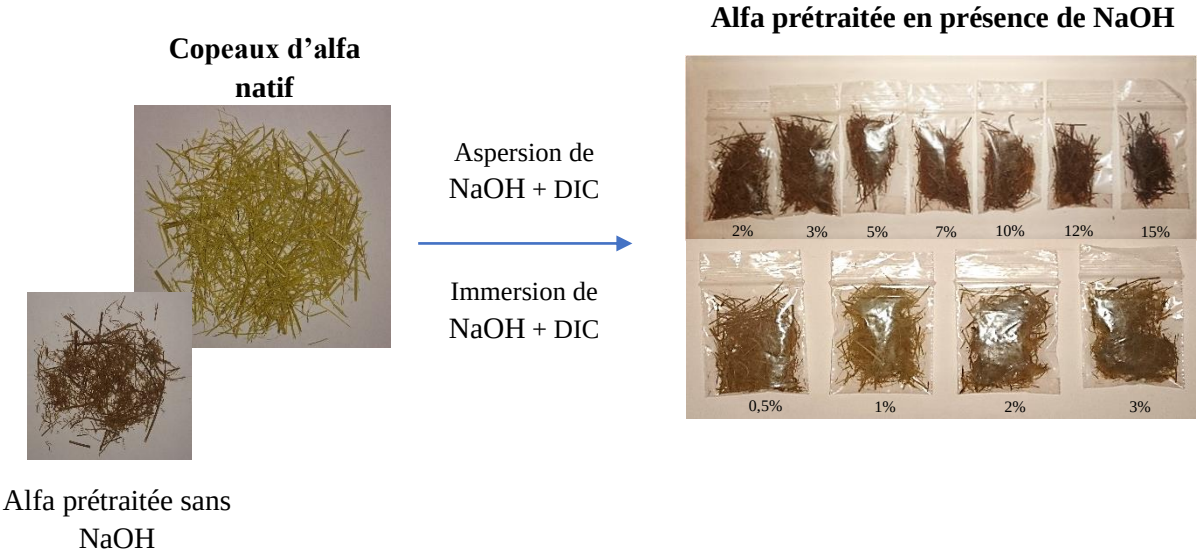


Figure 87 : Photos de l'alfa native et de celles thermomécaniquement traitées sans et en présence de conditions alcalines.

4.2.1 Modifications structurales et texturales

Le Tableau 14 présente l'impact du prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium sur l'alfa. Le pH avant et après prétraitement ainsi que la composition des substrats prétraités ont été mesurés et présentés. Le domaine de variation de la concentration en hydroxyde de sodium a varié de 2 à 15% (pourcentage massique) pour les substrats imprégnés par aspersion et de 0,5 à 3 % (pourcentage massique) pour ceux imprégnés par immersion. Aussi, le chargement en NaOH pour ces concentrations est de 0,63 à 4,74% et 0,9 à 6,1%, respectivement pour l'aspersion et l'immersion.

Le pH de l'alfa native de 6,0 a augmenté après imprégnation avec de l'hydroxyde de sodium par aspersion et immersion de 8,8 à 10,5 et de 8,4 à 13,0, respectivement. Après traitement thermomécanique les valeurs de pH diminuent. Un écart constant d'environ 3 semble exister entre les pH mesurés avant et après traitement uniquement pour les substrats imprégnés par aspersion. Cet écart peut traduire la libération des acides acétiques suite au processus de désacétylation des polymères hémicellulosiques provoqué par le traitement thermique, qui d'ailleurs s'est effectué dans les mêmes conditions pour tous les essais. Ce phénomène en revanche semble ne pas avoir eu lieu pour les échantillons imprégnés par immersion, où l'écart maximal entre les deux valeurs de pH est 0,4. Pour ce dernier, on peut penser que les modifications importantes du réseau lignocellulosique de l'alfa, dû à l'efficacité de l'action des ions hydroxyles au sein de la matière pour briser le réseau lignocellulosique et rendre la biomasse moins récalcitrante, se sont produites principalement au cours de l'immersion.

L'analyse de la composition montre une réduction de la proportion en hémicelluloses et lignine pour tous les substrats testés alors que la proportion en cellulose reste stable. La réduction maximale en hémicelluloses et en lignine a été obtenue à des concentrations en NaOH de 15% et 3% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement. Correspondant à des réductions des hémicelluloses de 72% et 73% pour l'alfa imprégnée par 4,7% et 5,9% de charge en NaOH par aspersion et immersion, respectivement. Aussi, pour les mêmes charges en NaOH par aspersion et immersion, l'élimination de la lignine mesurée après traitement thermique a été importante pour les deux types d'imprégnation ; de 75% et 80%. En revanche, les résultats de l'analyse de la composition de l'alfa non imprégnée par NaOH montrent l'intérêt de la présence de l'agent chimique alcalin puisqu'une faible variation de la composition a été observée par rapport aux résultats du substrat natif.

Tableau 14 : Valeurs du pH, A_{BET} et la composition chimique de l'alfa prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium. pH^a et pH^b ont été mesurés avant et après traitement thermomécanique, respectivement.

Essais	IMP	Concentration en NAOH (%)	Charge en NaOH (%)	pH^a	pH^b	Composition chimique (%MS)		
						CEL	HEM	LIG
Natif		---	---	6,03± 0,02		47,5	25,19	17,0
1	---	0	0,00	5,99± 0,04	4,8±0,01	47,0	24,2	17,3
2	Aspersion	2	0,63	8,84±0,02	5,63±0,04	47,2	24,5	17,2
3		3	0,95	8,94±0,03	5,74± 0,06	46,9	24,4	16,5
4		5	1,58	9,18±0,02	6,40±0,14	48,2	23,5	16,1
5		7	2,21	9,61± 0,03	6,42± 0,01	47,6	21,8	12,9
6		10	3,16	10,05± 0,03	6,84± 0,01	47,8	15,0	10,5
7		12	3,79	10,17± 0,03	7,14±0,03	48,8	8,7	7,0
8		15	4,74	10,48± 0,02	7,76± 0,05	49,5	7,0	6,3
12	Immersion	0,5	1,20	8,37±0,02	8,20±0,01	49,4	23,5	15,1
13		1	1,83	10,85±0,03	10,48±0,01	48,6	17,9	13,4
14		2	4,89	11,53±0,03	11,06±0,01	48,1	7,3	5,5
15		3	5,93	13,04±0,02	12,88±0,01	47,7	6,7	4,8

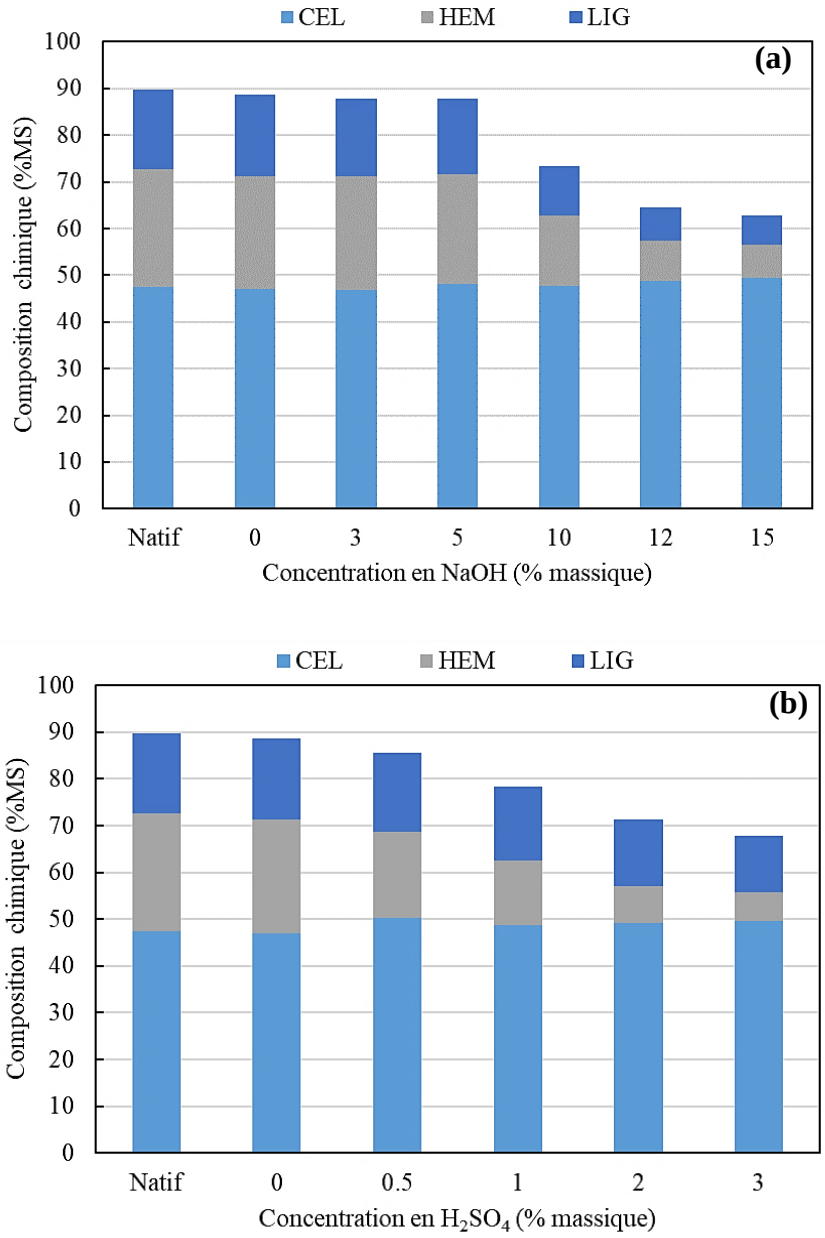


Figure 88 : Variation de la composition chimique de l'alfa imprégnée par l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (a) et immersion (b) et prétraitée par DIC

4.2.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourrier

La Figure 89 illustre les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium imprégné par aspersion à différentes concentrations. Le pic observé à la longueur d'onde de 1730 cm^{-1} et correspondant à la liaison carbonyle majoritairement présente dans la fraction hémicellulosique, présente une intensité importante dans le cas du substrat natif. L'intensité du pic diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en hydroxyde de sodium, pour disparaître à la concentration de 15% en NaOH, ce qui indique une complète hydrolyse de cette liaison carbonyle.

L'intensité du pic observé à la longueur d'onde de 898 cm^{-1} et qui correspond à la cellulose amorphe, augmente progressivement avec la concentration en NaOH de l'alfa prétraitée. Alors que l'intensité des pics observés aux longueur d'ondes de 1320, 1370 et 1425 cm^{-1} et qui correspondent à la cellulose cristalline (Pereira et al., 2016) diminue avec l'augmentation de la concentration en NaOH. Ces résultats traduisent le fait que le prétraitement thermomécanique combiné à la présence de l'hydroxyde de sodium a provoqué dans la structure une augmentation des zones amorphes, et une diminution de la cristallinité de la cellulose, ce qui va dans le sens d'une meilleure saccharification. La présence des pics observés à la longueur d'onde de 1158 cm^{-1} pour l'ensemble des échantillons et qui sont attribués aux vibrations d'élongation asymétrique de la liaison éther C-O-C contenue au sein de la cellulose prouve que la fraction cellulosique a bien été conservée après le prétraitement (Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013), résultat en accord avec l'analyse de la composition de l'alfa prétraitée présentée dans le Tableau 14. L'intensité du pic observé à la longueur d'onde de 1510 cm^{-1} , caractéristique de la double liaison C=C du cycle aromatique de la lignine (Gandolfi et al., 2013; Pereira et al., 2016; Xu et al., 2013), diminue avec la concentration en hydroxyde de sodium. Ce pic disparaît totalement à une concentration de 15% en NaOH, signifiant une importante déstructuration de la lignine. Ces résultats sont également en accord avec l'analyse de la composition chimique. Le pic observé à la longueur d'onde de 1242 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O contenue dans la lignine et les hémicelluloses, Ce pic disparait après le prétraitement à partir d'une concentration de 10% en NaOH, ce qui indique la rupture de cette liaison dans ces conditions.

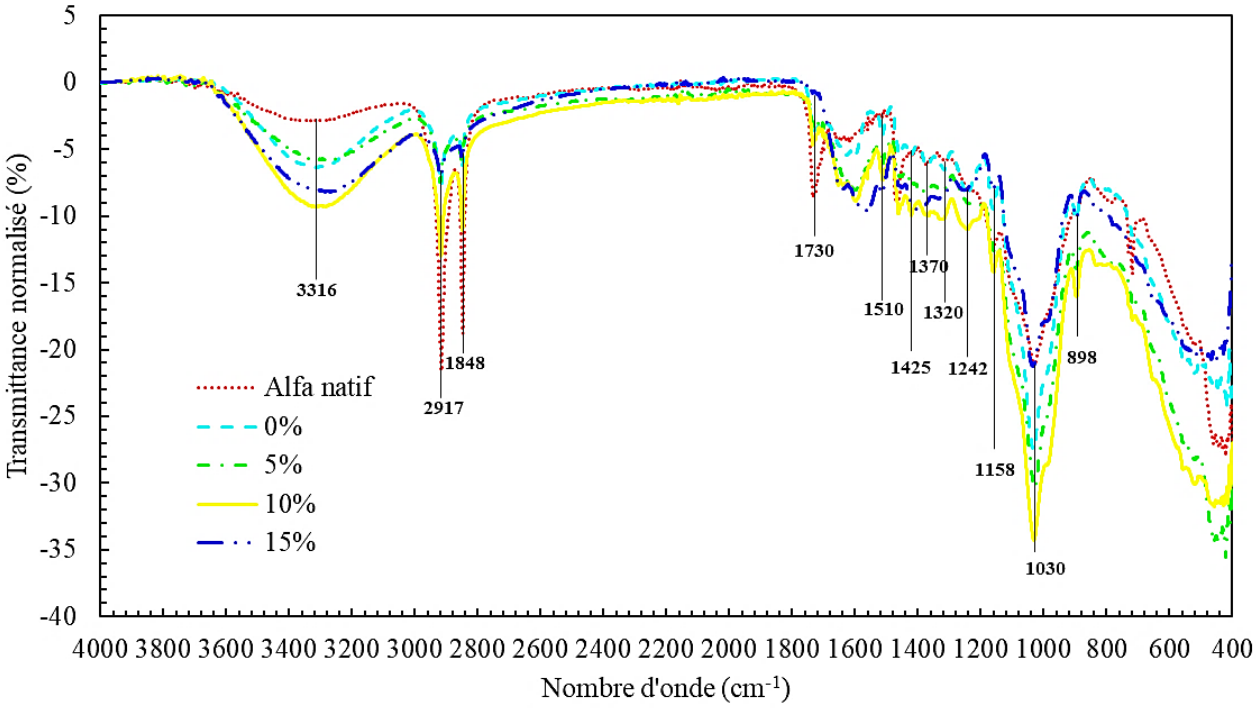


Figure 89 : Spectres FTIR de l'alfa prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium imprégné par aspersion à différentes concentrations

4.2.3 Diffraction par rayons X

La cristallinité de l'alfa prétraitée en conditions basiques a été évaluée par les analyses à la DRX. Des échantillons de l'alfa prétraitée à traitement thermomécanique à 165°C pendant 30 min après imprégnation à différentes concentrations en hydroxyde de sodium par aspersion (5, 7, 10, 15%) ou par immersion (0,5, 1, 2, 3%) ont été analysés. Les diagrammes obtenus sont illustrés par les Figure 90A et Figure 90B, correspondant aux prétraitements par aspersion et immersion, respectivement.

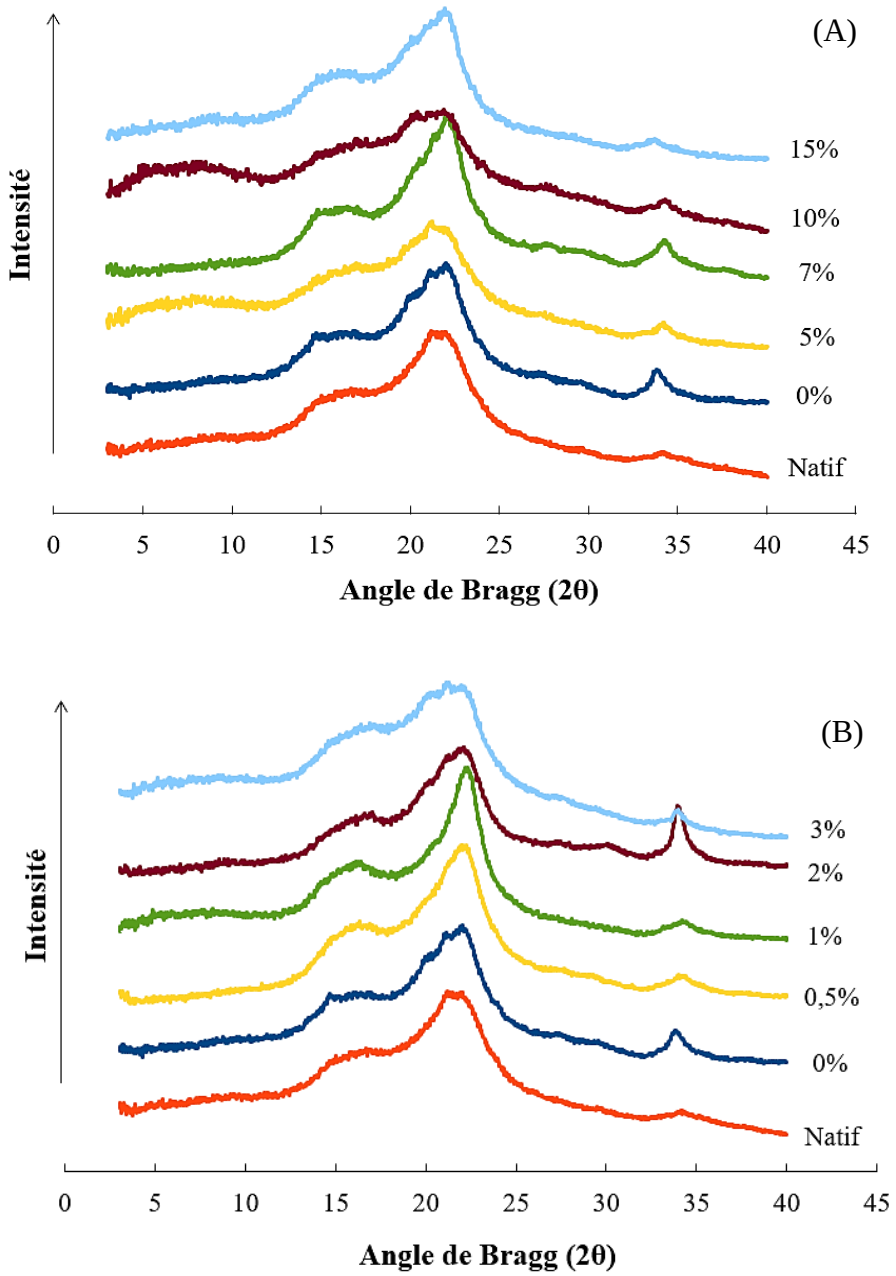


Figure 90 : Diagrammes de diffraction des rayons X de l'alfa native et prétraitée en présence de l'hydroxyde de sodium à différentes concentrations par aspersion (A) et immersion (B)

En se référant à l'alfa native, nous remarquons que le pic caractéristique de la cellulose cristalline observé à 22° et celui caractéristique de la cellulose amorphe observé à 17° augmentent d'intensité et deviennent plus étroits après le prétraitement jusqu'à une concentration de 7% pour l'aspersion et 1% pour l'immersion. Ainsi, ces résultats montrent que jusqu'à ces conditions de prétraitement, la structure de la fraction cellulosique reste sans modification. Une réduction est observée à partir de l'application d'une concentration en hydroxyde de sodium de 10% dans le cas de l'aspersion et 2% dans le cas de l'immersion. Cela explique le fait que des chargements élevés en hydroxyde de sodium engendre une transformation de la structure cristalline principalement suite à l'action de l'agent alcalin à haute température dans la rupture des liaisons glycosidique au sein de la cellulose.

Le calcul du taux de cristallinité de la cellulose des échantillons de l'alfa étudiés a été effectué (Tableau 15). En se référant à l'alfa native, l'indice de cristallinité de l'alfa prétraitée a généralement diminué après prétraitement en présence de l'hydroxyde de sodium. Comparativement au prétraitement acide, le prétraitement alcalin affecte la cristallinité de la cellulose par pénétration des cations Na^+ au sein de sa structure, engendrant son gonflement ainsi que la diminution de son indice de cristallinité (Karimi et al., 2014). Il a été démontré que les prétraitement à des niveaux de pH élevés jouent un rôle dans la décristallisation de la cellulose ce qui implique la baisse de l'indice de cristallinité du substrat prétraité (Kumar et al., 2009b).

Tableau 15 : Taux de cristallinité de l'alfa non traitée et prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium

Essai	Imprégnation	Concentration en NaOH (%)	Taux de cristallinité (%)
Natif	---	---	25
1	---	0	20
2	Aspersion	5	15
3		7	25
4		10	15
5		15	20
6	Immersion	5	20
7		7	20
8		10	20
9		15	20

4.2.4 Observations par microscopie électronique à balayage

Les observations par microscopie électronique à balayage ont permis également dans le cas de l'alfa d'observer les changements provoqués au niveau de la microstructure par le prétraitement thermomécanique par le procédé DIC dans des conditions basiques. La Figure 91 montre que la structure uniforme et régulière de l'alfa native a subi une désorganisation après le prétraitement, qui s'est intensifiée au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration de

l'agent chimique. En effet, l'image du substrat prétraité à 5% en NaOH (Figure 91B) montre un début de dissociation des faisceaux fibreux par la présence plus marquée de crevasses entre les fibres, contribuant à fragiliser la couche externe nécessaire à leur cohésion.

Pour les concentrations plus élevées ; 10 et 15% en NaOH, dans la structure fragilisée apparaissent des pores au niveau de la surface externe. L'altération semble plus avancée dans la microstructure de l'alfa prétraitée en présence de la concentration de 15% en NaOH, les faisceaux fibreux sont plus poreux et fissurés, ce qui correspond bien à une élimination des fractions des hémicelluloses et de la lignine.

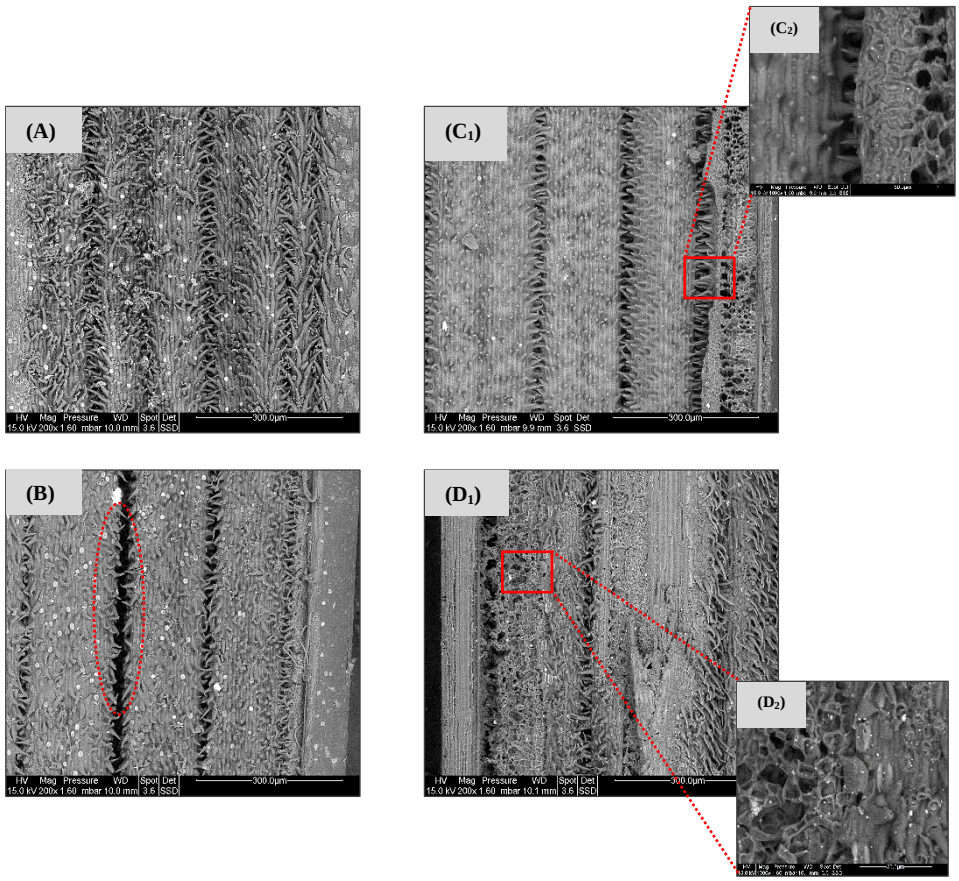


Figure 91 *:* Images par MEB de l'alfa imprégnée de l'hydroxyde de sodium par aspersion et thermomécaniquement traitée : natif à X200(A) ; 5% à X200(B) ; 10% à X200(C_1) et X1000(C_2) ; 15% à X200(D_1) et X1000(D_2).

5. CONCLUSION

L'objectif principal de tout prétraitement est de rendre la biomasse accessible à l'action des enzymes, en déstructurant la matrice lignocellulosique afin d'augmenter le nombre de sites actifs pour les cellulases. Cet objectif peut être atteint par élimination de la lignine, solubilisation partielle ou totale des hémicelluloses et/ou par réduction de la structure cristalline de la cellulose.

Dans ce chapitre nous avons présenté les résultats de l'étude sur les modifications des propriétés physico-chimiques obtenues suite à l'application des prétraitements à deux substrats lignocellulosiques, à savoir la chènevotte et l'alfa. La caractérisation physico-chimique de ces deux biomasses a été réalisée à l'aide de techniques microscopiques, spectroscopique et chimique. Les résultats obtenus ont montré que les modifications engendrées dans le matériau dépendent fortement des conditions du prétraitement ; à savoir la présence ou non du catalyseur, le type de catalyseur, la méthode d'imprégnation de l'agent chimique dans le substrat ainsi que sa concentration. Toutes ces conditions d'activité de l'agent chimique ont été combinées au traitement thermomécanique dont la température et la durée de traitement ont été fixées à 165 °C et 30 min. L'utilisation de catalyseurs présente l'avantage d'agir sur les liaisons de la matrice lignocellulosique en combinaison avec l'apport énergétique pendant le traitement thermomécanique à haute température.

Le prétraitement thermomécanique combiné à l'imprégnation par acide sulfurique a provoqué des changements importants pour les deux matières lignocellulosiques, notamment la réduction de la teneur en hémicelluloses et la transformation de la lignine. Le maximum de réduction de la fraction hémicellulosique obtenu pour la chènevotte imprégnée par H_2SO_4, à des concentrations de 20%, 3% et 5%, a été de 48%, 50% et 50% par aspersion et immersion pendant 10 et 30 min, respectivement. Alors que pour l'alfa, la réduction en proportion d'hémicelluloses a été plus élevée ; de 68% et 76% obtenue à des concentrations en H_2SO_4 imprégné par aspersion et immersion de 15% et 3%, respectivement. On en déduit alors que les besoins en charge d'acide sulfurique de la chènevotte sont supérieurs à ceux de l'alfa. Cela est lié non seulement au fait que l'alfa est composé d'une fraction en hémicellulose plus élevé, conduisant à la libération des acides acétiques pendant le traitement hydrothermique, mais aussi à la capacité de neutralisation de l'acide sulfurique caractéristique de la chènevotte. Il est à souligner que cet effet de neutralisation est moins marqué lorsque le substrat a été imprégné par immersion. Les proportions en lignine ont relativement diminué à des fortes concentrations en acide sulfurique pour les deux matières étudiées. Le maximum de réduction atteint pour la chènevotte est de 54%, 70%, 74% obtenu à 50%, 10% et 10% en acide sulfurique pour l'aspersion, l'immersion à 10 et 30 min, respectivement. Pour l'alfa, la réduction de la lignine a atteint 31% et 28% à des concentrations en acide sulfurique de 15% et 3% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement.

Le prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium a également modifié la composition des deux substrats lignocellulosiques en réagissant avec les fractions hémicellulosiques et de lignine. En effet, la réduction maximale des hémicelluloses a été de 35%, 38% et 40% pour la chènevotte imprégnée par 30%, 3% et 3% de NaOH par aspersion, immersion à 10 et 30 min, respectivement. Pour les mêmes conditions, l'élimination de la lignine a été de 44%, 62% et 67%. Aussi, la réduction de la proportion des hémicelluloses et de la lignine de l'alfa après prétraitement a été importante, les diminutions maximales en hémicelluloses ont été de 72% et 73% et en lignine de 75% et 80%, pour respectivement 15% et 3% de charge en NaOH imprégnée par aspersion et immersion. Contrairement à l'acide sulfurique, où la différence entre les deux techniques d'imprégnation était modérée, les

différences sont plus marquées entre l'imprégnation par aspersion et par immersion en présence de NaOH.

En revanche, la modification de la proportion de cellulose a été très modérée pour les deux substrats traités. L'augmentation de la teneur a été progressive pour les matières imprégnées par aspersion contrairement à l'immersion, pour atteindre une valeur maximale d'environ 4%. Les analyses de la structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont montré que pour les deux biomasses, le prétraitement en milieu acide a provoqué une augmentation de la cristallinité du substrat prétraité, alors que celui en milieu alcalin, une diminution de la cristallinité de la cellulose a été observée. Ces résultats ont été corroborés avec ceux de l'analyse par diffraction des rayons X, montrant que dans certaines conditions, en prétraitement acide, l'élimination des fractions amorphes des hémicelluloses du substrat lignocellulosique contribue à l'augmentation de sa cristallinité. En revanche, sous l'effet de l'agent alcalin, l'élimination des hémicelluloses et de la lignine contribuent à la diminution de la cristallinité du substrat prétraité. Ce qui explique que dans ce dernier cas, l'effet du prétraitement engendre une décristallisation de la structure cellulosique.

Toutes ces modifications au niveau de la structure lignocellulosique ont contribué à améliorer la surface spécifique des deux substrats prétraités. La surface spécifique qui est un bon indicateur de l'accessibilité aux sites actifs par les enzymes a augmenté au fur et à mesure de la solubilisation des hémicelluloses et de l'élimination de la lignine. En conclusion, l'efficacité d'un traitement se mesure par l'accessibilité à la cellulose pour qu'elle puisse être dégradée, et que l'on peut évaluer par la quantité de sucres réducteurs (hexoses et pentoses) libérés après action des enzymes.

Chapitre 4 :

Hydrolyse enzymatique de la biomasse prétraitée. Essais de fermentation

Table des matières

1. INTRODUCTION 160
2. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE 160
2.1 Effet du prétraitement en conditions acides 161
2.1.1 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique 161
2.1.2 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs 165
2.1.3 Distribution des sucres monomères et composés inhibiteurs dans l'hydrolysat . 168
2.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines 172
2.2.1 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique 173
2.2.2 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs 177
2.2.3 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat 179
2.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de la chènevotte prétraitée en conditions acides et alcalines 180
3. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'ALFA 184
3.1 Effet du prétraitement en conditions acides 184
3.1.1 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs 185
3.1.2 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat 188
3.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines 189
3.2.1 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs 190
3.2.2 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat 192
3.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de l'alfa prétraitée en conditions acides et alcalines 193
4. EFFET D'AUTRES PARAMETRES SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE 195
4.1 Effet de la granulométrie 195
4.2 Effet de la teneur en eau en solution d'imprégnation 196
4.3 Effet de la détente vers le vide lors du traitement thermomécanique 198
5. OPTIMISATION DE LA BIOCONVERSION DE LA CHENEVOTTE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES 200
5.1 Optimisation des conditions de prétraitement 200
5.1.1 Optimisation du prétraitement en conditions acides 201
5.1.2 Optimisation du prétraitement en conditions alcalines 204
5.2 Optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique 207
6. ESSAIS DE FERMENTATION ALCOOLIQUE 211
6.1 Essais préliminaires 211
6.2 Fermentation des hydrolysats de la chènevotte 212
6.2.1 Effet de l'ajout des nutriments sur la fermentation de l'hydrolysat de chènevotte 212
6.2.2 Suivi de la cinétique de fermentation des points optimaux 213
6.2.3 Comparaison du rendement en éthanol entre différents hydrolysats 213
7. CONCLUSION 215

Liste des figures

Figure 92 : Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en conditions acide. Imprégnation de H_2SO_4 par aspersion (A), immersion pendant 10 (B) et 30 min (C) 163

Figure 93: Variation de la concentration en sucres réducteurs déterminés à 0 h (R_1) et à 24 h (R_2) en fonction de CS (A_1 et B_1), A_{BET} (A_2 et B_2) et la réduction en hémicelluloses (A_3 et B_3), respectivement. Imprégnation du substrat avec de H_2SO_4 avant prétraitement par aspersion, et immersion pendant 10 min. 167

Figure 94 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de la chènevotte prétraitée en conditions acides, après imprégnation par aspersion (A) et immersion (B) 170

Figure 95 : Concentrations en composés inhibiteurs de la fermentation. (A) et (B): imprégnation de l'acide par aspersion et immersion (10min), respectivement..... 172

Figure 96 : Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines. Imprégnation de NaOH par aspersion (A), immersion pendant 10 (B) et 30 min (C) 174

Figure 97 : Variation de la concentration en sucres réducteurs déterminés à 0 h (R_1) et à 24 h (R_2) en fonction de la charge en NaOH (A_1, B_1) et du taux de réduction en lignine (A_2, B_2), respectivement. Imprégnation du substrat avec NaOH par aspersion et immersion pendant 10 min..... 178

Figure 98 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines. Imprégnation de l'agent chimique par aspersion (A) ou immersion (B) 180

Figure 99 : Rendement global en sucres réducteurs récupérés de la chènevotte prétraitée par procédé thermomécanique combiné à l'acide sulfurique (A), ou à l'hydroxyde de sodium (B) 181

Figure 100 : Variation de R_1 et R_2 en en fonction de CS (A_1, B_1), A_{BET} (A_2, B_2) et de la réduction en hémicelluloses (A_3, B_3) de l'alfa prétraitée en conditions acides. 187

Figure 101 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de l'alfa prétraitée en fonction de la charge en H_2SO_4. Imprégnation de l'acide par aspersion (A) ou immersion (B). 189

Figure 102 : Variation de R_1 et R_2 en fonction de la charge en NaOH (A_1, A_2) et du taux de réduction en lignine (B_1, B_2) de l'alfa prétraitée en conditions alcalines. 191

Figure 103 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de l'alfa prétraitée en fonction de la charge en NaOH. Imprégnation de la base par aspersion (A) ou immersion (B). 193

Figure 104 : Rendement global en sucres réducteurs récupérés après hydrolyse de l'alfa prétraitée en présence de l'acide sulfurique (A), ou de l'hydroxyde de sodium (B) 194

Figure 105 : Effet de l'interaction entre la granulométrie de la chènevotte et la concentration en acide sulfurique sur l'hydrolyse enzymatique 196

Figure 106 : Effet de la variation de la teneur en eau pendant le prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique 198

Figure 107 : Schéma de principe des traitements hydrothermique par DV-HMT, RP-HMT et DIC. 199

Figure 108 : Effet de la détente vers le vide pendant le prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique. 199

Figure 109 : Analyse par le diagramme de Pareto (A) et le diagramme des effets séparés (B) du rendement global en sucres réducteurs du prétraitement acide. 203

Figure 110 : Effet simultané de la concentration en acide sulfurique et du temps sur la réponse. 204

Figure 111 : Analyse par le diagramme de Pareto (a) et le diagramme des effets séparés (b) du rendement global en sucres réducteurs du prétraitement alcalin 206

Figure 112 : Surfaces de réponses présentant simultanément l'effet de la concentration en hydroxyde de sodium, température et temps de résidence sur la réponse RGS. (a) RGS en fonction de la concentration et du temps de traitement ; (b) RGS en fonction de la température et du temps ; (c) RGS en fonction de la concentration en NaOH et de la température. 207

Figure 113 : Analyse par le diagramme de Pareto (a) et le diagramme des effets séparés (b) de la conversion cellulosique en hydrolyse enzymatique 209

Figure 114 : Surfaces de réponses présentant simultanément l'effet de la concentration en enzymes, rapport S/L et vitesse d'agitation sur la réponse RCC. (a) RCC en fonction de la concentration en enzymes et le rapport S/L ; (b) RCC en fonction de la concentration en enzymes et la vitesse d'agitation ; (c) RCC en fonction du rapport S/L et la vitesse d'agitation. 210

Figure 115 : Cinétique de la fermentation alcoolique 213

Figure 116 : Rendements de Gay-Lussac et concentrations finales en éthanol après 24 h de fermentation. 215

1. INTRODUCTION

Ce chapitre a pour principal objectif l'étude de l'hydrolyse enzymatique des deux substrats préalablement prétraités. La chènevotte représente le bois résiduel récupéré après l'opération de défibrage mécanique de la tige du chanvre industriel, et l'alfa une plante herbacée endémique largement présente dans la région orientale du Maroc. Compte tenu de leur importante fraction holocellulosique et des avantages qu'ils disposent en termes de disponibilité et de coût, l'utilisation de ces deux substrats est intéressante pour l'étude de la bioconversion en éthanol.

L'hydrolyse enzymatique est une étape déterminante dans le procédé de bioconversion de la biomasse lignocellulosique. Elle consiste à hydrolyser les polymères cellulosiques en monomères de glucose fermentescibles en éthanol. Il existe plusieurs facteurs qui influencent la digestibilité de la cellulose, dont certains sont liés aux caractéristiques du substrat ; comme la surface d'échange, la teneur en hémicelluloses, en lignine et le taux de cristallinité de la fraction cellulosique, etc… Les liens entre les caractéristiques des deux substrats prétraités en conditions acides ou alcalines avec leurs comportements à la saccharification enzymatique ont été peu étudiés. En effet, l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique dépend strictement des conditions du prétraitement car elles sont directement liées aux modifications produites au sein du substrat lignocellulosique tel que le taux d'élimination des hémicelluloses ou de la lignine, ainsi que la surface spécifique développée.

Nous avons étudié dans un premier temps les liens qui existent entre les performances de l'hydrolyse enzymatique, à travers le suivi de la vitesse d'hydrolyse et la mesure des concentrations en sucres réducteurs obtenues à l'équilibre de la réaction enzymatique, et les conditions du prétraitement ainsi que les caractéristiques du substrat prétraité. L'ensemble de ces éléments nous a fourni des données de comparaison entre la réactivité des deux matières premières vis-à-vis des conditions opératoires de prétraitement utilisées, ainsi que sur l'efficacité de chaque prétraitement dans l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique.

Ensuite, il nous est apparu intéressant de compléter ces résultats par une étude d'optimisation des conditions de prétraitement, en conditions acides ou alcalines, avec l'étape d'hydrolyse enzymatique qui permet de maximiser les quantités de sucres monomères libérées. Enfin, des essais ont été réalisés de fermentation de l'hydrolysat obtenu en éthanol.

2. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE

Les modifications produites au sein de la chènevotte suite au prétraitement constituent des éléments essentiels affectant le processus d'hydrolyse enzymatique. Ces modifications dépendent des conditions du prétraitement, notamment la nature du catalyseur ajouté, sa concentration ainsi que la technique de son imprégnation dans le substrat. Les résultats de la caractérisation de la composition chimique de la chènevotte prétraitée donnés dans le chapitre précédant, ont montré principalement une réduction des teneurs en hémicelluloses et en lignine en conditions acides et basiques, respectivement. Dans ces conditions, la solubilisation et l'élimination de ces composants ont engendré une augmentation de la surface spécifique du

substrat prétraité. La surface d'échange au sein de la chènevotte devient alors plus disponible rendant les sites actifs de la cellulose plus accessibles aux réactions enzymatiques.

2.1 Effet du prétraitement en conditions acides

Les résultats de caractérisation chimique de la chènevotte prétraitée en conditions acides, présentés dans le chapitre précédant, ont clairement montré que la principale action de ce traitement est la solubilisation de la fraction hémicellulosique, fonction de la technique d'imprégnation de l'acide et de la sévérité des conditions utilisées lors du prétraitement. En effet, à haute température, l'acide participe à la rupture des liaisons de la matière lignocellulosique par l'action des ions H^+ particulièrement sur les liaisons osidiques des chaines de xylane, principal constituant des hémicelluloses. Aussi, une augmentation de la surface spécifique a été observée en parallèle au phénomène de solubilisation des hémicelluloses, fonction également des conditions du prétraitement, rendant ainsi la structure lignocellulosique moins récalcitrante face à l'attaque des enzymes.

Les conditions opérées lors de l'hydrolyse enzymatique, menée sur des échantillons de chènevotte prétraitée en conditions acides, sont un rapport substrat/volume de 1%, un pH du milieu de 4,5 et une température de 50 °C. Les résultats ont été analysés en fonction du facteur de sévérité du prétraitement qui s'exprime par l'indice de sévérité combiné CS, mais aussi en fonction de la charge en catalyseur, de la surface spécifique et du taux de réduction en hémicelluloses, dans le cas des deux techniques d'imprégnation du catalyseur. Rappelons que l'indice CS permet à l'aide d'une relation mathématique, reliant la température au temps de traitement et au pH du substrat, d'évaluer l'intensité de chaque condition de prétraitement et de comparer les essais entre eux.

Le Tableau 16 résume les conditions étudiées lors du prétraitement thermomécanique en présence d'acide sulfurique, imprégné par la technique d'aspersion ou immersion du substrat pendant 10 et 30 min. Les concentrations massiques en acide sulfurique utilisées sont aussi exprimées en charge en H_2SO_4 (%), qui présente la masse de l'acide ajouté par rapport à 100 g de MS. Ce dernier paramètre permet d'informer de manière précise sur la quantité de catalyseur ajoutée, et facilite ainsi la comparaison entre les différents essais expérimentaux. Les valeurs de pH mentionnées correspondent aux valeurs obtenues sur le substrat prétraité avant hydrolyse enzymatique.

2.1.1 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique

Le principe de l'hydrolyse enzymatique (eq. conversion de la cellulose en glucose) repose sur l'action catalytique du cocktail enzymatique « cellulases » en contact avec le substrat lignocellulosique dans des conditions bien déterminées, notamment de température et de pH du milieu. Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'effet du prétraitement sur la cinétique de l'hydrolyse enzymatique par détermination de la vitesse initiale, ainsi pris en compte des paramètres intrinsèques du substrat prétraité notamment la surface spécifique afin d'évaluer son effet sur la vitesse initiale de la réaction enzymatique. L'étude que nous avons effectuée consiste à suivre la cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée par mesure

de la variation des concentrations en sucres libérés (produit) dans le milieu réactionnel au cours du temps. En fixant les concentrations initiales en substrat et en enzyme, nous avons procédé à des prélèvements du produit au cours de l'hydrolyse enzymatique pendant une période de 24h. Les sucres réducteurs ont été analysés par le protocole DNS. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 92.

Tableau 16: Conditions du prétraitement en conditions acides

Essai	IMP	Concentration H_2SO_4 (%)	Charge H_2SO_4 (%)	pH	CS
Natif	---	---	---	6,70±0,01	---
1	---	0	0,00	5,07±0,00	---
2	Aspersion	3	0,94	3,94±0,06	-0,6
3		5	1,57	3,36±0,04	0,1
4		7	2,20	3,63±0,39	0,3
5		10	3,15	2,64±0,10	0,8
6		15	4,72	2,31±0,01	1,1
7		20	6,29	2,24±0,02	1,2
8		25	7,86	2,15±0,07	1,4
9		30	9,44	2,03±0,11	1,6
10		40	12,58	1,53±0,04	2,0
11		50	15,73	1,34±0,01	2,2
12	Immersion (10min)	0,2	0,66	4,79±0,06	-1,5
13		0,4	1,49	4,47±0,02	-1,0
14		0,6	2,01	3,68±0,04	-0,4
15		0,8	3,08	3,01±0,01	0,5
16		1	3,93	2,14±0,01	1,0
17		2	6,66	2,13±0,01	1,2
18		3	11,78	1,61±0,02	1,2
19		5	18,10	1,61±0,01	1,4
20		7	25,97	1,55±0,01	1,5
21		10	34,46	1,51±0,01	1,5
22	Immersion (30min)	0,2	0,58	5,00±0,02	-1,6
23		0,4	1,30	4,38±0,02	-1,0
24		0,6	1,76	3,77±0,01	-0,3
25		0,8	2,60	3,04±0,01	0,3
26		1	3,99	1,89±0,01	1,1
27		2	6,68	2,13±0,03	1,1
28		3	9,93	1,71±0,01	1,3
29		5	19,42	1,53±0,01	1,4
30		7	21,87	1,46±0,01	1,5
31		10	40,02	1,36±0,01	1,9

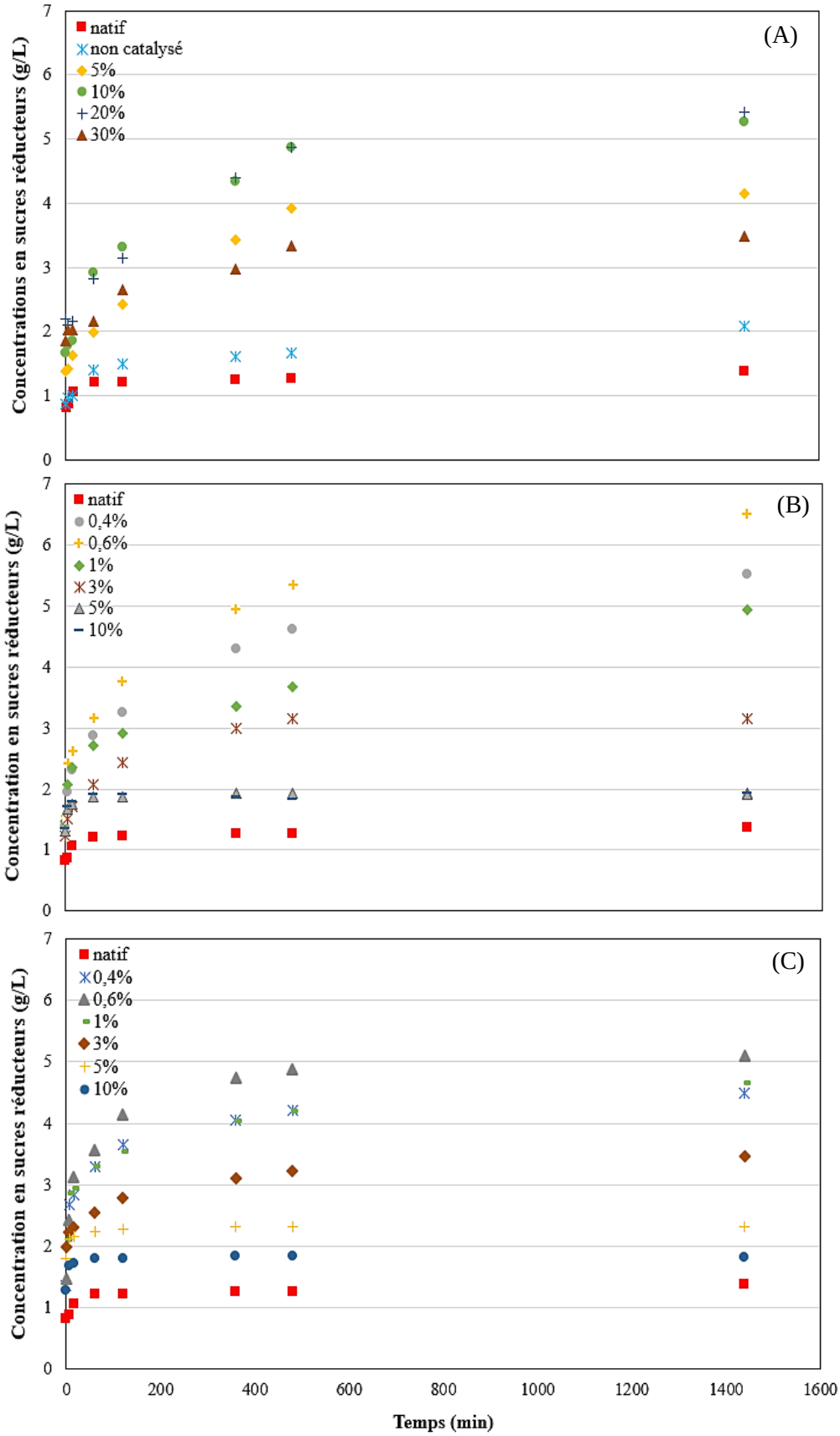


Figure 92 : Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en conditions acide. Imprégnation de H_2SO_4 par aspersion (A), immersion pendant 10 (B) et 30 min (C)

Nous remarquons que l'ensemble des substrats de chènevotte manifeste des comportements similaires vis-à-vis de la réaction enzymatique. La concentration en sucres réducteurs croit d'une manière quadratique avec le temps. En effet, dans la phase initiale de la cinétique d'hydrolyse, les molécules du substrat se lient aux enzymes, ainsi la concentration du complexe enzyme/substrat augmente. La vitesse d'hydrolyse atteint alors son maximum lorsque tous les sites actifs sont occupés. Par conséquent, la vitesse maximale de l'hydrolyse est équivalente à la vitesse initiale, qui correspond au niveau de l'évolution du produit, à une variation linéaire jusqu'à un temps d'hydrolyse d'environ 30 min. La vitesse initiale peut alors s'écrire sous la forme :

$$v_i = \frac{\Delta(concentration\ en\ sucres\ réduxteurs)}{\Delta t} \qquad \text{Eq. 37}$$

Lorsque la concentration du substrat diminue et celle du produit augmente, la vitesse d'hydrolyse diminue. Enfin, quand les concentrations en sucres ne changent plus, la vitesse s'annule et la phase d'équilibre est atteinte aux environs de 24h. Le Tableau 17 résume les résultats des concentrations en sucres obtenues en phase initiale de l'hydrolyse enzymatique. Les résultats des calculs de la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée par DIC en conditions acides montrent une évolution avec le traitement comparativement à celle de la chènevotte native. En effet, la chènevotte prétraitée à des concentrations de 10%, 0,6% et 0,6% en H_2SO_4, présente des vitesses d'hydrolyses supérieurs de 3, 3,7 et 5,5 fois celle du substrat natif, pour les techniques d'imprégnation de catalyseur par aspersion, immersion pendant 10 et 30 min, respectivement. Les résultats montrent que l'imprégnation du catalyseur dans le cas des deux techniques, combiné au traitement thermomécanique à 165 °C et pendant 30 min, améliore la réactivité de la chènevotte vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique. Des travaux de Pierre et al. (2011) ont aussi démontré que le prétraitement par DIC améliore la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé prétraitée à 165°C pendant 15 min. Ces résultats suggèrent que les modifications physicochimiques produites par le prétraitement thermomécanique dans ces conditions ont contribué à l'amélioration de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique.

De nombreux auteurs (Balat, 2011; Karimi and Taherzadeh, 2016; Sun et al., 2016) ont rapporté que la surface spécifique comme étant parmi les facteurs déterminants qui influencent la vitesse de l'hydrolyse enzymatique. En effet, l'accessibilité aux polymères cellulosiques représente une exigence principale assurant le contact direct entre les enzymes et la cellulose pendant l'étape d'hydrolyse. Dans le Tableau 17 sont présentées les valeurs de la surface spécifique de la chènevotte prétraitée avant d'être soumise à l'hydrolyse enzymatique. Les résultats montrent que la corrélation entre la vitesse initiale et la surface spécifique n'est pas assez claire. Notons que le maximum de vitesse initiale est atteint à 1,4 m^2/g au niveau de la surface spécifique quel que soit la technique d'imprégnation. Lorsque les concentrations en acide sulfurique sont augmentées davantage, la surface spécifique continue d'augmenter cependant la vitesse d'hydrolyse quant à elle diminue, la corrélation entre ces deux facteurs est alors n'est pas établie dans ces conditions. Il existe plusieurs facteurs responsables de la réaction enzymatique, parmi lesquelles on cite, l'activité des enzymes, les caractéristiques du substrat, notamment la taille des pores disponibles, l'indice de cristallinité de la cellulose, etc… Par conséquent, la surface

spécifique ne représente pas le seul facteur déterminant l'évolution de la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique.

Tableau 17 : Concentration en sucres libérés en phase initiale de l'hydrolyse enzymatique, vitesse initiale d'hydrolyse et surface spécifique des échantillons de chènevotte prétraitée en conditions acides

Essais	IMP	Concentration H_2SO_4 (%)	Concentration en sucres réducteurs [a] (g/L)				Vitesse initiale [b] (g/L/min)	Surface spécifique [c] (m^2/g)
			Temps (min)					
			0	5	15	30		
Natif	---	---	0,9±0,05	0,9	1,06	1,1	0,010	0,90±0,05
1	---	0	0,9±0,01	1,0	1,0	1,3	0,013	0,87±0,04
2	Aspersion	5	1,4±0,06	1,4	1,6	1,8	0,016	1,10±0,04
3		10	1,7±0,02	1,8	1,8	2,6	0,030	1,40±0,04
4		20	2,2±0,05	2,1	2,2	2,5	0,012	2,00±0,04
5		30	1,9±0,03	2,0	2,0	2,1	0,007	2,30±0,07
6	Immersion (10 min)	0,4	1,4±0,02	1,9	2,3	2,5	0,033	1,34±0,05
7		0,6	1,6±0,06	2,4	2,6	2,9	0,037	1,45±0,03
8		1	1,5±0,02	2,1	2,4	2,6	0,031	1,82±0,07
9		3	1,2±0,05	1,5	1,7	1,9	0,020	2,08±0,05
10		5	1,3±0,06	1,7	1,8	1,9	0,015	2,17±0,04
11		10	1,4±0,03	1,7	1,8	1,9	0,015	1,31±0,05
12	Immersion (30 min)	0,4	1,4±0,01	2,7	2,8	3,0	0,043	1,32±0,04
13		0,6	1,5±0,02	2,4	3,1	3,3	0,055	1,43±0,03
14		1	2,1±0,01	2,9	3,0	3,2	0,029	1,75±0,05
15		3	2,0±0,02	2,2	2,3	2,4	0,011	1,98±0,05
16		5	1,8±0,05	2,1	2,2	2,2	0,009	1,69±0,07
17		10	1,3±0,03	1,7	1,7	1,8	0,013	2,34±0,03

[a] Sucres réducteurs dosés par le protocole DNS. [b] Vitesse initiale calculée en utilisant l'équation 37. [c] Surface spécifique de la chènevotte prétraité en conditions acides analysée par la méthode BET

Notons que la présence de sucres observée dans le milieu réactionnel avant l'ajout des enzymes, correspondant aux concentrations initiales en sucres mesurées à t = 0 h, est associée au phénomène d'hydrolyse des hémicelluloses en milieu acide provoqué par le prétraitement. Aussi, les conditions du prétraitement ont influencé les concentrations en sucres réducteurs obtenus à l'équilibre de la réaction enzymatique (t = 24 h) (Figure 92). Ces résultats sont détaillés et analysés dans la section suivante.

2.1.2 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs

La présence de monosaccarides dans le substrat avant hydrolyse enzymatique est un indicateur direct de l'action du prétraitement en conditions acides sur la fraction hémicellulosique. Il s'agit de l'hydrolyse des chaines de xylane contenues dans les hémicelluloses et qui libèrent du

xylose, favorisant ainsi la saccharification enzymatique des polymères cellulosiques (Boakye-Boaten et al., 2016; Gaur et al., 2016; P. Kumar et al., 2009). Afin de montrer l'intensité des conditions de prétraitement sur ce phénomène, nous avons déterminé la concentration des sucres réducteurs à t = 0 h, notée R_1, traduisant la concentration produite en sucres suite au prétraitement. Aussi, la concentration des sucres dans l'hydrolysat, mesurée à 24 h après hydrolyse et notée R_2, a été utilisée pour l'analyse des paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique.

La Figure 93 montre les variations obtenues de R_1 et R_2 en fonction du critère de sévérité du prétraitement (CS), de la surface spécifique mesurée par BET et du taux de réduction en hémicelluloses, calculé par l'analyse de la composition chimique du substrat prétraité (chapitre 3, paragraphe 3.1.1). Nous avons analysé ces résultats en comparant l'effet des deux types d'imprégnation du catalyseur aspersion et immersion pendant 10 min. Etant donné que la tendance des résultats de l'hydrolyse enzymatique, correspondant au prétraitement par immersion pendant 30 min est très similaire à celle obtenue dans le cas de l'immersion pendant 10 min, nous avons fait le choix de ne pas les tracer afin d'éviter de surcharger le graphique.

Il apparait de l'observation du graphique, qu'il existe des liens de corrélations entre les concentrations en sucres réducteurs R_1 et R_2, et les facteurs étudiés. En effet, l'observation de la figure montre que la valeur de R_1 obtenue, dans le cas de l'imprégnation par aspersion d'une solution à 3% en H_2SO_4, correspondant à un facteur de sévérité CS = -0,6, est équivalente à celle de l'échantillon natif et non-catalysé (0% catalyseur) (Figure $93A_1$). Ce résultat démontre que ces conditions ne sont pas suffisantes pour provoquer la solubilisation des hémicelluloses. A cette concentration, l'action de l'acide n'est pas alors significative, ce qui nous amène à considérer que la chènevotte manifeste une certaine capacité de neutralisation de l'acide. R_1 varie ensuite positivement avec l'augmentation de CS ; elle atteint une valeur maximale de 1,68 g/L à un CS = 0,8, correspondant à une charge en acide sulfurique de 3,2%. Dans le cas de l'immersion, R_1 atteint une valeur maximale de 1,75 g/L à un CS = -0,4 correspondant à une charge en acide sulfurique de 2%. Dans ce dernier cas, la neutralisation de l'acide par la chènevotte, notamment quand l'acide est imprégné à des faibles concentrations, ne se manifeste pas, car ce pouvoir alcalin est probablement dissipé pendant l'opération d'immersion dans un volume important en solution acide. Par conséquent, la demande en acide pour maximiser la libération des sucres R_1 dans le cas de l'utilisation de l'aspersion est supérieur à celle de l'immersion, ce qui est traduit par des sévérités plus élevées dans le premier cas que dans le second. La production des sucres R_2 s'est clairement améliorée dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en condition acide comparativement à celle de la chènevotte native (0,51 g/L) et prétraité sans catalyseur (1,21 g/L). Nous constatons que R_2 croit avec le facteur CS jusqu'à atteindre des valeurs maximales de 5,5 g/L et 6,5 g/L à des valeurs de CS égales à 1,1 et -0,4 (Figure $93B_1$). Cette amélioration est due principalement à une accessibilité des enzymes aux polymère cellulosique plus favorable au niveau des échantillons prétraités. Les mêmes tendances de résultats sont obtenues après prétraitement de la paille de riz (Sharma et al., 2015), du bois de peuplier (Meng et al., 2015) et de la bagasse de canne à sucre (Chen et al., 2012) par acide sulfurique combiné à l'explosion à la vapeur.

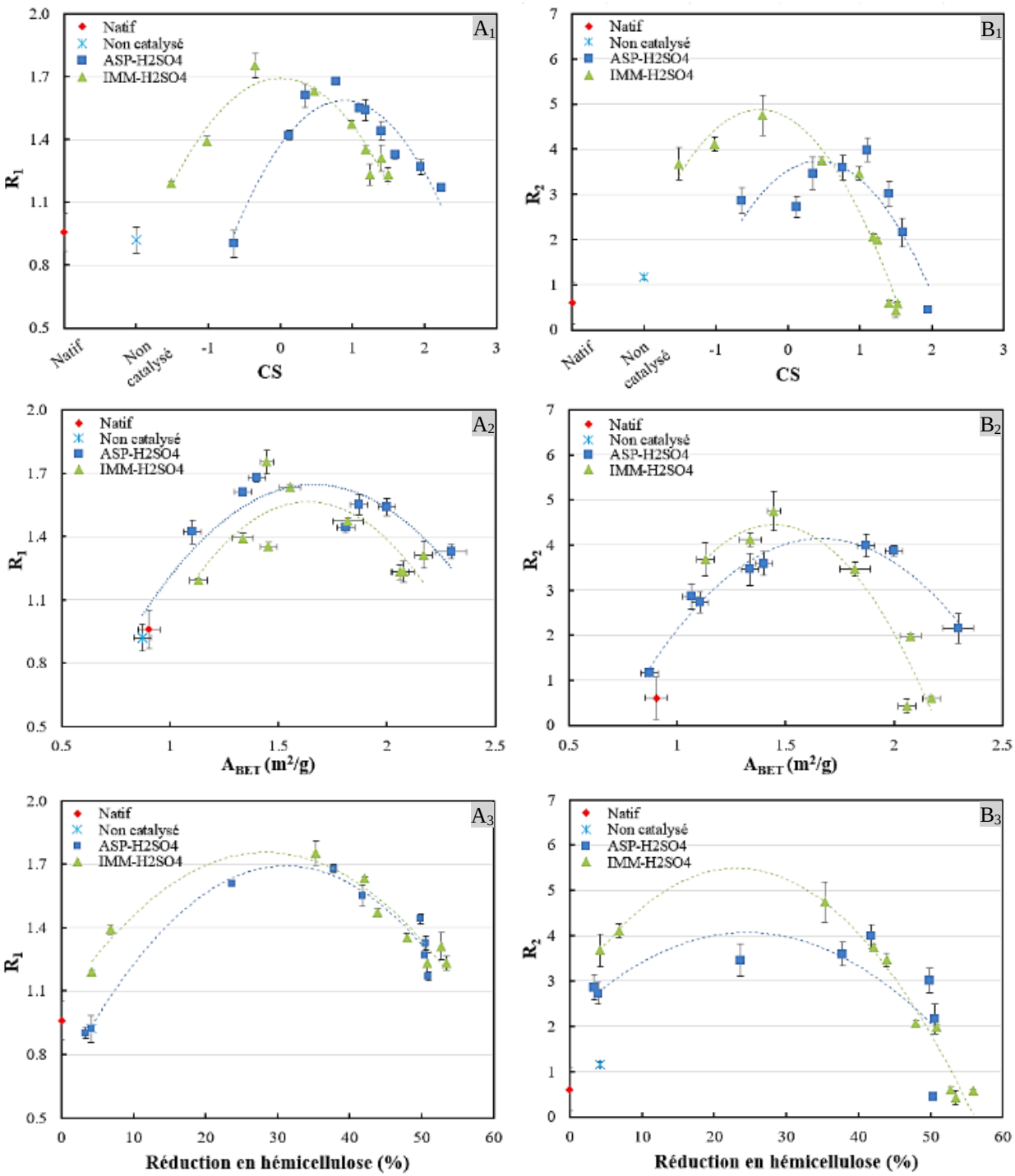


Figure 93: Variation de la concentration en sucres réducteurs déterminés à 0 h (R_1) et à 24 h (R_2) en fonction de CS (A_1 et B_1), A_{BET} (A_2 et B_2) et la réduction en hémicelluloses (A_3 et B_3), respectivement. Imprégnation du substrat avec de H_2SO_4 avant prétraitement par aspersion, et immersion pendant 10 min.

En revanche, R_1 et R_2 diminuent ensuite lorsque la sévérité du prétraitement augmente. Cette baisse traduit la présence d'un phénomène limitant l'hydrolyse enzymatique. En effet, le début de la chute drastique des valeurs de R_1 et R_2 correspond à des substrats de chènevotte qui manifestent un faible niveau de pH, mesuré avant hydrolyse enzymatique, compris entre 2,2 et 2,9 dans le cas des deux techniques aspersion et immersion, respectivement (Tableau 16). Il

semble alors que, parmi les raisons du déclin des valeurs de R_1 et R_2, ces basses valeurs en pH ont tendance à réduire l'activité des enzymes cellulases au sein du substrat, cette activité étant optimale dans une fourchette de pH définit entre 4 et 5. De plus, le prétraitement à des hautes concentrations en acide provoque des réactions de transformation de la lignine qui pourra migrer à la surface de la paroi cellulaire sous forme de gouttelettes susceptibles de provoquer une adsorption des enzymes non productive (Selig et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Sharma et al. (2015) qui ont montré la corrélation entre le critère de sévérité et la digestibilité enzymatique de la paille de riz prétraitée par explosion à la vapeur en présence d'acide. Ces travaux ont associé la diminution des concentrations en sucres réducteurs libérés, après prétraitement à 0,5% en acide sulfurique, à l'inhibition des enzymes par les composés de dégradation des sucres, présents à une concentration de 0,9 g/L dans le milieu réactionnel de l'hydrolyse enzymatique. Fan et al. (2014a) ont aussi reporté le déclin de la conversion cellulosique après hydrolyse enzymatique des rafles de maïs prétraité après imprégnation à l'acide sulfurique à partir d'une concentration de 1%. Ces travaux ont reporté l'augmentation de la dégradation des sucres pendant le prétraitement à des niveaux élevés en acide. Par conséquent, il parait que l'ajout d'une étape de lavage ou l'élimination des composés de dégradation des sucres après le prétraitement, pourraient être essentielle pour la neutralisation du substrat prétraité et la prévention d'une baisse de rendement de conversion de la biomasse prétraitée à des sévérité élevées (Merino and Cherry, 2007).

La corrélation entre R_1 et la surface spécifique (A_{BET}) et le taux de réduction en hémicelluloses est clairement établie. Nous constatons que la solubilisation des hémicelluloses au cours du prétraitement acide conduit à la libération des sucres R_1, et en même temps à la réduction de la fraction en hémicelluloses et ainsi l'augmentation de la surface spécifique de la chènevotte prétraitée (Figure 93 A_2, A_3). L'observation des Figure 93, B_2, B_3 montre que R_2 atteint un maximum à des niveaux de surfaces spécifiques égale à 1,45 m^2/g et 1,87 m^2/g et des taux de réduction en hémicelluloses de 41,5% et 38,4%, pour les techniques aspersion et immersion, respectivement. Jusqu'à ces niveaux de sévérité du prétraitement, la concentration en sucres est corrélée positivement avec la surface spécifique du substrat et le taux de réduction en hémicelluloses pour les deux techniques d'imprégnation du catalyseur. Chen et al., (2011) ont aussi reporté la maximisation de la conversion cellulosique suite à l'augmentation de la surface spécifique et l'élimination de la fraction des hémicelluloses après application du prétraitement à l'explosion à la vapeur combiné à l'acide sulfurique. Néanmoins, une augmentation davantage de la surface spécifique ou du taux de réduction en hémicelluloses au-delà de ces niveaux est révélée sans effet positif sur la libération des sucres. Nous pouvons en déduire que dans ces conditions, vu que de fortes sévérités sont appliquées, l'accessibilité des enzymes ainsi que leur activité sont affectées malgré des surfaces disponibles.

2.1.3 Distribution des sucres monomères et composés inhibiteurs dans l'hydrolysat

L'hydrolysat obtenu après que l'équilibre de la réaction d'hydrolyse enzymatique soit atteint a été récupéré et analysé par chromatographie en phase liquide (HPLC). Nous avons analysé dans un premier temps les sucres sous leur forme monomère, notamment glucose, xylose et cellobiose. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la présence des composés de

dégradation des sucres par analyse des composés furfural et hydroxy-méthyl-furfural (HMF), principaux inhibiteurs de l'étape de la fermentation.

- Les sucres monomères

La Figure 94 présente les résultats des concentrations en glucose, xylose et cellobiose obtenus en fonction de la charge en H_2SO_4 (g/100 g MS), dans le cas de l'imprégnation du catalyseur par aspersion (Figure 94A) et par immersion (Figure 94B).

Dans le cas de l'imprégnation de l'acide par la technique d'aspersion, dans un premier temps, nous remarquons que l'imprégnation à des charges en acide sulfurique jusqu'à atteindre une valeur de 1,57% engendre une libération en glucose et xylose quasi-équivalente à celle produite par l'échantillon traité sans catalyseur. En revanche, ces concentrations restent tout de même supérieures à celle obtenue par hydrolyse enzymatique de la chènevotte native. Cette différence entre le natif et l'échantillon sans catalyseur traduit alors l'effet unique du prétraitement thermomécanique, sur la libération du glucose. Dans le cas de l'immersion, nous remarquons que l'application d'une charge plus faible de l'ordre de 0,66% en H_2SO_4 a influencé significativement la production du xylose et du glucose par rapport à la chènevotte native et celle traitée sans catalyseur.

En effet, la teneur en matière minérale à caractère alcalin semble avoir un effet sur la modification de la concentration en acide imprégné dans la biomasse (Chen et al., 2012). La teneur de la matière minérale contenue dans la chènevotte étant de 4,7%, lorsque les quantités d'acide sont imprégnées à des petits volumes, en l'occurrence en utilisant la technique d'aspersion, une partie de l'acide se trouve alors neutralisée ce qui empêche les réactions de catalyse des liaisons osidiques à hautes températures pendant le prétraitement. On pourra alors estimer, selon ce que nous avons constaté, que la chènevotte a une capacité de neutralisation d'environ de 1,57 g H_2SO_4/100 g MS. Les travaux de Ballesteros et al. (2007) ont estimé la capacité de neutralisation du cardon à environ 3,6 g H_2SO_4/100 g MS, compte tenu de sa teneur en matière minérale de 6,6%. Les travaux de Chen et al., (2012) ont aussi montré que la teneur en matières minérales (Ca, K, Mg, P) de la biomasse lignocellulosique lui procure une capacité de neutralisation qui peut consommer de manière significative des quantités d'acide. Cet acide consommé devrait être utilisé pour la dépolymérisation de la biomasse. Par ailleurs, il a été démontré que la consommation d'acide résultant de la neutralisation des cendres augmente lorsque le chargement en biomasse solide augmente aussi pendant le prétraitement. Ce qui est dû au fait que la demande de l'acide par les cendres est positivement corrélée avec la quantité en biomasse (Chen et al., 2012). On en déduit alors que la charge en acide par unité de biomasse sèche influence d'une manière directe la digestibilité du substrat prétraité.

Les concentrations maximales en glucose et xylose libérés par la chènevotte prétraitée ont atteint, respectivement, des valeurs de 5,9 g/L et 1 g/L à une charge en H_2SO_4 de 4,72% imprégnée par aspersion, et 6,36 g/L et 2,1% à une charge en H_2SO_4 de 2% imprégnée par immersion, comparativement à des concentrations de 2,25 g/L et 0,01 g/L libérés par l'échantillon natif (Figure 94A, Figure 94B). Ces résultats suggèrent que le prétraitement thermomécanique dans ces conditions, engendre la solubilisation des hémicelluloses favorisant ainsi la récupération des sucres xylose, dans le même temps il améliore significativement l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique par intensification de la libération du glucose par rapport au substrat natif.

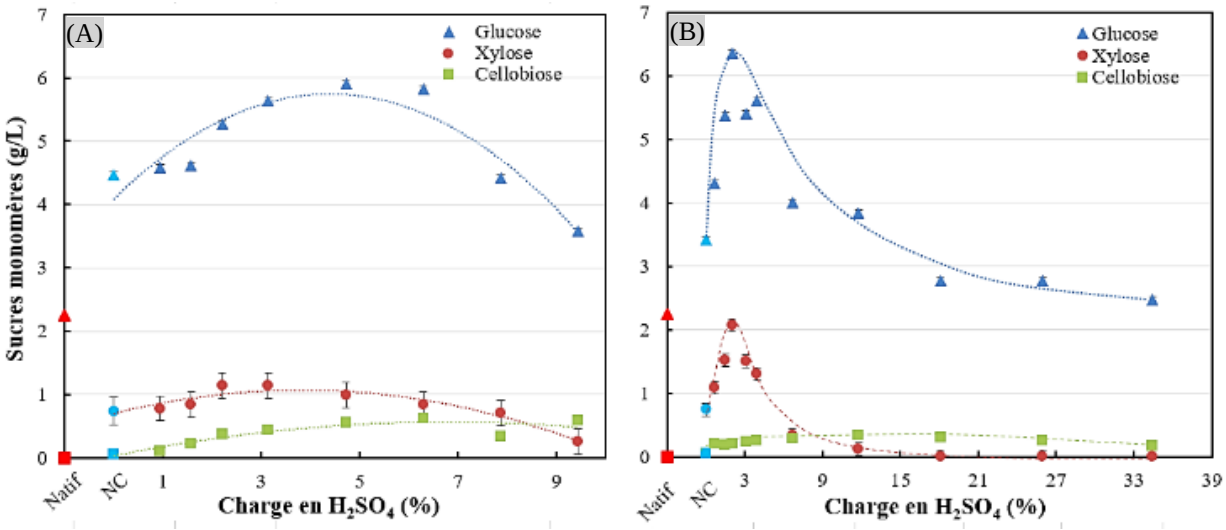


Figure 94 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de la chènevotte prétraitée en conditions acides, après imprégnation par aspersion (A) et immersion (B)

Une diminution des concentrations en glucose et xylose est observée à des charges plus élevées en H_2SO_4 pour les deux techniques d'imprégnation. Cette diminution est d'une part probablement due aux réactions de dégradation des sucres ayant lieu au cours du prétraitement et engendrant une perte en sucre et d'autre part liée à une inhibition de l'hydrolyse enzymatique. En effet, la diminution de la libération du glucose est mise en évidence en parallèle à l'augmentation de la concentration de la cellobiose dans l'hydrolysat. Etant donné que l'hydrolyse des cellobioses est assurée par l'activité des enzymes β-glucosidase, sa présence révèle alors le fait que l'inhibition des enzymes β-glucosidase a eu lieu. En général, les raisons de l'inhibition des enzymes sont la température ou le pH. Vu que la température opérée est fixe pour tous les essais, le pH reste alors la cause la plus probable. Il est important de noter que les substrats correspondant à la région où la concentration en glucose diminue présentent des valeurs de pH bien inférieures à la marge de pH optimale des enzymes.

Les résultats de l'étude de Chen et al. (2011) après prétraitement de la paille de riz par explosion à la vapeur combinée à une imprégnation d'acide sulfurique présentent aussi une amélioration de la libération des sucres monomères après application d'acide jusqu'à une concentration de 8%. Quand la concentration d'acide augmente au-delà de cette valeur, une diminution significative des quantités de glucose a été observée, accompagnée par une augmentation des concentrations en cellobiose dans l'hydrolysat. Ces travaux suggèrent que l'application des

concentrations élevées en acide sulfurique conduit à un substrat à caractère hydrophobe, augmentant les phénomènes d'adsorption non productive des enzymes au substrat, notamment par l'intermédiaire des gouttelettes de « pseudo-lignine » qui migrent vers la paroi cellulaire suite au prétraitement à haute concentration en acide, et inhibant dans le même temps l'activité des enzymes β-glucosidase.

- Les composés inhibiteurs

Pendant le prétraitement en conditions acides, la dégradation des sucres pentoses et hexoses peut avoir lieu conduisant à la formation des composés de types furanes, à savoir le furfural et le HMF. Ces composés peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance microbienne pendant la fermentation des sucres réduisant ainsi le rendement et la productivité en éthanol (Karimi et al., 2014). Par conséquent, l'analyse de ces composés est primordiale afin de mettre en évidence l'effet des conditions opératoires sur cette formation lors du procédé de prétraitement appliqué dans notre étude.

La Figure 95 montre l'évolution de la production des composés de dégradation des sucres en fonction de la charge d'acide sulfurique imprégnée par aspersion (Figure 95A) ou immersion (Figure 95B) dans la chènevotte. La première observation qui en découle est que les concentrations en furfural et HMF libérées après prétraitement de la chènevotte sans imprégnation d'acide sont négligeables. Ce qui indique que le prétraitement thermomécanique seul à 165 °C pendant 30 min ne favorise pas les réactions de déshydratation des sucres qui entrainent la production les composés inhibiteurs. Nous remarquons ensuite que la formation de ces composés augmente avec la charge en acide sulfurique pour les deux techniques d'imprégnation. Compte tenu des résultats de l'analyse des concentrations en sucres monomères précédemment présentés, le déclin de la libération des sucres monomères constaté lors de l'application des charges en acide sulfurique au-delà des valeurs de 4,7 et 2% pour les techniques aspersion et immersion, respectivement, correspond à une augmentation au niveau de la formation des composés inhibiteurs, comme illustrée dans la Figure 95. Les concentrations maximales sont atteintes à des charges en acide sulfurique de 6,26% et 6,66%, pour les techniques d'aspersion et d'immersion, respectivement. Au-delà de ces valeurs, une diminution des concentrations a eu lieu. La raison de cette diminution est probablement la dégradation du furfural et du HMF à très forte concentration en acide sulfurique appliquée, qui mène généralement à la production de l'acide formique et l'acide levulinique, respectivement.

Les concentrations en furfural et HMF correspondantes aux pics de libération de glucose et xylose sont respectivement de 1,9 et 42 mg/L dans le cas de l'aspersion et de 1,6 et 27 mg/L dans le cas de l'immersion. Nous constatons que la faible charge en acide utilisée dans le cas de l'immersion permet la réduction de la formation des composés inhibiteurs. Soulignons cependant, que ces concentrations restent assez faibles comparées à ceux rapportées par des travaux sur les prétraitements combinant l'imprégnation de l'acide sulfurique et l'explosion à la vapeur à une température de 200 °C (Fan et al., 2014b; Sharma et al., 2015). L'utilisation de températures élevées portant le prétraitement à de forte sévérités, contrairement aux conditions

prévalant lors de notre traitement, température de 165 °C, contribuent à limiter la formation des composés inhibiteurs à la fermentation.

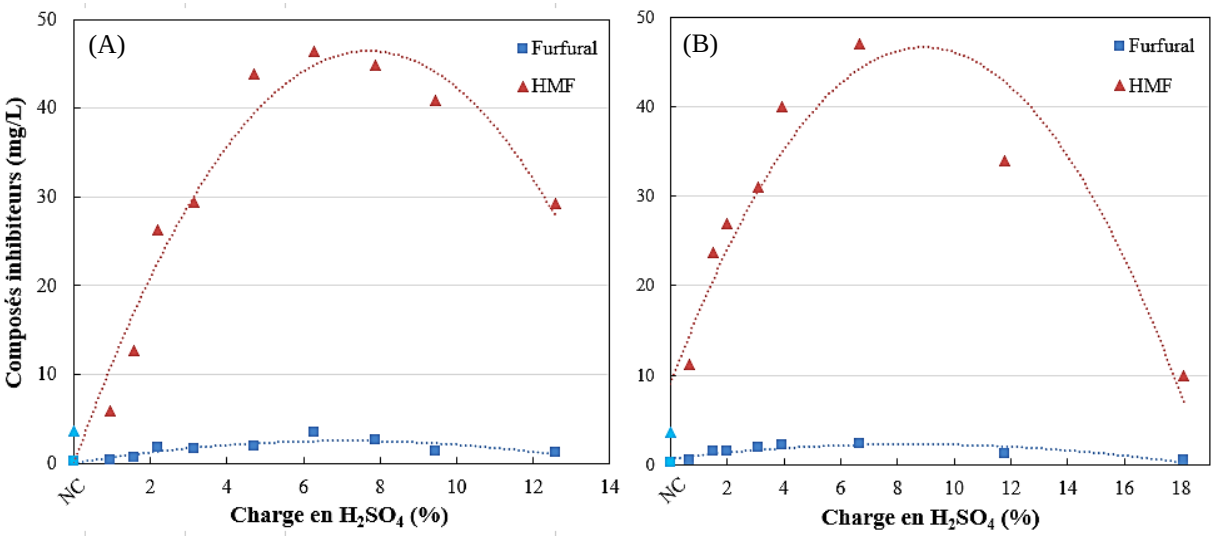


Figure 95 : Concentrations en composés inhibiteurs de la fermentation. (A) et (B): imprégnation de l'acide par aspersion et immersion (10min), respectivement

2.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines

Par rapport au prétraitement acide, le prétraitement alcalin est couramment utilisé pour sa capacité à éliminer principalement la lignine. En principe, l'agent alcalin a pour action majeure la rupture des liaisons de type éther et ester reliant la lignine aux polysaccharides mais aussi des liaisons éthers prépondérantes au sein du polymères de lignine (Xu et al., 2016). Ce procédé engendre plusieurs modifications dans la biomasse bénéfiques à l'hydrolyse enzymatique tout en évitant de générer des composés de dégradation de sucres (Sindhu et al., 2014a).

Avant le traitement thermomécanique, l'hydroxyde de sodium a été imprégné dans la chènevotte à différentes concentrations en procédant par aspersion ou immersion. Ensuite, le traitement thermomécanique a été appliqué dans les même conditions pour l'ensemble des échantillons, à savoir une température de 165 °C et un temps de traitement de 30 min. Nous avons montré dans le précédant chapitre l'effet du prétraitement thermomécanique combiné à NaOH sur la modification structurale et chimique de la chènevotte. L'effet de la concentration en soude sur les modifications physicochimiques a été analysé tout en comparant l'effet des deux techniques d'imprégnation. Les principales modifications observées étaient la réduction de la teneur en lignine, la dépolymérisation des hémicelluloses et la diminution de la cristallinité de la cellulose en se référant aux données de la chènevotte à l'état native. L'étude de l'effet des conditions opératoires ainsi que les modifications induites sur la vitesse initiale d'hydrolyse et la libération des sucres réducteurs sera présenté dans ce qui suit. L'hydrolyse enzymatique a été menée dans les même conditions que celles opérées dans le cas de l'étude du prétraitement en conditions acides. Le Tableau 18 résume les conditions du prétraitement, notamment les concentrations en NaOH exprimées en % massique, la charge en NaOH, calculée en g NaOH/100 g MS et les valeurs du pH du substrat mesurées après prétraitement.

Tableau 18 : Conditions du prétraitement en conditions alcalines de la chènevotte

Essai	IMP	NaOH (%)	Charge en NaOH (%)	pH
Natif	---	---	---	6,7±0,01
1	---	0	0,00	5,1±0,00
2	Aspersion	3	0,94	6,3±0,01
3		5	1,57	6,4±0,01
4		7	2,20	6,4±0,01
5		10	3,15	6,6±0,01
6		15	4,72	7,1±0,01
7		20	6,29	7,1±0,01
8		25	7,86	7,2±0,01
9		30	9,44	7,3±0,01
10		40	12,58	7,4±0,02
11		50	15,73	7,5±0,01
12	Immersion (10min)	0,2	0,8	6,1±0,03
13		0,4	1,5	6,3±0,05
14		0,6	2,3	6,8±0,03
15		0,8	3,1	7,5±0,01
16		1	4,1	8,1±0,01
17		2	7,4	9,4±0,02
18		3	11,8	10,2±0,01
19		5	20,2	10,3±0,01
20		7	26,2	10,4±0,01
21		10	34,1	11,3±0,00
22	Immersion (30min)	0,2	0,7	6,1±0,06
23		0,4	1,5	6,8±0,02
24		0,6	2,3	7,2±0,01
25		0,8	2,7	8,4±0,01
26		1	3,8	8,4±0,01
27		2	6,9	10,4±0,03
28		3	10,2	10,4±0,01
29		5	17,1	10,5±0,01
30		7	23,9	11,1±0,04
		10	27,1	11,4±0,00

2.2.1 Cinétique de l'hydrolyse enzymatique

Les résultats de suivi de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique sont présentés en termes de concentration en sucres réducteurs libérés, et illustrés dans la Figure 96. L'allure de la croissance de la libération des sucres au cours de l'hydrolyse enzymatique suit une évolution similaire à celle observée lors de l'hydrolyse de la chènevotte prétraitée en conditions acides.

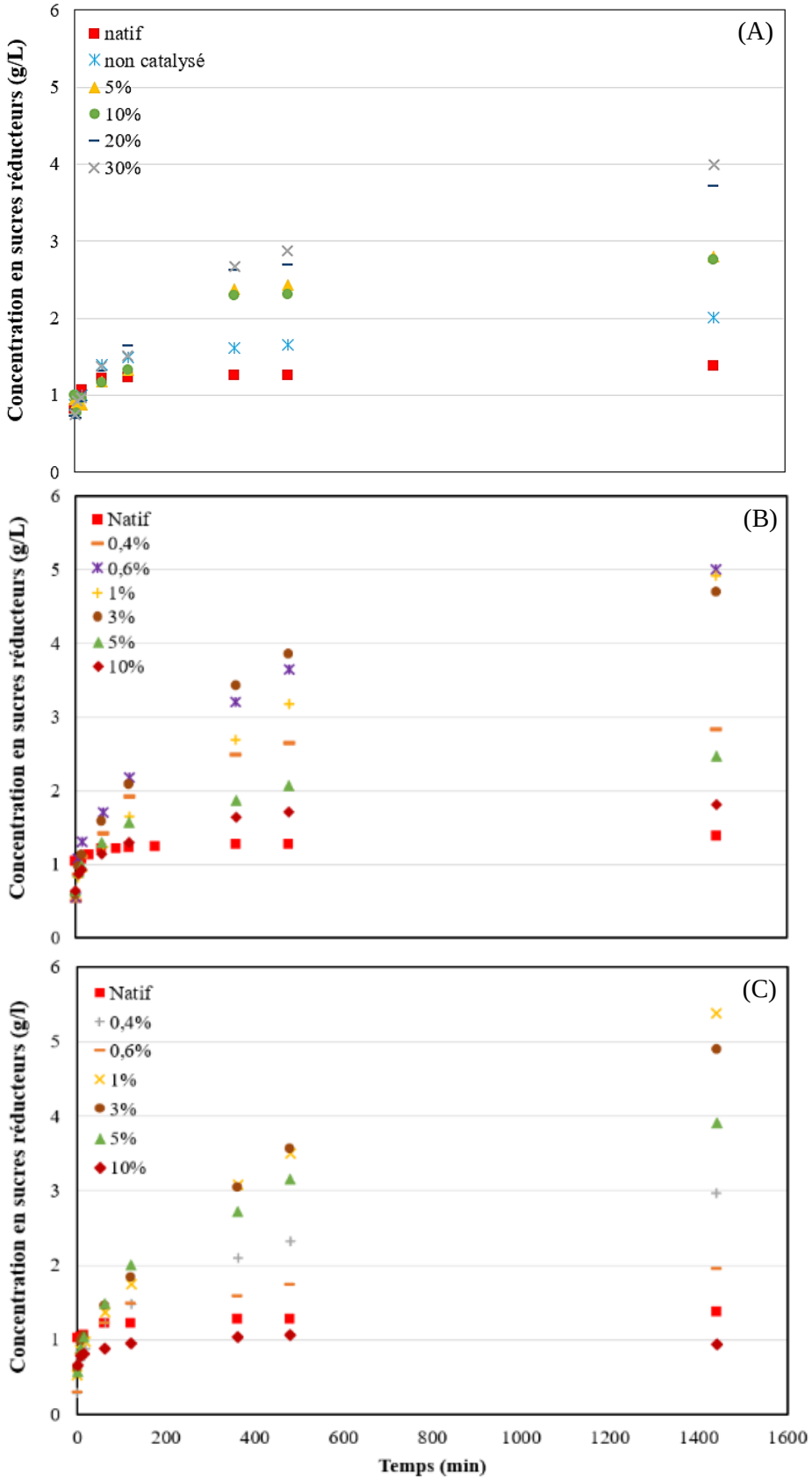


Figure 96 : Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines. Imprégnation de NaOH par aspersion (A), immersion pendant 10 (B) et 30 min (C)

La cinétique d'hydrolyse enzymatique se déroule alors de la même manière comme déjà expliqué dans le paragraphe 2.1.1. Dans le Tableau 19 sont résumé les résultats des concentrations en sucres réducteurs obtenues pour quatre temps dans la phase initiale de la cinétique d'hydrolyse, la vitesse initiale et la surface spécifique de la chènevotte prétraitée. L'observation des résultats de la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique montrent que, lorsque les concentrations en hydroxyde de sodium augmente, la vitesse initiale de la cinétique n'évolue pas significativement dans le cas de l'imprégnation par aspersion. En revanche, dans le cas de l'immersion (10 et 30 min), l'augmentation de la vitesse initiale avec la concentration en NaOH est significative, d'environ 50%, suivie d'une diminution pour les deux concentrations plus élevées (5 et 10%).

Afin de mieux analyser les tendances de ces résultats, nous nous sommes rapportés à un autre facteur, qui est la charge en NaOH. Ce dernier varie de 0,9 à 15,7% dans le cas de l'aspersion et de 0,7 à 34% dans le cas de l'immersion (10 et 30 min). L'intervalle de variation de ce facteur est considéré large dans le cas de l'immersion où des chargements relativement importants en NaOH sont engagés. La comparaison des essais 3, 7 et 13, dont les niveaux de chargement en NaOH sont très proches, permet d'observer que l'effet de l'imprégnation sur la vitesse initiale dépend de la technique utilisée.

Nous pouvons en déduire que lorsque l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium s'effectue en présence de quantités suffisantes en eau, cas de l'immersion, l'effet sur la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique est positif, à des faibles concentrations. Il convient de préciser que le prétraitement à l'hydroxyde de sodium est généralement utilisé soit à faible concentration et haute température ou bien à haute concentration et faible température (Mirahmadi et al., 2010; Noori and Karimi, 2016). En immersion, des concentrations au-delà de 4% sont considérées élevées (Xu et al., 2016). Par conséquent, il parait que la diminution de la vitesse initiale quand les concentrations en NaOH dépassent 3%, est associée à l'utilisation de forts chargements en NaOH combiné à la température de 165 °C qui reste relativement au prétraitement alcalin élevée.

Le pH du substrat pourrait être aussi parmi les facteurs influençant la cinétique de l'hydrolyse enzymatique. Nous remarquons que la diminution de la vitesse initiale dans le cas de l'immersion a eu lieu au niveau des substrats manifestant des valeurs de pH assez basiques, correspondant à des concentrations en NaOH au-delà de 3%. Des conditions de pH optimales dont la fourchette est définie entre 4 et 5 favorisent l'affinité du substrat aux enzymes ainsi permettent la maximisation de la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique.

Le lien entre les résultats du calcul de la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique et ceux de l'analyse de la surface spécifique de la chènevotte prétraitée en conditions basiques a été étudié. Nous remarquons que la vitesse initiale varie légèrement avec la surface spécifique à des faibles concentrations en NaOH, particulièrement au niveau d'une concentration de 0,4% en immersion (10 et 30 min), où la vitesse initiale a doublé en parallèle à une légère augmentation

de la surface spécifique, comparée à celle de l'échantillon natif. Zhu et al., (2005) ont constaté l'amélioration de la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique de la paille de riz après application du prétraitement à 1% en NaOH combiné au chauffage par microondes, en considérant l'effet de l'élimination des fractions des hémicelluloses et la lignine suite au prétraitement sur l'accessibilité des enzymes lors de l'hydrolyse enzymatique.

Tableau 19 : Concentration des sucres libérés en phase initiale de l'hydrolyse enzymatique, vitesse initiale et surface spécifique des échantillons de chènevotte prétraitée en conditions alcalines

Essais	IMP	Concentration NaOH (%)	Concentration en sucres réducteurs[(a)] (g/L)				Vitesse initiale[(b)] (g/L/min)	Surface spécifique[(c)] (m^2/g)
			Temps (min)					
			0	5	15	30		
Natif	---	---	0,9±0,05	0,9	1,06	1,1	0,010	0,90±0,05
1	---	0	0,9±0,01	1,0	1,0	1,3	0,013	0,87±0,04
2	**Aspersion**	5	0,9±0,00	0,9	0,9	1,0	0,006	0,92±0,04
3		10	1,0±0,03	0,8	1,0	1,2	0,008	0,85±0,04
4		20	0,7±0,01	0,7	0,9	1,0	0,009	0,81±0,04
5		30	0,7±0,02	0,9	1,0	1,0	0,007	0,70±0,04
6	**Immersion (10 min)**	0,4	0,5±0,02	0,9	1,1	1,3	0,023	1,06±0,05
7		0,6	0,5±0,06	1,1	1,3	1,4	0,025	0,70±0,03
8		1	0,6±0,02	0,8	0,9	1,1	0,019	0,80±0,07
9		3	0,6±0,05	1,0	1,1	1,3	0,020	0,97±0,05
10		5	0,6±0,06	0,9	1,0	1,1	0,012	0,90±0,03
11		10	0,7±0,03	0,7	0,8	0,8	0,005	0,32±0,05
12	**Immersion (30 min)**	0,4	0,3±0,01	0,7	0,9	1,1	0,023	1,08±0,04
13		0,6	0,3±0,02	0,8	1,0	1,2	0,027	0,78±0,03
14		1	0,5±0,01	0,9	1,0	1,1	0,021	0,71±0,05
15		3	0,6±0,02	1,0	1,1	1,3	0,019	0,87±0,05
16		5	0,6±0,05	0,9	1,0	1,2	0,015	0,78±0,07
17		10	0,7±0,03	0,8	0,8	0,9	0,005	0,30±0,03

[a] Sucres réducteurs dosés par le protocole DNS. [b] Vitesse initiale calculée en utilisant l'équation 37. [c] Surface spécifique (BET) de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines

En revanche, hormis les basses concentrations dans le cas de l'immersion, dans ces conditions de prétraitement et dans le cas des deux techniques d'imprégnation réalisées, la modification des deux paramètres suit une régression en se référant aux valeurs obtenues dans le cas de la chènevotte à l'état natif. Ces résultats suggèrent alors de possible condensation du substrat suite au prétraitement alcalin, entrainant une réduction de la surface disponible et n'ayant pas d'effet bénéfique pour la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique. Le phénomène de condensation de la lignine à haute concentration en hydroxyde de sodium augmentant son poids moléculaire

et diminuant ainsi sa solubilité, pourra être considéré comme facteur représentant une barrière pour l'accessibilité enzymatique (Karimi et al., 2014; Xu et al., 2016).

2.2.2 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs

Les sucres réducteurs présents dans l'hydrolysat ont été déterminés à t = 0h et t = 24h d'hydrolyse enzymatique, nous avons accordé les symboles R_1 et R_2, respectivement pour les deux concentrations obtenues. Ces deux concentrations ont été étudiées en vue de mettre en évidence leur évolution en fonction des paramètres de prétraitement. La Figure 97 montre la variation de R_1 et R_2 en fonction de la charge en NaOH et le taux de réduction en lignine. Ces représentations sont étudiées dans le cas des deux techniques d'imprégnation de l'hydroxyde de sodium.

R_1 est un indicateur de l'hydrolyse des hémicelluloses au cours du prétraitement. En effet, en traitement alcalin à haute température (120-130 °C), les chaines de xylane subissent des réactions de dépolymérisations diminuant considérablement leur degré de polymérisation (Xu et al., 2016). Par conséquent, les monomères mais aussi les oligomères de xylose résultent de ces réactions. La Figure 97A_1 montre l'évolution des concentrations R_1 en fonction de la charge en NaOH (%). Les résultats montrent, par rapport à l'échantillon natif, une très légère variation de R_1 quel que soit la technique d'imprégnation du NaOH. En effet, l'action majeur de l'agent chimique alcalin pendant le prétraitement est d'intervenir sur la rupture des liaisons esters associant les hémicelluloses et la lignine selon les réactions de solvatation et saponification, mais aussi la dégradation de la lignine par rupture de la liaison éther prédominante dans ce polymère (Xu et al., 2016). Ce type de prétraitement a aussi comme action l'élimination des groupements acétyles au sein des hémicelluloses (Sindhu et al., 2014b). Compte tenu des résultats de l'analyse de la composition chimique de la chènevotte prétraitée en conditions basique présenté dans le chapitre précédent, la fraction des hémicelluloses a été réduite de 17,7 à environ 11% à des niveaux de charges élevés en NaOH, pour les deux types d'imprégnation. Nous pouvons en déduire alors que, la solubilisation des hémicelluloses pendant le prétraitement conduit a priori à la formation de sucres sous formes d'oligomères, cette forme de sucres n'est pas prise en compte dans les analyses de la concentration R_1 par le protocole DNS. De ce point de vue, la solubilisation des hémicelluloses en sucres monomères dans ce type de prétraitement parait moins importante que celle obtenue dans le cas du prétraitement acide.

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs R_2 est illustrée dans la Figure 97B_1 en fonction de la charge en NaOH (%). Nous observons que, par rapport à la chènevotte à l'état natif, la libération des sucres réducteurs est améliorée à des faibles charges en NaOH dans le cas de l'immersion, tandis que dans le cas de l'aspersion des charges plus élevées en NaOH sont nécessaires pour augmenter la libération des sucres. R_2 atteint des valeurs maximales de 3,2 g/L et 4,45 g/L à des charges en NaOH de 7,86 et 3% pour les techniques aspersion et immersion, respectivement. Lai et Idris (2016) ont montré des tendances similaires à nos observations, après application du prétraitement du bois du palmier à huile à l'aide de l'explosion à la vapeur combiné à l'immersion du substrat par l'hydroxyde de sodium. Les

résultats de ces travaux suggèrent que la combinaison d'une concentration en NaOH à 2,5M (10%) à une température de traitement de 121 °C pendant 15 min permet la production de sucres à des concentrations plus élevées que celle obtenue pour le substrat natif après 72h d'hydrolyse enzymatique. Cette amélioration a été attribuée à la perturbation de la structure lignocellulosique suite au prétraitement dans ces conditions.

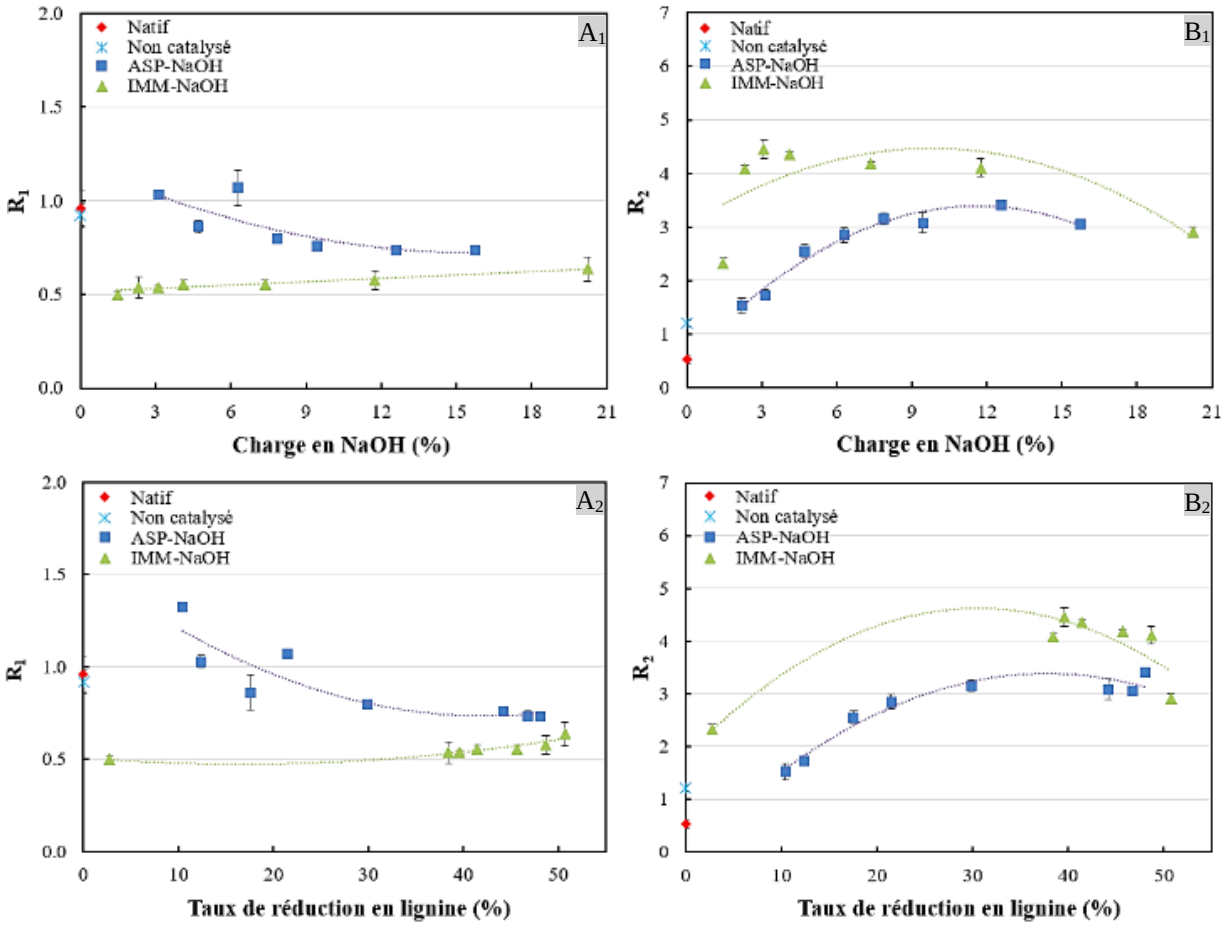


Figure 97 : Variation de la concentration en sucres réducteurs déterminés à 0 h (R_1) et à 24 h (R_2) en fonction de la charge en NaOH (A_1, B_1) et du taux de réduction en lignine (A_2, B_2), respectivement. Imprégnation du substrat avec NaOH par aspersion et immersion pendant 10 min.

De même pour l'évolution des sucres R_1 et R_2 en fonction du taux de réduction de la lignine (Figures 97 A_1, A_2), nous constatons que la corrélation entre la libération des sucres R_1 et la réduction en lignine n'est pas établie. Par conséquent, l'hydrolyse de la lignine pendant le prétraitement basique n'affecte pas considérablement les polymères des hémicelluloses. D'autre part, les niveaux maximaux atteints en R_2 correspondant à des taux de réduction en lignine de 30% et 39,6% pour les techniques aspersion et immersion, respectivement (Figure 97 B_1, B_2). L'élimination de la lignine mais aussi la préservation de la fraction cellulosique contribue à une production élevée en glucose, en améliorant l'accessibilité enzymatique et le taux de réaction d'hydrolyse. Nous pouvons en déduire que l'élimination de la lignine de la chènevotte pendant le prétraitement alcalin est avérée avantageuse dans l'amélioration de

l'hydrolyse enzymatique, traduisant ainsi l'effet bénéfique du prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium étudié dans notre travail.

La comparaison entre les deux techniques d'imprégnation montre que les faibles charges en NaOH à haute humidification, cas de l'immersion, favorisent la conversion cellulosique comparativement à des charges élevées à basse humidification. Lorsque les charges en NaOH augmentent davantage, une diminution de la conversion cellulosique est observée pour les deux techniques d'imprégnation. Cette baisse de la saccharification enzymatique pourrait être associée aux mêmes raisons que celles données par rapport à la baisse de la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique ; notamment des charges en NaOH qui sont considérées élevées en tenant compte du niveau de la température utilisé dans un traitement thermomécanique en conditions alcalines, ainsi que des valeurs de pH du substrat assez élevées par rapport à l'intervalle du pH optimal de l'activité des enzymes.

2.2.3 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat

L'hydrolysat obtenu après hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines a été analysé par HPLC, pour la détermination des concentrations en sucres présents sous forme monomère ; le glucose, produit majoritairement de l'hydrolyse enzymatique et le xylose produit du prétraitement. La molécule de cellobiose n'a pas été détectée dans les hydrolysats de chènevotte prétraitée en conditions alcalines.

La Figure 98 illustre l'évolution des concentrations du glucose et du xylose déterminées en fonction de différentes charges en NaOH. Dans le cas de l'imprégnation par aspersion (Figure 98A), la concentration en glucose évolue positivement en fonction de la charge en NaOH, et atteint un maximum de 4,08 g/L à une charge en NaOH de 7,8%. Au-delà de cette valeur, la libération du glucose semble ne pas être affectée par l'augmentation de concentration en NaOH. En revanche, dans le cas de l'immersion (Figure 98B), l'évolution de la concentration du glucose présente un pic à un niveau de charge en NaOH de 4%, où elle atteint 6,22 g/L. Ensuite, cette concentration diminue pour des charges en NaOH plus élevées. La concentration en xylose quant à elle reste quasiment stable en fonction de la variation de la charge en NaOH, pour les deux techniques d'imprégnation. Quant à l'échantillon natif, la concentration en glucose atteint 2,2 g/L alors que le xylose n'a pas été détecté. Toquero et Bolado (2014) ont obtenue suite au prétraitement alcalin de la paille de blé une concentration de 14 g/L en glucose, dans des conditions ; immersion à une concentration de 1% en NaOH, une température de 121 °C et un temps de traitement de 60 min. Il est à préciser que les conditions de l'hydrolyse enzymatique opérés dans ces travaux à savoir un rapport de substrat/volume de 10% et un temps d'hydrolyse enzymatique de 72h pourraient influencer le taux de saccharification comparativement à ceux utilisés dans notre travail, à savoir un rapport substrat/volume de 1% et un temps d'hydrolyse de 24h. L'obtention d'hydrolysat riche en glucose reste tout de même plus adéquate pour éviter une éventuelle étape de concentration des sucres qui favorise la croissance des microorganismes dans le procédé de fermentation.

Par ailleurs, il a été reporté que le lavage du substrat prétraité pourrait aussi améliorer la libération des sucres glucose (Toquero and Bolado, 2014) en éliminant les résidus chimiques et neutralisant ainsi le pH du substrat. Cependant cette opération augmente le risque des pertes en sucres produits au cours du prétraitement, la consommation en eau ainsi que les rejets chimiques.

L'imprégnation de l'hydroxyde de sodium à des humidifications élevées à basses concentrations parait alors favorable dans le procédé de prétraitement. Rappelons que la teneur en eau de la chènevotte atteint 40% pour la technique d'aspersion et environ 400% pour l'immersion après imprégnation de la solution chimique. Des teneurs en eau élevées impliquent l'utilisation de faibles concentrations en NaOH. L'évaluation de l'effet de la variation de la teneur en eau sur l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte parait alors nécessaire, et sera présentée dans la suite du manuscrit (paragraphe 4.2).

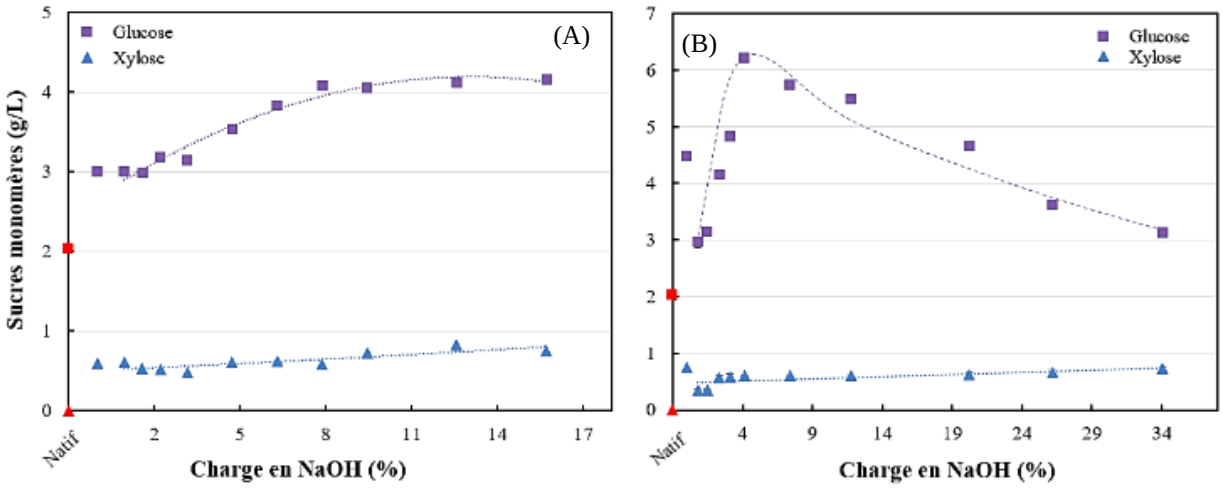


Figure 98 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de la chènevotte prétraitée en conditions alcalines. Imprégnation de l'agent chimique par aspersion (A) ou immersion (B)

2.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de la chènevotte prétraitée en conditions acides et alcalines

Les effets du prétraitement en conditions acides ou alcalines sur la chènevotte ont amélioré la conversion cellulosique en glucose, mais aussi permis dans certaines conditions, la libération du xylose pendant le prétraitement. Nous avons calculé le rendement global en sucres réducteurs récupérés suite au prétraitement et hydrolyse enzymatique (Figure 99, A, B) de la chènevotte traitée par prétraitement thermomécanique combiné à l'imprégnation de l'un des deux agents chimiques par aspersion, ou immersion pendant 10 ou 30 min.

Les rendements les plus élevés de bioconversion de la chènevotte suite au prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique sont de 82,6%, 97,1% et 82,5% obtenus à des concentrations en H_2SO_4 de 15%, 0,6% et 0,8% (correspondant à des charges de 4,7%, 2% et 2,6%) dans des conditions d'imprégnation par aspersion, immersion pendant 10 et 30 min, respectivement. Alors que dans le cas du traitement alcalin, les rendements les plus élevés sont

de 68,6%, 74,5% et 80,49% obtenus à des concentrations de 40%, 0,8% et 1% (correspondant à des charges de 12,5%, 3,1% et 3,8%) en NaOH imprégné par aspersion, immersion pendant 10 et 30 min, respectivement.

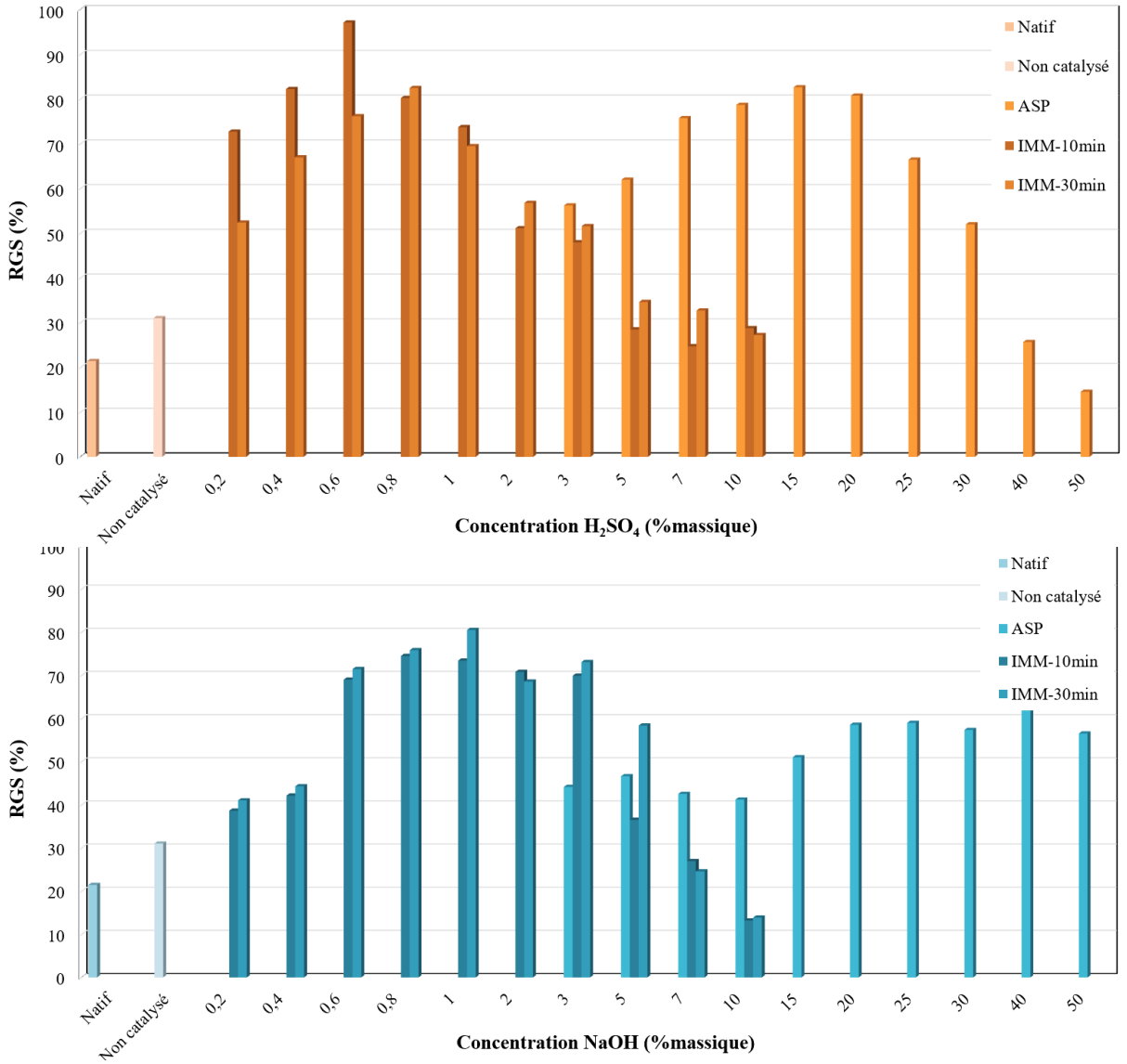


Figure 99 : Rendement global en sucres réducteurs récupérés de la chènevotte prétraitée par procédé thermomécanique combiné à l'acide sulfurique (A), ou à l'hydroxyde de sodium (B)

En comparant l'ensemble des essais utilisant la technique de l'immersion, nous avons constaté que dans le cas de l'acide sulfurique, un temps de 10 min est suffisant pour améliorer le rendement total en sucres réducteurs, notamment dans l'intervalle des faibles concentrations en acide (> 1%). En revanche, dans le cas du traitement par hydroxyde de sodium, la différence entre les rendements en sucres réducteurs obtenus après immersion pendant 10 ou 30 min n'est pas considérable quel que soit la concentration en agent chimique. Cela est probablement dû au fait que pendant l'immersion, l'absorption de la solution chimique par la chènevotte est presque maximale à 10 min, la prolongation du temps d'immersion ne varie que légèrement la quantité du catalyseur absorbée. Par conséquent, les variations observées lors de l'application de la même concentration, en comparant les deux temps d'immersion sont probablement liés à des

différences de teneur en eau mesurées après filtration et impactant le chargement en produit chimique retenu par la chènevotte.

Afin d'établir une comparaison entre le potentiel de la méthode de prétraitement utilisé lors de notre étude, à savoir l'aspersion ou l'immersion d'un agent chimique combiné au traitement thermomécanique et les principales techniques de prétraitement citées dans la littérature, nous nous sommes basés sur le rendement maximal de conversion cellulosique comme élément de réponse de l'hydrolyse enzymatique du substrat prétraité. Ce paramètre prend en compte la quantité en glucose récupérée après saccharification enzymatique. Nous avons résumé dans le Tableau 20 les données du prétraitement mais aussi le rendement de conversion cellulosique de certains prétraitements couramment utilisés dans la bioconversion de la biomasse lignocellulosique, ainsi les comparé à ceux obtenus dans notre travail.

L'intervention de l'action de l'acide dans l'hydrolyse des polymères des hémicelluloses lors du prétraitement présente un point en commun entre le procédé de prétraitement thermomécanique combiné à acide sulfurique, l'explosion à la vapeur seul ou combiné à l'acide et le prétraitement à l'acide dilué. En comparant le prétraitement de la chènevotte par immersion à l'acide sulfurique étudié dans notre travail et celui de la paille de riz par explosion à la vapeur combinée à l'acide sulfurique, nous remarquons que les besoins en acide sont presque égaux pour la maximisation de la conversion cellulosique. Le prétraitement des tiges de coton nécessite des concentrations en acide sulfurique un peu plus élevée (d'environs 37%) en procédant dans les mêmes conditions de température et temps de séjour que celles utilisées dans notre travail. De plus, le prétraitement à l'explosion à la vapeur seule favorise la maximisation du rendement de conversion cellulosique qu'en opérant à des températures assez élevées qui favorisent le phénomène de l'autohydrolyse, principale modification qui a lieu au cours de ce type de prétraitement.

Quant au prétraitement alcalin, nous remarquons que les besoins en hydroxyde de sodium sont moins importants dans le cas du prétraitement de la chènevotte par immersion utilisé dans notre travail que celui du bois de peuplier. Notons que dans ce dernier cas, une faible température et un temps de séjour élevé sont opérés. Néanmoins, dans les deux cas de prétraitement, les rendements de conversion cellulosique sont moins importants que ceux présentés par les autres procédés. Ce constat pourra être lié au fait que le traitement alcalin est plus efficace sur la biomasse herbacée que celle de type ligneuse (bois).

Par ailleurs, le prétraitement par aspersion d'acide sulfurique ou hydroxyde de sodium représente le procédé le plus exigent en termes d'apport en agent chimique. En effet, de point de vue technique, la méthode d'immersion permet de dissiper la capacité de neutralisation de la chènevotte lorsque celle-ci est immergée dans un volume important de solution d'acide, elle permet aussi une meilleure diffusion et répartition du catalyseur au sein des particules du substrat. Cependant, cette technique qui mobilise de grandes quantités d'acide nécessite une étape de séparation entre le solide imprégné et le liquide d'imprégnation, ainsi qu'une étape de recyclage de l'acide. Quant à la méthode d'aspersion, l'effet de l'acide devient significatif que lorsque les concentrations sont relativement élevées, car des besoins supplémentaires en acide

seront dépensés et neutralisé par la fraction minérale alcaline contenue dans la chènevotte. D'autre part, de point de vue environnemental, la technique d'aspersion consomme de moindre quantité d'acide et permet d'éviter la génération de rejets chimiques nécessitant un recyclage.

Tableau 20 : Comparaison des principaux prétraitements en termes de rendement en sucres récupérés après hydrolyse enzymatique

Procédés de prétraitement	Biomasse traitée	Taille des particules (mm)	Conditions du prétraitement	R (%) [a]	Références
Traitement thermomécanique DIC combiné à l'acide sulfurique ou l'hydroxyde de sodium	Chènevotte	1-8	15% H_2SO_4 (aspersion), 165 °C, 30 min	70,8	Travaux de la présente thèse
			25% NaOH (aspersion), 165 °C, 30 min	68	
			0.6% H_2SO_4 (immersion, 10 min), 165 °C, 30 min	99	
			0.6% NaOH (immersion, 30 min), 165 °C, 30 min	72	
Explosion à la vapeur seule ou combinée à l'acide	Paille de colza	<350	210 °C, 10 min	86	(Wood et al., 2014)
	Bagasse de canne à sucre	---	2% SO_2, 190 °C, 5 min	87	(Carrasco et al., 2010)
	Paille de riz	5	0,5% H_2SO_4 (immersion), 180 °C, 10 min	95	(Sharma et al., 2015)
Thermohydrolyse	Bagasse de canne à sucre	---	160 °C, 6 MPa, 60 min, 25% NH_3	98,5	(Zhuang et al., 2015)
Prétraitement à l'acide dilué	Tiges de cotton	2	1,07% H_2SO_4, 157 °C, 20 min	93,5	(Gaur et al., 2016)
Prétraitement en milieu alcalin	Bois de Peuplier	2	2,8 %, 94 °C, 1h	42,2	(Rawat et al., 2013)

[a] *Rendement de conversion cellulosique en glucose*

Le prétraitement en présence de NaOH vise la délignification de la biomasse comme dans le cas du procédé Kraft dans l'industrie de fabrication du papier. Dans ce procédé, les concentrations en NaOH sont maintenu faible avec des temps de traitements plus élevés, ce qui limite des réactions secondaires à la délignification. Ces réactions peuvent alors potentiellement avoir lieu à des hautes concentrations en NaOH et haute température, minimisant ainsi le rendement en sucres récupérés. L'utilisation alors de faible concentration en NaOH à un taux d'humidification élevée du substrat parait alors plus avantageux de point de vue économique et environnementale dans le cadre du prétraitement alcalin.

La compréhension de ces tendances à ce niveau de notre étude nous mène à établir un travail d'optimisation par la méthode des plans d'expériences des deux prétraitements, visant à déterminer les conditions optimales du prétraitement en conditions acides ou alcalines en maximisant le rendement en sucres réducteurs dans les deux cas d'étude.

3. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'ALFA

La plante de l'alfa « *stipa tenacissima* » est une matière lignocellulosique choisie dans notre travail de thèse en vue d'évaluer son potentiel dans le procédé de bioconversion en éthanol. Comparée à la chènevotte qui appartient à la classe du bois dur, l'alfa est une plante herbacée qui présente quelques particularités au niveau de ses caractéristiques physiques et chimiques. Cette plante se présente sous forme de longs tiges fins se caractérisant par une résistance élevée, dû principalement à son importante teneur en cellulose. Faisant partie de la classe de la matière végétale herbacée, sa fraction hémicellulosique se caractérise par une structure possédant des teneurs en groupements acétyles plus importantes. De plus, la matière herbacée est connue par des teneurs en lignine relativement inférieurs à celles dans la biomasse de nature ligneuse. L'ensemble de ces éléments représentent des caractéristiques ayant une influence directe sur les conditions opératoires du procédé de prétraitement ainsi que leurs répercussions sur la modification de la biomasse. Dans ce contexte, le choix de cette plante semble intéressant pour permettre d'explorer l'effet de sa réactivité au prétraitement sur la récupération des sucres réducteurs pendant l'hydrolyse enzymatique, en offrant des données de comparaison par rapport à l'étude réalisée sur la chènevotte.

3.1 Effet du prétraitement en conditions acides

Les principales modifications physico-chimiques produites au niveau de la structure et la composition de l'alfa suite au prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique ont été présentées dans le précédant chapitre. La concentration de l'acide sulfurique ainsi que la technique de son imprégnation, à savoir l'aspersion et l'immersion pendant 30 min, ont été étudiées. L'alfa a été identifié plus sensible au prétraitement par rapport à la chènevotte. Nous avons constaté que l'effet de l'acide a été assez significatif sur la solubilisation de la fraction des hémicelluloses contenue dans l'alfa à des faibles niveaux de concentration et quel que soit la technique d'imprégnation du catalyseur. De plus, nous avons remarqué une baisse de l'acidité du substrat d'alfa prétraité quand le traitement thermomécanique est effectué sans présence de catalyseur, traduisant de possible libération d'acides suite à l'hydrolyse partielle de la fraction des hémicelluloses. Ce phénomène dépend principalement de la température du traitement, et est considéré comme élément contribuant à l'autohydrolyse de la biomasse (Duque et al., 2016; Faik, 2013). Ces modifications chimiques de l'alfa prétraité ont été accompagnées par une augmentation de sa surface spécifique traduisant plus d'ouverture de la matrice lignocellulosique.

Dans cette partie du travail, nous avons effectué l'hydrolyse enzymatique de l'alfa prétraitée, ainsi analysé l'effet des paramètres du traitement et les modifications produites au sein de l'alfa prétraité sur la saccharification enzymatique. Tous les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions, notamment un rapport substrat/volume de 1%, une température de 50 °C, un pH du

milieu de 4,6. La solution enzymatique utilisé est la Cellulast-1,5L. Cette opération a été conduite pendant 24h. Des cinétiques de l'hydrolyse enzymatique ont été suivies, cependant ils ne sont pas présentés car ils découlent aux mêmes conclusions que ceux présentées dans le cas de l'étude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de la chènevotte. Les résultats ont été exprimés en termes de concentration en sucres réducteurs dosés par le protocole DNS, et étudiés en fonction de la sévérité du prétraitement qui s'exprime par l'indice CS, la charge en catalyseur (%) et la technique de son imprégnation, mais aussi de la surface spécifique et le taux de réduction en hémicelluloses. Le Tableau 21 résume les conditions du prétraitement qui a été effectué en conditions acides. Les valeurs de pH mentionnées correspondent aux niveaux de pH du substrat mesurés avant hydrolyse enzymatique.

Tableau 21 : Conditions du prétraitement en conditions acides de l'alfa

Essais	IMP	Concentration H_2SO_4 (%)	Charge H_2SO_4 (%)	pH	CS
Natif	---	----	---	6,03±0,02	---
1	---	0	0,00	4,8±0,01	---
2	Aspersion	2	0,63	3,8±0,01	-0,20
3		3	0,95	3,5±0,01	0,40
4		5	1,58	2,7±0,04	0,73
5		7	2,21	2,6±0,02	0,94
6		10	3,16	2,3±0,01	1,19
7		12	3,79	2,2±0,07	1,27
8		15	4,74	2,1±0,01	1,34
12	Immersion	0,5	0,91	3,23±0,01	0,32
13		1	2,12	2,01±0,02	1,43
14		2	4,56	1,83±0,01	1,64
15		3	6,10	1,72±0,01	1,82

3.1.1 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs

La Figure 100 illustre la variation des concentrations en sucres réducteurs R_1 et R_2, obtenus à (0h) et (24h) de l'hydrolyse enzymatique respectivement, en fonction du CS, A_{BET} et le taux de réduction en hémicelluloses pour les deux techniques d'imprégnation aspersion et immersion (30 min). Les sucres R_1 proviennent du processus de prétraitement. Dans l'intervalle des sévérités appliquées dans l'étude du prétraitement de l'alfa, nous remarquons que la concentration des sucres R_1 produits après prétraitement est corrélée positivement avec CS, A_{BET} et le taux de réduction en hémicelluloses (Figure 100, A_1, A_2, A_3) ; Dans le cas de l'aspersion, R_1 atteint une valeur maximale de 1,94 g/L à un CS = 1,34 correspondant à une concentration en acide sulfurique de 15%. Dans le cas de l'immersion, R_1 atteint une valeur maximale de 2,71 g/L à un CS = 1,82 correspondant à une concentration en acide sulfurique de 3%. Concernant l'échantillon d'alfa traité sans catalyseur, la concentration en R_1 obtenu est de 0,92 g/L. Nous en déduisons que le prétraitement de l'alfa imprégné par l'acide sulfurique par aspersion ou immersion a engendré la production de sucres réducteurs 2 ou 3 fois supérieur, respectivement, que celle obtenue par l'alfa traité sans catalyseur. Les valeurs maximales en R_1

sont obtenues à des taux de réduction en hémicelluloses de 68,5% et 75,5% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement. Comparé aux résultats obtenus dans le cas du prétraitement acide de la chènevotte, le prétraitement acide de l'alfa a produit des concentrations en sucres plus élevées quel que soit la technique de l'imprégnation de l'acide. Cela pourrait dépendre de la teneur en hémicelluloses et lignine initialement présente dans la biomasse. De plus, nous obtenons, dans le cas du traitement des deux biomasses, des concentrations en R_1 par la technique d'immersion supérieures à celles obtenues par la technique d'aspersion. Ce qui pourrait être dû à une meilleure diffusion des ions hydronium au sein de la matière lignocellulosique en raison d'une présence suffisante en eau. La production en sucres R_1 est corrélée avec la réduction en hémicelluloses et la surface spécifique dans tous les cas du prétraitement.

Les concentrations en sucres R_2 proviennent de la conversion enzymatique de la cellulose des substrats d'alfa prétraités à différentes conditions. La Figure 100, B_1, B_2, B_3 montre des liens de corrélation qui sont établis entre R_2 et CS, A_{BET} et le taux de réduction en hémicelluloses pour les deux techniques d'imprégnation.

Nous remarquons que jusqu'à un certain niveau de sévérité, quel que soit la technique d'imprégnation du catalyseur, la saccharification enzymatique est corrélée positivement avec l'indice CS, A_{BET} et le taux de réduction en hémicelluloses. Dans le cas de l'aspersion, R_2 atteint une valeur maximale de 4,64 g/L à un CS = 0,73, A_{BET} = 0.73 (m^2/g) et un taux de réduction en hémicelluloses de 43,6%. Dans le cas de l'imprégnation par l'immersion, R_2 atteint une valeur maximale de 4,47g/L à un CS=1,43, A_{BET} = 1,32 (m^2/g) et un taux de réduction en hémicelluloses de 43,3%. Alors que dans le cas de l'alfa traité sans catalyseur et celle à l'état natif, nous obtenons des concentrations en R_2 de 1,83 et 1,26 g/L. Par conséquent, l'élimination d'une fraction en hémicelluloses aux alentours de 43 % de l'alfa prétraitée parait efficace pour la maximisation de la production des sucres réducteurs après hydrolyse enzymatique de l'alfa prétraitée.

Au-delà d'une valeur de CS = 1, bien que la réduction en hémicelluloses ainsi que la surface spécifique continuent à augmenter, R_2 diminue. Ce qui explique qu'à ces niveaux de sévérité, l'hydrolyse enzymatique est confrontée au phénomène d'inhibition. Ce dernier est généralement dû à une inactivation des enzymes dans des gammes de pH de substrat qui ne sont pas optimales, de plus des phénomènes d'adsorption non productives qui pourront avoir lieu entre les enzymes et la lignine, cette dernière se présente sur la paroi cellulaire sous forme de gouttelettes (paragraphe 4.1.4, chapitre 3) formées pendant le prétraitement à des concentrations élevées en acide.

En comparant ces résultats à ceux obtenus par l'étude de la chènevotte, nous remarquons que, dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de l'alfa à l'état natif, il semble que sa structure moins récalcitrante que la chènevotte se caractérisant par une teneur plus faible en lignine, favorise l'attaque enzymatique aux polymères cellulosiques. De plus, nous constatons que le prétraitement de l'alfa sans catalyseur semble avoir plus d'impact sur l'hydrolyse enzymatique que dans le cas de la chènevotte. Nous rappelons que le traitement sans catalyseur consiste à

l'humidification du substrat avec de l'eau suivie du traitement thermomécanique à 165 °C et pendant 30 min. Ces conditions engendrent alors dans le cas de l'alfa, qui présente une fraction en hémicelluloses plus élevée, le phénomène de l'autohydrolyse suite à la libération des acides acétiques, ce qui provoque la modification du substrat et impacte par la suite la production des sucres réducteurs après hydrolyse enzymatique.

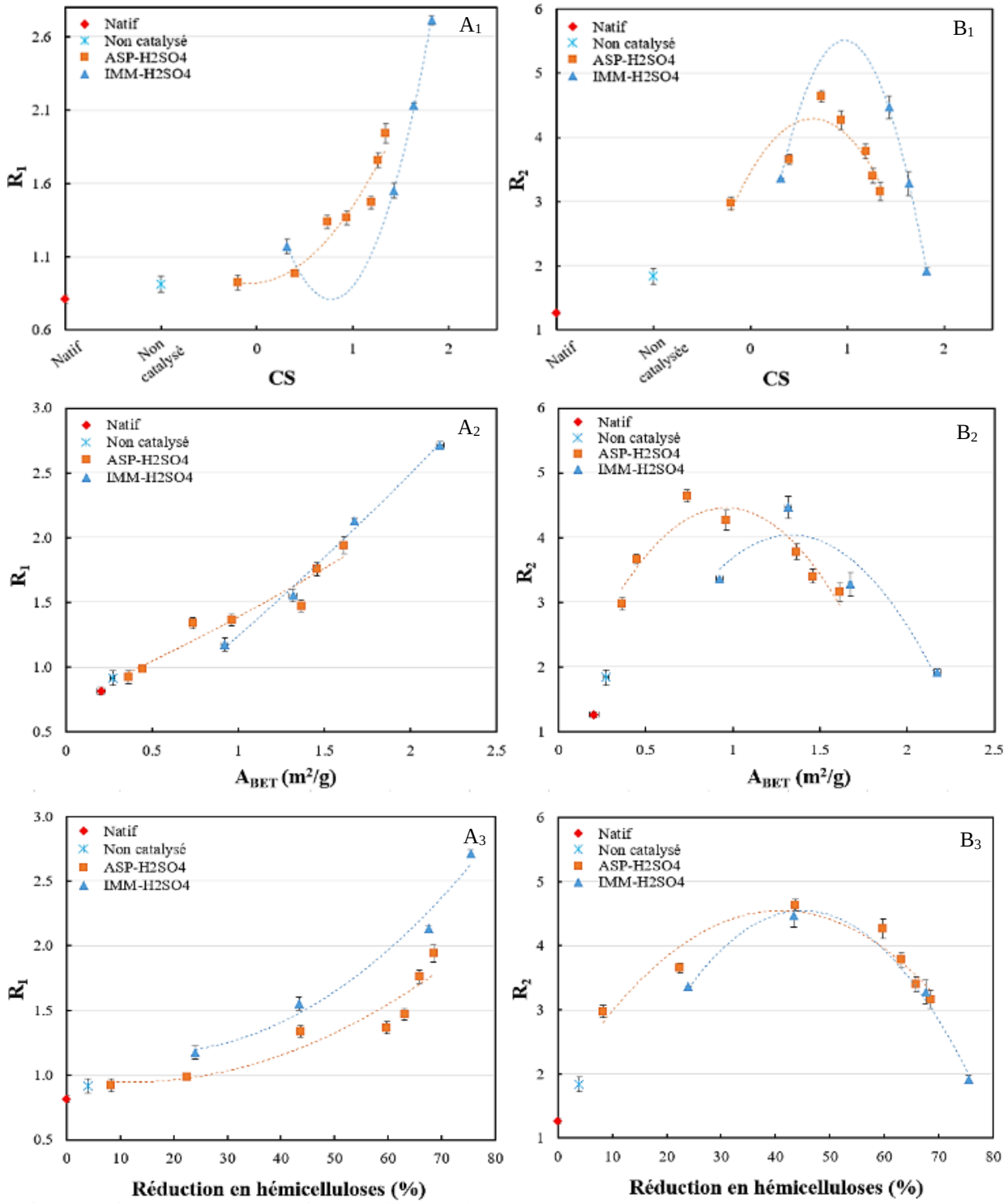


Figure 100 : Variation de R_1 et R_2 en en fonction de CS (A_1, B_1), A_{BET} (A_2, B_2) et de la réduction en hémicelluloses (A_3, B_3) de l'alfa prétraitée en conditions acides.

Compte tenu de ce qui précède, le prétraitement thermomécanique de l'alfa en présence d'acide s'est révélé favorable à l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique à des niveaux de sévérité plus faibles comparés à ceux nécessaires dans le prétraitement acide de la chènevotte. Ce constat pourrait être associé à la différence dans la composition chimique en termes de matière minérale entre les deux matières lignocellulosiques. En effet, les résultats de détermination de la composition chimique de l'alfa prétraité, montrent une teneur de 3,33% en matière minérale. Cette teneur est relativement plus faible que celle contenue dans la chènevotte. En prenant en considération le caractère alcalin de la matière minérale ainsi de sa capacité dans la neutralisation de l'acide, nous pouvons en déduire que la demande en acide à tendance à diminuer quand la matière lignocellulosique présente de faible teneur en matière minérale. Ce qui se traduit par des prétraitements à de faibles niveaux de sévérités.

Ces observations sont comparables à ceux obtenus par Kataria et al. (2017) concernant le prétraitement du miscanthus (plante herbacée) par explosion à la vapeur combiné à l'acide sulfurique. Ces travaux indiquent une teneur en matière minérale du substrat de 2,17%. Ils suggèrent que des conditions de prétraitements modérées, à savoir l'imprégnation de l'acide sulfurique à 0,5% par immersion combiné au traitement à l'explosion à la vapeur à 161 °C pendant 11,5 min (CS= 1,42), représentent des conditions assez suffisantes pour favoriser des modifications de la structure de la biomasse et pouvant améliorer le rendement de saccharification enzymatique de sept fois par rapport à la biomasse non traitée.

D'autres travaux (Benjamin et al., 2014) ont aussi observé que la variation de la composition chimique entre plusieurs variétés de bagasse de cannes à sucres, notamment au niveau de la teneur en matière minérale, influence l'efficacité du prétraitement à l'acide dilué notamment à des faibles sévérités en affectant le rendement en hydrolyse enzymatique. Ces travaux suggèrent qu'une faible teneur en matière minérale avec un ratio élevé en polysaccharides/Lignine favorise la libération des sucres après hydrolyse enzymatique du substrat prétraité.

Ces observations supportent le fait que la composition chimique de la biomasse lignocellulosique représente un élément important dans la détermination des conditions de prétraitement ainsi que dans l'amélioration de l'efficacité de la saccharification enzymatique.

3.1.2 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat

L'hydrolysat obtenu après hydrolyse enzymatique de l'alfa en conditions acides a été analysé par chromatographie en phase liquide (HPLC). Nous avons analysé les sucres monomères, notamment glucose et xylose. La cellobiose n'a pas été détectée. La Figure 101 illustre la représentation des résultats obtenus. Les concentrations en glucose et xyloses sont représentées en fonction de la charge en H_2SO_4 (g/100 g MS).

Nous remarquons que les concentrations en glucose et xylose libérées par l'échantillon traité sans catalyseur chimique sont légèrement améliorées comparativement à ceux libérées par l'échantillon natif. Ce qui traduit la réaction de l'alfa à la vapeur saturée pendant le traitement hydrothermique appliqué. Grace à la présence d'eau à haute température au sein du substrat, les phénomènes de transfert thermique engendre des modifications structurales par solubilisation

partielle des hémicelluloses, améliorant la conversion cellulosique. Cette observation est différente à celle obtenue dans le cas du traitement de la chènevotte sans catalyseur, la raison la plus probable est la faible teneur en groupement acétyle au sein de la chènevotte que dans l'alfa. Ce critère influence alors les conditions du prétraitement en présence d'acide en tenant en compte le type de la matière lignocellulosique.

Le prétraitement thermomécanique de l'alfa en présence de l'acide a visiblement amélioré la libération du xylose et du glucose. Les concentrations maximales en glucose et xylose ont atteint des valeurs de 6,8 g/L et 1,14 g/L à une charge en H_2SO_4 de 2,2% imprégné par aspersion, et 6,6 g/L et 1,2% à une charge en H_2SO_4 de 2,1% imprégné par immersion, comparé à des concentrations de 2,15 g/L et 0,01 g/L libéré par l'échantillon natif (Figure 101, A, B). Nous constatons alors que les performances de la technique d'aspersion sont similaires à ceux de l'immersion dans le cas du traitement de l'alfa. En apportant la même charge en H_2SO_4 à la matière quel que soit la technique de l'imprégnation, nous sommes amenés à avoir des résultats quasi-similaires en termes de libération des sucres. Ces résultats suggèrent que la solubilisation des hémicelluloses suite au traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique améliore significativement l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique pour les deux techniques d'imprégnation du catalyseur. Au-delà d'une charge de 3% en H_2SO_4, les concentrations en glucose et xylose diminuent. Ce qui présente un indicateur de la dégradation des sucres, et de l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique dans ces conditions.

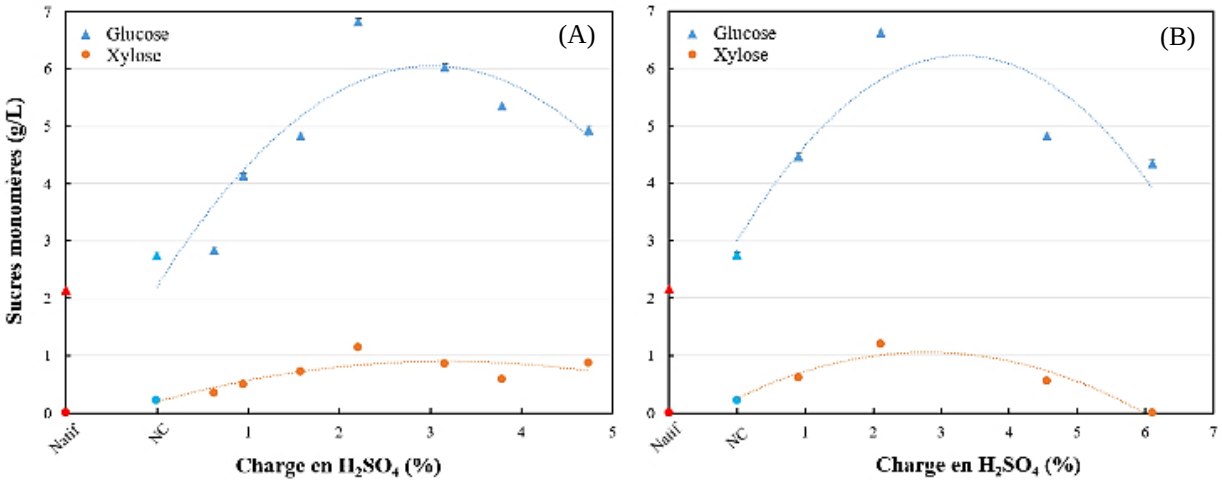


Figure 101 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de l'alfa prétraitée en fonction de la charge en H_2SO_4. Imprégnation de l'acide par aspersion (A) ou immersion (B).

3.2 Effet du prétraitement en conditions alcalines

Afin d'évaluer l'efficacité du prétraitement alcalin sur la matière lignocellulosique de type herbacée, l'alfa a été prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium. L'effet de ce type de prétraitement sur les caractéristiques de l'alfa a été présenté dans le précédant chapitre. Ce prétraitement a été étudié à différentes concentrations en NaOH, en comparant les techniques d'imprégnation aspersion et immersion (30min). Les principales actions mises en évidence au niveau du substrat prétraité étaient la

réduction de la teneur en lignine, la dépolymérisation des hémicelluloses et la diminution de la cristallinité de la cellulose. Ces modifications ont été rapportées favorables pour l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique (Sindhu et al., 2014b; Xu et al., 2016). Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de ce type de prétraitement ainsi que les modifications produites au niveau structurale de l'alfa prétraitée sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique, dont les conditions ont été gardées identiques à ceux des essais précédemment décrits. Le Tableau 22 résume les conditions du prétraitement effectués en conditions alcalines et les valeurs de pH correspondent à ceux des substrats mesurés avant hydrolyse enzymatique.

Tableau 22 : Conditions du prétraitement en conditions alcalines de l'alfa

Essais	IMP	NaOH (%)	Charge en NaOH (%)	pH
Natif	---	---	---	6,03±0,02
1	---	0	0,00	4,8±0,01
2	Aspersion	2	0,63	5,63±0,04
3		3	0,95	5,74± 0,06
4		5	1,58	6,40±0,14
5		7	2,21	6,42± 0,01
6		10	3,16	6,84± 0,01
7		12	3,79	7,14±0,03
8		15	4,74	7,76± 0,05
9	Immersion	0,5	1,20	8,20±0,01
10		1	1,83	10,48±0,01
11		2	4,89	11,06±0,01
12		3	5,93	12,88±0,01

3.2.1 Analyse des paramètres influençant la production en sucres réducteurs

Les résultats de l'hydrolyse enzymatiques ont été analysés en termes de concentration en sucres récupérés. La Figure 102 illustre l'évolution de R_1 et R_2 en fonction de la charge en NaOH (%) et le taux de réduction en lignine (%) en comparant les résultats des deux techniques d'imprégnation utilisées.

L'observation des résultats montrent un début d'une légère augmentation de R_1 après application d'une charge en NaOH de 4,74% dans le cas de l'imprégnation par aspersion. Tandis que dans le cas d'immersion, l'augmentation de R_1 est plus prononcée à une charge en NaOH de 5,93%. Néanmoins, quel que soit la technique d'imprégnation, ces niveaux en R_1 restent proches à la concentration obtenue par l'échantillon traité sans catalyseur (Figure 102, A_1). En tenant compte de la solubilisation des hémicelluloses préalablement observée par l'analyse de la composition du substrat prétraité, il est probable que les fractions solubilisées soient produites sous forme d'oligomères de sucres. Par ailleurs, comme dans le cas de la chènevotte, nous remarquons alors que la production en sucres R_1 est plus favorable dans le cas de l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium par immersion. D'autre part, R_1 ne varie pas considérablement avec la réduction de la proportion en lignine dans les deux cas d'imprégnation du catalyseur. Lorsque la lignine est éliminée à haute proportion, une légère augmentation de

R_1 est observée (Figure 102, A_2). Ce qui revient probablement au fait que l'élimination de la lignine entraine une perturbation de la fraction hémicellulosique, notamment par la rupture des liaisons ester liants les hémicelluloses et la lignine. Par conséquent, cette dernière pourra être partiellement hydrolysée suite à l'élimination de la lignine.

L'évolution de la concentration des sucres réducteurs R_2 en fonction de la charge en NaOH (%) et le taux de réduction en lignine (%) est illustrée dans les Figure 102, B_1, B_2. Nous observons que R_2 est corrélée positivement avec la charge en NaOH et le taux de réduction en lignine. Dans les conditions de prétraitement alcalin appliqué, R_2 atteint des valeurs maximales de 2,8 g/L et 4,4 g/L à des charges en NaOH de 4,74% et 5,93% correspondant à des taux de réduction en lignine de 62,7% et 71,6% pour les techniques aspersion et immersion, respectivement. Alors que dans le cas de l'alfa traité sans catalyseur et celle à l'état natif, nous obtenons des concentrations en R_2 de 1,83 et 1,26 g/L, respectivement.

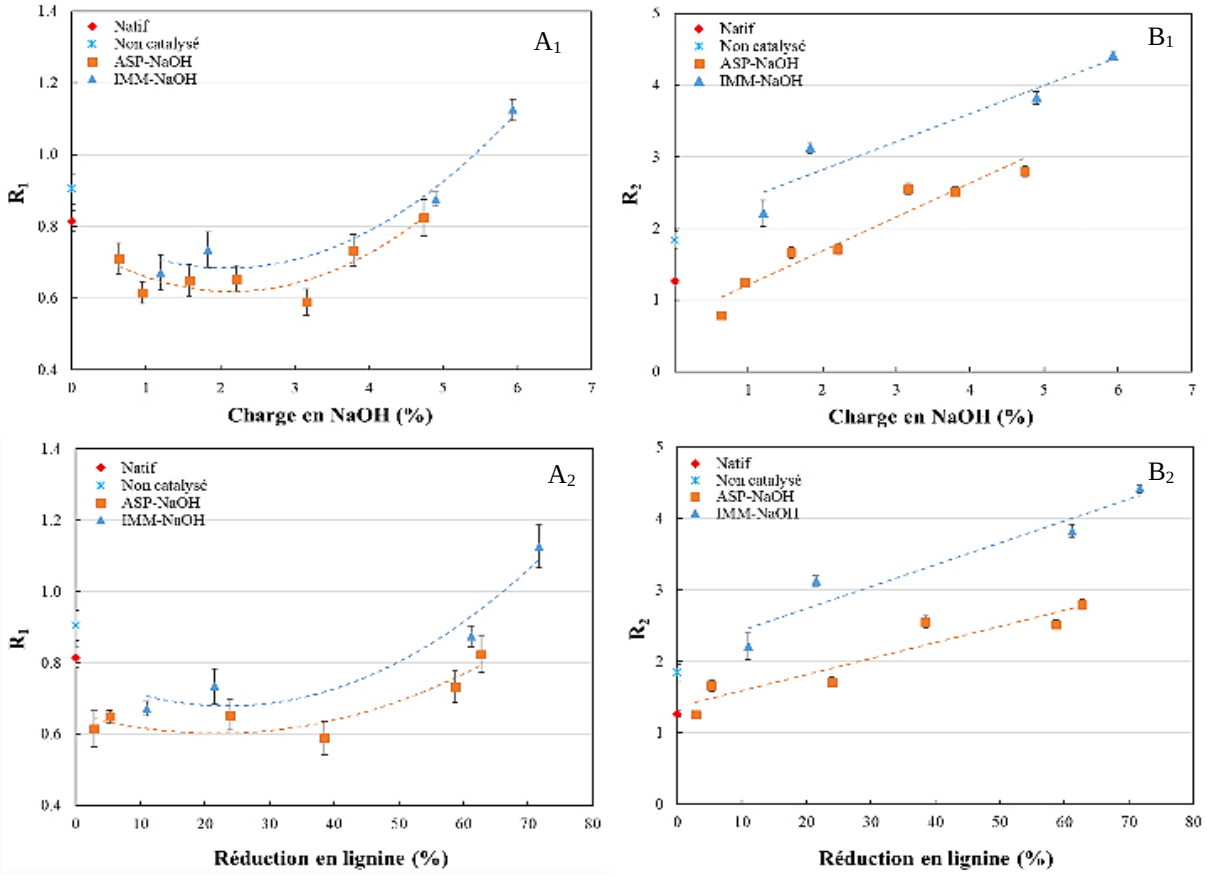


Figure 102 : Variation de R_1 et R_2 en fonction de la charge en NaOH (A_1, A_2) et du taux de réduction en lignine (B_1, B_2) de l'alfa prétraitée en conditions alcalines.

Il a été reporté que le prétraitement alcalin est plus adapté aux résidus agricoles et les cultures herbacées que la matière ligneuse en raison des quantités relativement faibles en lignine (García et al., 2014). Les travaux de Choi et al. (2013) sur le prétraitement du résidu de fruits vides appelé « *empty fruits bunch* » utilisant l'explosion à la vapeur combinée à l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium corroborent aux résultats de notre étude. En effet, cette étude montre une amélioration de l'hydrolyse enzymatique après délignification du substrat à des faibles

concentrations en NaOH. Les conditions optimales reportées pour maximiser la saccharification enzymatique sont obtenues à une concentration en NaOH de 3%, une température de traitement à 160 °C et un temps de séjour de 11 min. Ces conditions correspondent à un taux de délignification de 33%. Hu and Wen, (2008) ont utilisé la plante *swichgrass* comme matière première dans l'évaluation du prétraitement alcalin combiné au chauffage par microondes. La biomasse a été immergée dans différentes solutions d'hydroxyde de sodium dont les concentrations variait de 0,05 à 0,3% (massique). Les résultats ont aussi montré que les modifications produites pendant le prétraitement notamment l'élimination de la lignine, ont contribué à une augmentation du rendement en sucre de 70%.

Les résultats de notre étude suggèrent que le prétraitement alcalin appliqué a amélioré la saccharification de l'alfa prétraitée, notamment dans le cas de l'imprégnation de l'agent chimique par la technique d'immersion. Par conséquent, l'élimination de la lignine après prétraitement de l'alfa en conditions alcalines parait efficace dans l'amélioration de la production des sucres réducteurs après hydrolyse enzymatique.

3.2.2 Distribution des sucres monomères dans l'hydrolysat

L'hydrolysat obtenu après hydrolyse enzymatique de l'alfa prétraitée en conditions alcalines a été analysé par chromatographie en phase liquide (HPLC). Nous avons analysé les concentrations obtenues en sucres monomères glucose et xylose.

La Figure 103 représente l'évolution des concentrations en glucose et xylose en fonction de la charge en NaOH. Quel que soit la technique d'imprégnation, la concentration en glucose évolue positivement en fonction de la charge en NaOH. En effet, cette évolution s'avère plus annoncée dans le cas du prétraitement par immersion qu'en aspersion. La concentration en glucose à tendance à se stabiliser à partir d'une charge en NaOH de 5,93% dans le cas de l'immersion, alors que dans le cas de l'aspersion, cette concentration à tendance à augmenter avec l'augmentation de la charge en NaOH. Quant au xylose, l'évolution de sa concentration suit presque les mêmes tendances que celle du glucose. Les concentrations maximales en glucose et xylose atteignent des valeurs de 4,51 g/L et 0.8 g/L à une charge en NaOH de 4,74% pour l'aspersion, et 5,88 g/L et 0,9 g/L à une charge de 5,93% pour l'immersion. Les concentrations maximales en glucose sont environ deux ou trois fois supérieur, pour l'alfa prétraité par aspersion ou immersion, respectivement, que celle de l'alfa à l'état natif. Des tendances similaires ont été reportées par Asghar et al., (2015) sur le prétraitement de la paille de blé (2% NaOH, 121 °C, 90 min) et par Xu et al., (2010) sur le prétraitement de la plante *swichgrass* (1%, 50 °C, 12h). Ces travaux suggèrent la corrélation entre la réduction de la teneur en lignine et l'intensification de la libération du glucose pendant l'hydrolyse. De plus, la combinaison de long temps de résidence et haute concentration en hydroxyde de sodium a été reporté favorable pour l'amélioration de la saccharification enzymatique.

La production en glucose et xylose via le traitement alcalin de l'alfa demande des besoins en NaOH plus faibles que ceux retrouvés dans le cas du prétraitement alcalin de la chènevotte. Ce constat peut être dû au fait que l'alfa présente une teneur en lignine plus faible que celle

contenue dans la chènevotte. Ces résultats confirment encore une fois le fait que l'imprégnation par immersion est plus favorable lors de l'utilisation de l'hydroxyde de sodium comme agent chimique.

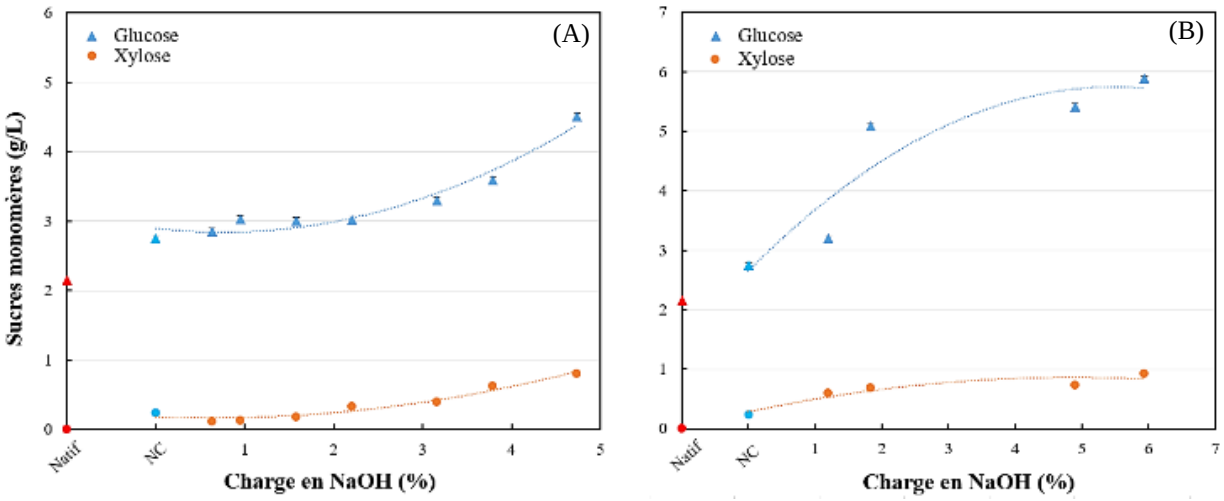


Figure 103 : Concentrations en sucres monomères présents dans l'hydrolysat de l'alfa prétraitée en fonction de la charge en NaOH. Imprégnation de la base par aspersion (A) ou immersion (B).

3.3 Comparaison des rendements en sucres récupérés de l'alfa prétraitée en conditions acides et alcalines

Les prétraitements en conditions acides ou alcalines ont permis la libération des quantités de xylose mais également l'amélioration significative de la conversion cellulosique, en l'occurrence, la libération du glucose par hydrolyse enzymatique de l'alfa prétraitée. Nous avons calculé le rendement global en sucres réducteurs obtenus par les différents procédés de bioconversion effectués dans notre travail (Figure 104).

Les rendements les plus élevés de bioconversion de l'alfa prétraitée par traitements thermomécaniques combinés à l'acide sulfurique sont de 89,2%, 89,8% obtenus à des concentrations de 5%, 1% et des charges de 1,6% et 2,1% en H_2SO_4 imprégné par aspersion, immersion, respectivement. En raison de sa faible teneur en matière minérale, l'impact de la technique d'imprégnation de l'acide sulfurique chez l'alfa n'as pas montré d'effet considérable lorsqu'on applique les mêmes charges en catalyseur. Par conséquent, le taux d'humidification appliqué par aspersion parait suffisant dans le prétraitement. Dans le cas du traitement alcalin, les rendements les plus élevés atteints sont de 54% et 82,7% obtenus à des concentrations de 15% et 3% et des charges de 4,7% et 5,9% en NaOH imprégné par aspersion et immersion, respectivement. Ce type de traitement exige alors une humidification importante du substrat ce qui revient plus avantageux en termes de rendement globale en sucres réducteurs.

Afin de comparer les rendements obtenus par l'alfa à ceux obtenus par la chènevotte, nous avons résumé dans le Tableau 23 les résultats obtenus pour les différents prétraitements utilisé dans ce travail de thèse.

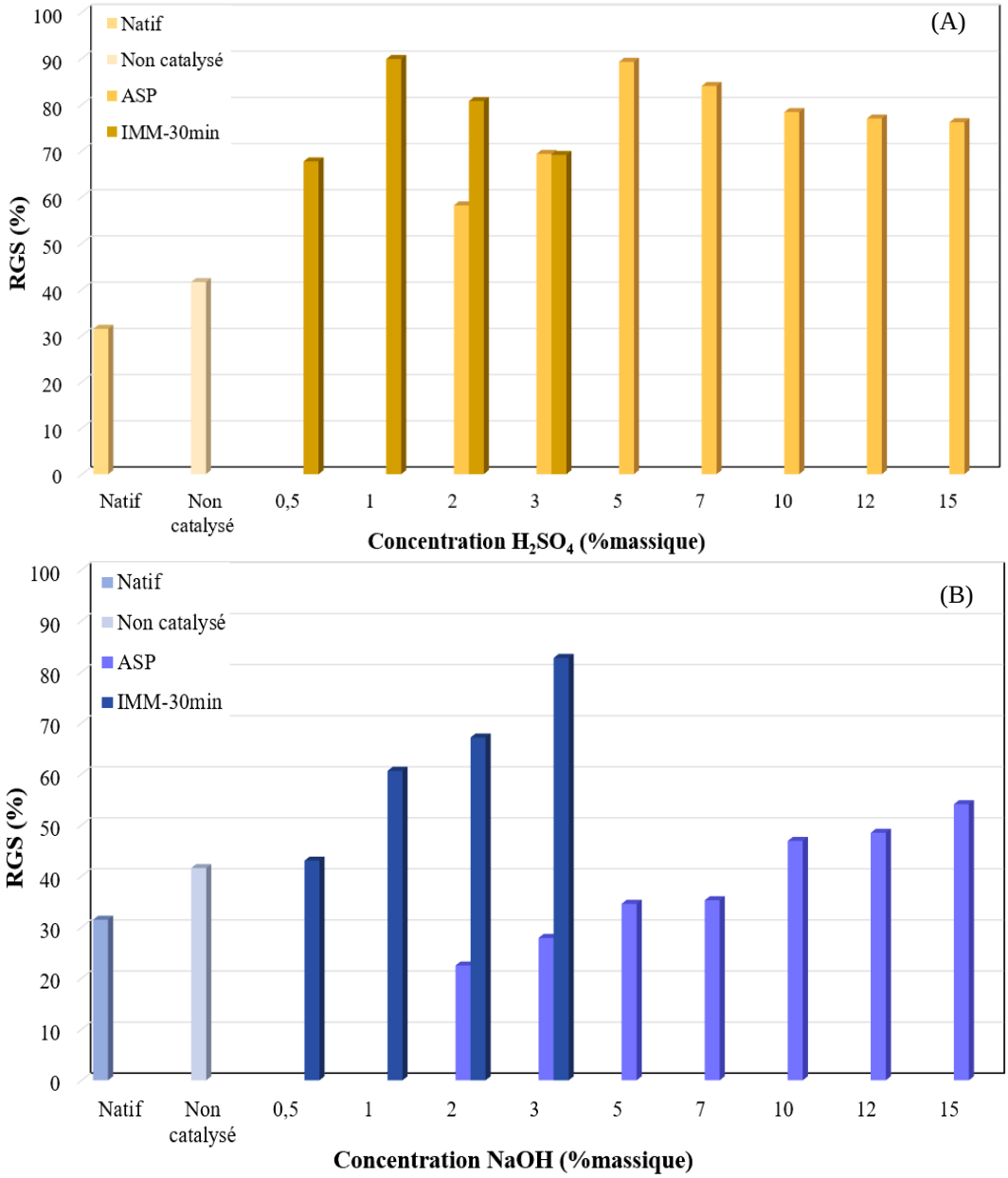


Figure 104 : Rendement global en sucres réducteurs récupérés après hydrolyse de l'alfa prétraitée en présence de l'acide sulfurique (A), ou de l'hydroxyde de sodium (B)

Dans le cas de l'aspersion de l'acide sulfurique, le rendement global maximale en sucres atteint par l'alfa prétraitée est plus élevé que celui atteint par la chènevotte prétraitée, avec une mobilisation de chargement en acide plus faible de 65%. Néanmoins, dans le cas de l'immersion de l'acide sulfurique, le rendement global maximale en sucres atteint par la chènevotte prétraitée est plus élevé que celui atteint par l'alfa prétraité, avec des taux de chargement égaux dans les deux cas de prétraitement. En tenant en compte des critères de neutralisation de l'acide de la chènevotte et la teneur en groupement acétyles qui assez importante dans l'alfa, nous

pouvons en déduire que le prétraitement par immersion de l'acide sulfurique est plus privilégié dans le cas de la chènevotte que l'alfa.

Dans le cas du prétraitement par hydroxyde de sodium, le rendement global maximale en sucres atteint pour la technique d'aspersion reste modeste dans le cas des deux matières d'études malgré la mobilisation de taux de chargements élevés en hydroxyde de sodium. Alors que dans le cas de la technique d'immersion, le rendement global maximale en sucres présenté par l'alfa aboutit à une augmentation de 34 % par rapport à la technique d'aspersion, en augmentant le chargement en NaOH de 20%. D'autre part, le rendement global maximale en sucres obtenus par la chènevotte dans le cas de l'immersion ne présente qu'une augmentation de 8% par rapport à l'aspersion, avec une diminution de l'apport en hydroxyde de sodium de 75%. Nous pouvons en déduire que l'imprégnation de l'hydroxyde de sodium par immersion est plus recommandée dans le cas des deux biomasse lignocellulosique d'étude.

Tableau 23 : Récapitulatif des rendements globaux maximaux en sucres obtenus à la suite des différents procédés utilisés pour les deux matières d'étude

Matière lignocellulosique	Agent chimique	Mode d'imprégnation	Concentration (% massique)	Charge (%)	RGS (%)
Alfa	H_2SO_4	Aspersion	5	1,6	89,2
		Immersion	1	2,1	89,8
	NaOH	Aspersion	15	4,7	54,0
		Immersion	3	5,9	82,7
Chènevotte	H_2SO_4	Aspersion	15	4,7	82,6
		Immersion	0,6	2,0	97,1
	NaOH	Aspersion	40	12,5	68,6
		Immersion	0,8	3,1	74,5

4. EFFET D'AUTRES PARAMETRES SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA CHENEVOTTE

4.1 Effet de la granulométrie

Afin de déterminer l'impact de la granulométrie dans le procédé de bioconversion, ainsi que son interaction avec la concentration en catalyseur acide pendant l'étape de prétraitement, nous avons étudié l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte pour deux classes granulométriques, à savoir 0,8-1 mm et 1-8 mm, après prétraitement à différentes concentrations en H_2SO_4, imprégné par aspersion. La Figure 105 illustre les résultats obtenus.

Nous constatons que les concentrations libérées en sucres réducteurs par la chènevotte prétraitée à faibles concentrations en acide sulfurique (>5%) sont plus importantes dans le cas où les particules sont de petite taille (0,8-1mm). Au-delà d'une concentration de 5% en H_2SO_4, les concentrations en sucres libérés deviennent plus élevées dans le cas des échantillons de

chènevotte dont la taille de particules est comprise entre 1 et 8 mm. Des particules de petite taille présentent en générale une surface spécifique plus importante, de ce fait la réactivité vis-à-vis le traitement thermochimique et l'hydrolyse enzymatique est plus favorisée. Néanmoins, la concentration en sucres réducteurs la plus élevée est obtenus par la chènevotte dont la taille des particules est comprise entre 1 et 8mm et traité à 15% en acide sulfurique. Des études ont indiqué qu'une plus grande taille de particules pouvait être bénéfique pour le prétraitement par explosion à la vapeur. Cullis et al. (2004) ont prétraité du bois tendre (sapin de Douglas) et étudié l'effet de l'explosion à la vapeur catalysée par SO_2 sur trois différentes tailles de particules (<0,422 mm, 1,5×1,5 cm et 5×5 cm). Les résultats ont montré que la plus grande taille en particules a conservé le plus de fraction cellulosique et a produit moins de composés de dégradation. Les mêmes résultats ont été précédemment retrouvées par Ballesteros et al. (2000) en évaluant l'effet de la taille des particules (2-5, 5-8 et 8-12 mm) du bois tendre (Pin maritime) sur l'explosion à la vapeur. En revanche, les travaux de Maache-Rezzoug et al. (2011) ont démontré que dans le cas du prétraitement thermomécanique DIC en absence de catalyseur acide, une taille des particules de paille de blé comprise entre 50-600 µm est plus avantageuse en termes de production de glucose après hydrolyse enzymatique.

En bioraffinerie, l'utilisation de particule de taille plus large diminuera significativement la consommation énergétique, notamment exigée par l'opération du broyage. Par conséquent, la fraction granulométrique de 1-8mm a été sélectionnée pour la suite du travail.

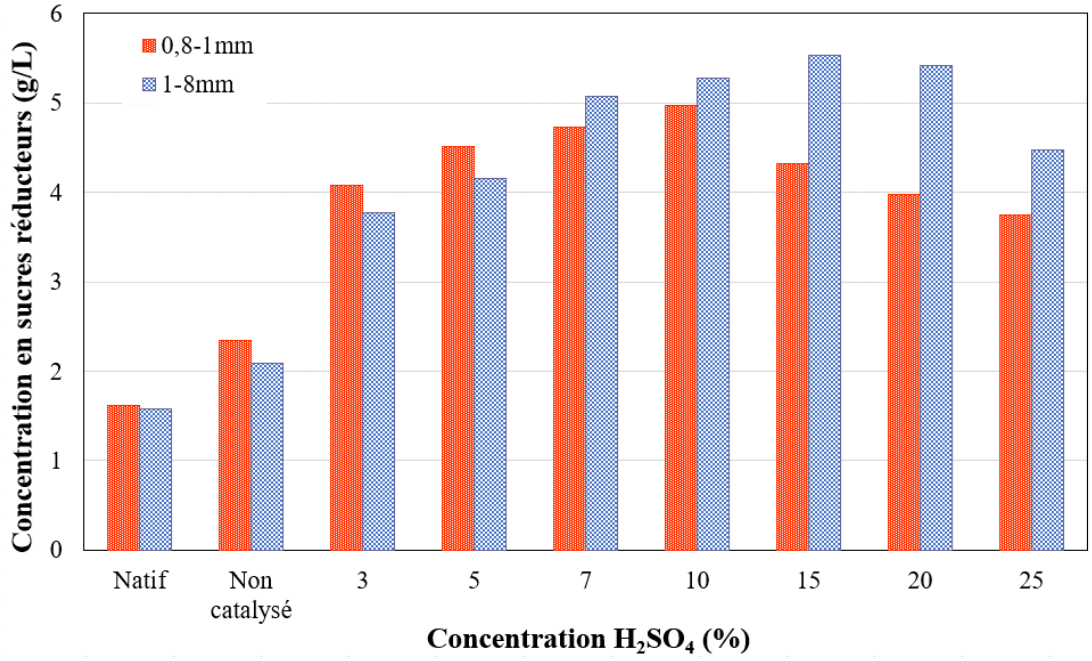


Figure 105 : Effet de l'interaction entre la granulométrie de la chènevotte et la concentration en acide sulfurique sur l'hydrolyse enzymatique

4.2 Effet de la teneur en eau en solution d'imprégnation

Le taux d'humidification du substrat est un paramètre qui joue un rôle important lors du phénomène d'imprégnation du catalyseur. En effet, la présence d'une solution aqueuse en quantité suffisante favorise la répartition du catalyseur au sein de la structure interne du substrat,

dont les pores s'imbibent rapidement par capillarité. La présence d'interactions électrostatiques et/ou chimiques des espèces en solution influence la cinétique de diffusion des ions catalyseurs au sein de la biomasse lignocellulosique. Il est connu qu'une concentration élevée en réactif favorise la diffusion des ions catalyseurs. Par ailleurs, lors du processus thermique de prétraitement, l'eau joue le rôle de caloporteur favorisant l'échange thermodynamique au sein du substrat.

Nous avons comparé précédemment les deux techniques d'imprégnation du substrat prétraité thermomécaniquement et les conséquences sur la bioconversion. La différence entre les deux méthodes se situe principalement au niveau de la teneur en eau atteinte par l'échantillon avant traitement thermique ; 40% et environ 400%, pour l'aspersion et l'immersion, respectivement. Les résultats ont montré que la concentration en sucres réducteurs libérés après hydrolyse enzymatique dépend aussi de la méthode d'imprégnation. Contrairement à la technique d'immersion, le maximum de sucres récupérés par aspersion a nécessité des conditions de traitement plus sévères.

Dans l'objectif d'améliorer l'opération d'imprégnation du catalyseur par aspersion, et donc de limiter les rejets chimiques, une étude sur l'augmentation du rapport volume de la solution chimique/substrat a été menée. L'intervalle de teneur en eau étudié a varié de 20 à 400%, valeur correspondant à la capacité d'absorption maximale de la chènevotte. Rappelant, que le chargement en agent chimique acide ou alcalin est maintenu fixe pour l'ensemble des essais, à savoir 2% dans le cas du traitement acide et 8% pour le traitement alcalin, ces niveaux choisis correspondent aux points expérimentaux ayant fournis la meilleure récupération en sucres en se basant sur les résultats précédemment présentés sur l'effet du chargement en agent chimique sur l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée.

La Figure 106 présente les concentrations en sucres réducteurs obtenues après hydrolyse enzymatique de la chènevotte prétraitée. Nous constatons que la libération des sucres réducteurs varie légèrement dans des niveaux de teneurs en eau allant de 20 à 50%, puis continue d'augmenter et enfin diminue à une teneur élevée en eau (440%). Le pic de concentration en sucres réducteurs libérés correspond à une teneur en eau de 220%. Ces constats montrent que quand la solution chimique est ajoutée à de faible quantité, la concentration en agent chimique est élevée et la répartition au niveau du substrat est modérée. Cependant, quand on augmente la teneur en eau pour le même chargement en agent chimique, la concentration de celui-ci baisse et dans le même temps nous avons une meilleure répartition de la solution chimique dans le substrat. Ce second cas se rapproche en effet aux conditions de l'immersion. Etant donné que le maximum de concentration en sucres observé correspond à une teneur en eau de l'ordre de 220% dans le cas des deux catalyseurs chimiques, nous avons retenu cette valeur pour effectuer l'étude d'optimisation.

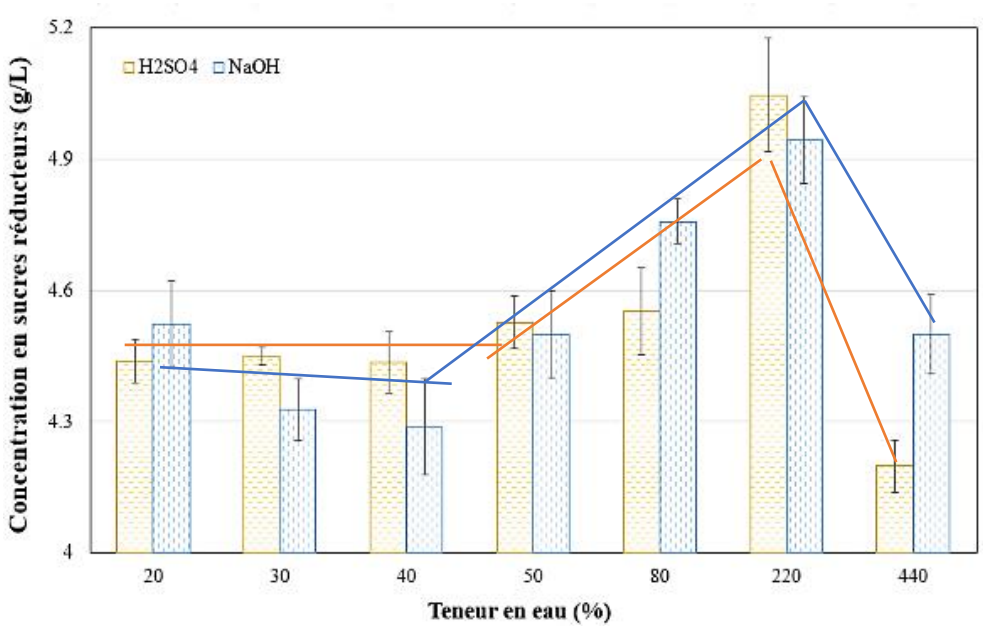


Figure 106 : Effet de la variation de la teneur en eau pendant le prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique

4.3 Effet de la détente vers le vide lors du traitement thermomécanique

Le procédé thermomécanique, utilisé pour le prétraitement de la matière lignocellulosique, se décompose de trois phases (comme décrit dans le paragraphe 6.2.5, chapitre 2) ; la phase de traitement thermique, à la vapeur d'eau sous pression pendant une certaine durée, est précédée d'une phase de mise sous pression réduite avant l'injection de la vapeur et suivie d'une phase de détente de la haute pression vers la même pression négative.

L'objectif de cette étude, menée sur deux variantes du procédé thermomécanique DIC, étant d'arriver principalement à découpler les effets liés à la présence de ces deux étapes, détente initiale et finale sur l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. L'intérêt de la mise sous vide de l'enceinte de traitement avant l'injection de la vapeur sous pression est de réduire la résistance de l'air. Cette réduction intensifie les phénomènes de transfert en facilitant la diffusion de la vapeur d'eau au sein du matériau, et par conséquent un chauffage plus rapide est obtenu, dû principalement à l'absorption de la chaleur latente de condensation. La détente finale provoque quant à elle un refroidissement rapide de la matière grâce au phénomène d'autovaporisation, qui produit un effet mécanique sur la matrice du substrat causant par cisaillement des déformations intenses et la formations d'une micro-alvéolation, observés sur les produits structurés. Il a été démontré que le prétraitement par le procédé thermomécanique DIC sur la paille de blé engendre une expansion de la structure fibreuse de la matière ; une structure plus ouverte avec un élargissement de la circonférences des alvéoles comparé à une structure compacte de la biomasse à l'état natif (Maache-Rezzoug et al., 2011).

Les trois variantes du procédé thermomécanique étudiées, se différencient par les modalités de mise sous vide à la pression de 50 mbars. Le procédé RP-HMT (Reduced-Pressurized-Heat Moisture Treatment) consiste à appliquer un vide initial et une détente finale vers la pression atmosphérique, le procédé DIC (Détente Instantanée Contrôlée) se caractérise par l'application

du vide avant et après le traitement thermique alors que le procédé DV-HMT (Direct vapor-Heat Moisture Treatment) se caractérisant par l'absence de ces deux modalités selon le schéma de principe de la Figure 107.

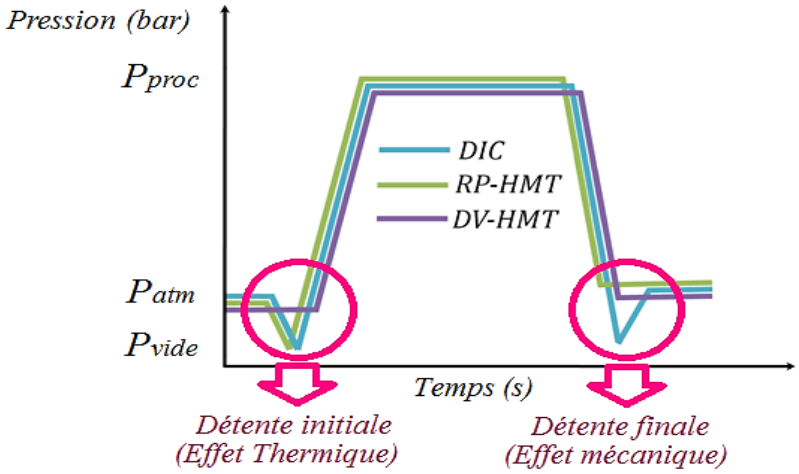


Figure 107 : Schéma de principe des traitements hydrothermique par DV-HMT, RP-HMT et DIC.

L'échantillon de chènevotte testé a été imprégné par aspersion par une solution d'acide à une concentration de 15%, concentration à laquelle nous avons obtenu une meilleure récupération en sucres réducteurs selon l'étude de l'effet du prétraitement acide par aspersion sur l'hydrolyse enzymatique de la chènevotte par la technique d'aspersion (40% en teneur en eau). Les concentrations en sucres réducteurs obtenus sont de 5,2 g/L, 5,1 g/L et 3 g/L correspondant à l'application de la DIC, RP-HMT et DV-HMT (Figure 108). Nous constatons alors que la DIC et le RP-HMT engendre presque le même taux de saccharification enzymatique comparativement au profil DV-HMT.

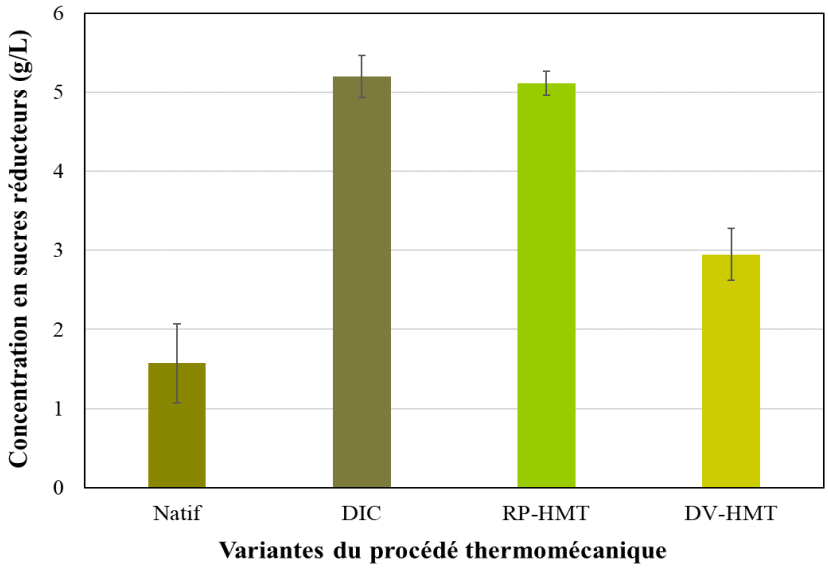


Figure 108 : Effet de la détente vers le vide pendant le prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique.

Nous pouvons en déduire que le vide initiale influence positivement le traitement thermomécanique, alors que le vide final semble ne pas avoir d'effet sur l'efficacité de la saccharification enzymatique. Dans ce sens, plusieurs détentes vers le vide ont été testé au cours du traitement (jusqu'à 5 détentes), nous avons constaté qu'il n'y a pas de variation significative au niveau de la production des sucres pendant la saccharification. Pourtant sur la paille nous avons observé des différences significatives. C'est surement dû à l'effet du substrat, étant donné que la structure de la chènevotte est apparentée à celle du bois, contrairement à la paille qui est un herbacé.

Les principaux paramètres qui contrôlent le traitement thermomécanique sont le niveau de la pression de la vapeur d'eau dans l'enceinte, la durée de traitement et la teneur en eau du produit. Bahrani, (2013) a étudié lors de ces travaux de thèse la variation de teneur en eau et de la température au cours de l'hydrotraitement par DV-HMT, et RP-HMT/DIC. Pour les trois procédés, le profil de température se composent de deux phases : la première très courte, débute par la température initiale du substrat et se termine lorsque celui-ci atteint la température d'équilibre de la vapeur saturée, intrinsèquement liée à la pression de vapeur. Durant cette phase, la quantité de chaleur apportée par la condensation de la vapeur d'eau, contribue à élever rapidement la température du matériau. La deuxième phase, isotherme se poursuit jusqu'à la fin de la durée fixée pour le traitement.

Les résultats ont montré que l'augmentation de la pression de traitement, de 1, 1,5 et 2 bars, contribue à réduire le temps nécessaire pour atteindre les températures d'équilibres (t_{eq}). Pour le procédé DV-HMT, t_{eq} a été de 480, 359 et 150 secondes, respectivement. Ces temps ont été divisés par un facteur de 10 environ (41, 33 et 20 secondes) pour les procédés RP-HMT/DIC. La différence entre ces procédés a été attribuée à l'accélération des échanges thermiques qui prédominent dans la phase initiale, grâce à la présence de l'étape de mise sous vide. Aussi, cette étape facilite la diffusion de la vapeur d'eau au sein du produit en réduisant la résistance de l'air, mais contribue également à générer une quantité de vapeur condensée plus importante (Bahrani et al., 2011). En effet, la quantité de matière occupée par l'air dans la chambre de traitement est remplacée par une quantité équivalente de vapeur d'eau.

5. OPTIMISATION DE LA BIOCONVERSION DE LA CHENEVOTTE PAR LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES

5.1 Optimisation des conditions de prétraitement

Une première étude d'optimisation par la méthode des plans d'expériences a été menée sur la chènevotte imprégnée par aspersion de H_2SO_4 ou NaOH (humidification à 40%). La concentration en catalyseur a varié de 1,3 à 4,7 % massique, la température de 133 à 165 °C et le temps de traitement de 4,8 à 60,2 min. Dans le cas des deux traitements, acide ou alcalin, l'analyse statistique des résultats a montré que la température et la durée de traitement ont eu un effet significatif sur les rendements en sucres réducteurs contrairement à la concentration en catalyseur dans ces conditions. Les valeurs du critère de sévérité calculées dans le cas du traitement acide, prouvent que les conditions appliquées étaient très modérées. En effet, les valeurs négatives obtenues (allant de -2,16 à -0,14) sont inférieures de celles rapportées dans la

littérature (Jang et al., 2016). Le rendement maximal a été de 51%, représentant 2,2 fois celui obtenu pour le substrat natif. Le choix du domaine de concentration s'est basé sur des travaux antérieurs de Maache-Rezzoug et al. (2015), dont les résultats ont montré l'effet positif de l'imprégnation de la paille de blé par l'acide sulfurique combiné au traitement thermomécanique DIC, sur la déstructuration de la matrice lignocellulosique et l'amélioration du rendement des sucres réducteurs récupérés après hydrolyse enzymatique. La chènevotte étant considérée comme du bois dur (Gandolfi et al., 2013b; Rehman et al., 2013), sa structure récalcitrante très différente de celle de la paille de blé, nécessite des concentrations en catalyseur plus élevées pour observer une altération significative de la matrice lignocellulosique.

Une nouvelle étude d'optimisation du prétraitement de la chènevotte en conditions acides ou alcalines a été alors réalisée, avec des chargements plus élevés en catalyseur à un taux d'humidification de 220%. Les concentrations ont varié de 0,6 à 4,4% massique pour l'acide sulfurique et de 0,4 à 7,4% massique pour l'hydroxyde de sodium. Le plan d'expériences à surface de réponse a permis de modéliser de manière empirique les rendements saccharidiques en relation avec les conditions appliquées et d'en déduire les conditions optimales.

5.1.1 Optimisation du prétraitement en conditions acides

Les résultats expérimentaux obtenus suite à l'application d'un plan d'expérience de type « central composite », ont permis de déterminer une relation empirique traduisant la réponse étudiée rendement global en sucres (RGS) en fonction des paramètres opératoires impliqués ; concentration en acide sulfurique (%) et temps de traitement (min). La matrice d'expériences avec les conditions expérimentales et le rendement global en sucres réducteurs (RGS) sont présentés dans le Tableau 24. Le calcul de la charge en catalyseur et du critère de sévérité CS sont également présentés. L'intervalle de variation de la charge en acide sulfurique varie de 1,37 à 9,43 (g H_2SO_4/100 g MS) et le temps de traitement de 5 à 60 minutes.

L'analyse de la variance montre l'effet de chaque facteur sur le paramètre réponse analysé. Les coefficients de régression ont été déterminés en se basant sur le test de Fisher (*F-ratio*) et la probabilité P (*P-value*) (Tableau 25). En se basant sur les valeurs de la p-value, la concentration en acide sulfurique et le temps de traitement ont un effet significatif sur le rendement en sucres réducteurs, avec un indice de confiance supérieur à 95 % ($p<0,05$). Il en est de même pour les deux influences quadratiques pour lesquelles les p-value tendent vers 0, ce qui traduit une influence statistiquement très significative.

Le modèle développé sous forme d'une équation polynomiale de second degré est donné respectivement en coordonnées courantes puis en coordonnées centrées réduites par les équations 38 et 39. Seuls les termes ayant un effet significatif sur la réponse seront inclus dans l'équation, les valeurs des variables sont spécifiées dans leurs unités d'origines. Le coefficient de corrélation (R^2) de 95,1% indique une bonne adéquation entre les valeurs prédites par le modèle avec les résultats expérimentaux.

$$RGS\ (\%) = 88,7 - 12,9\ C + 8,3\ t - 27,5\ C^2 - 3,7\ C^*\ t - 20,4\ t^2 \quad \text{Eq. 38}$$

$$RGS\ (\%) = 5,32 + 51,6\ C + 2,15\ t - 13,75\ C^2 - 0,09\ C^*\ t - 0,026\ t^2 \quad \text{Eq. 39}$$

Avec C la concentration en H_2SO_4 et t le temps de traitement.

Tableau 24 : Plan central composite à deux facteurs du prétraitement acide avec les valeurs codés, charge en acide, critère de sévérité et rendement globale en sucres calculés.

Essai	Conditions expérimentales		Charge en acide sulfurique (%)	CS	RGS (%)
	Concentration en H_2SO_4 (%)	Temps de traitement (min)			
1	1,2 (-1)	13,0 (-1)	2,52	0,36	70,2
2	3,9 (+1)	13,0 (-1)	8,19	1,16	60,8
3	1,2 (-1)	52,0 (+1)	2,53	1,00	76,3
4	3,9 (+1)	52,0 (+1)	8,53	1,80	59,5
5	0,6 (-α)	32,5 (0)	1,37	0,12	68,4
6	4,4 (+α)	32,5 (0)	9,43	1,71	50,2
7	2,5 (0)	5,0 (-α)	5,38	0,43	56,4
8	2,5 (0)	60,2 (+α)	5,39	1,50	76,4
9	2,5 (0)	32,5 (0)	5,36	1,28	89,3
10	2,5 (0)	32,5 (0)	5,39	1,28	87,5
11	2,5 (0)	32,5 (0)	5,42	1,27	90,7
12	2,5 (0)	32,5 (0)	5,62	1,26	87,4
Natif	-	-	-	-	23,4

Tableau 25 : Analyse de la variance présentant l'effet des deux variables sur le rendement global en sucres et les coefficients de régression du modèle statistique

Source	Somme des carrés	Ddl	Ratio-F	Valeur-p
Coefficient				
X_1	337,20	1	19,07	0,0047
X_2	136,82	1	7,74	0,0319
X_1^2	1210,0	1	68,43	0,0002
X_1X_2	13,69	1	0,77	0,412
X_2^2	665,85	1	37,66	0,0009
Erreur totale	106,09	6		
Total (corr.)	2173,83	11		
R^2	95,1			

X_1 : Concentration en acide sulfurique, X_2 : Temps de traitement

Le diagramme de Pareto standardisé (Figure 109, A) illustre les effets normalisés présentés dans un ordre décroissant avec un trait vertical correspondant à un indice de confiance de 95%. L'effet quadratique de l'acide sulfurique semble être le paramètre le plus important suivi par celui du temps de traitement, l'influence linéaire de l'acide sulfurique puis celle du temps. Aussi, l'interaction entre ces deux paramètres n'est pas significative. Le diagramme des effets séparés (Figure 109, B) montre l'influence de chaque paramètre sur la réponse étudiée, en gardant le second à son niveau central. Le tracé de gauche montre l'influence de la concentration en H_2SO_4 sur RGS pour un temps fixé à 32,5 minutes. Le tracé de droite montre l'influence du temps de traitement pour une concentration fixée à 2,5%. Les influences quadratiques de chaque paramètre sont clairement visibles. Nous constatons que la libération des sucres augmente avec l'augmentation des deux paramètres jusqu'à un maximum ; 2,5% pour la concentration en acide et 32,5 min pour le temps de traitement, au-delà de ces valeurs, les deux paramètres ont un effet négatif sur le rendement global en sucres. Cet effet est lié principalement aux phénomènes de dégradation des sucres libérés pendant le prétraitement et l'inhibition de l'hydrolyse enzymatique dans ces conditions assez sévères de prétraitement.

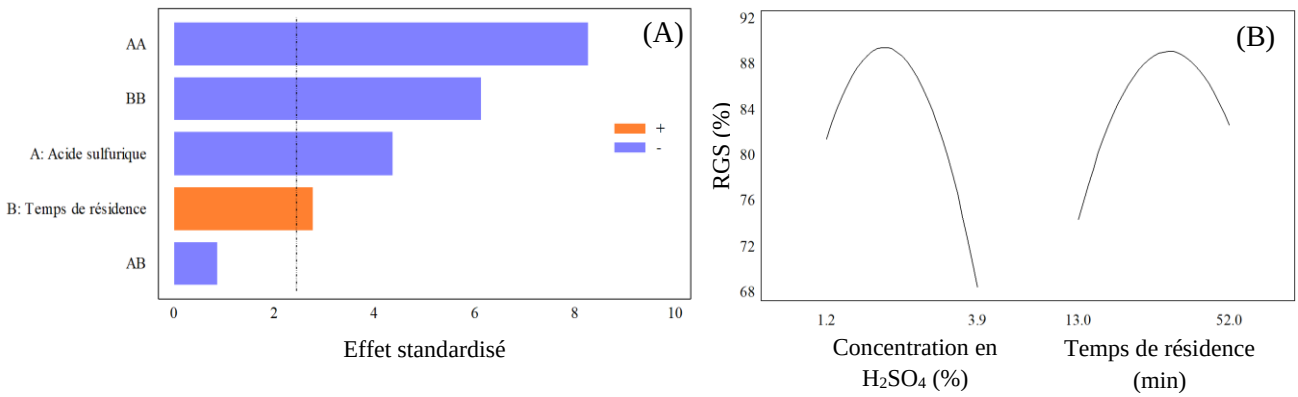


Figure 109 : Analyse par le diagramme de Pareto (A) et le diagramme des effets séparés (B) du rendement global en sucres réducteurs du prétraitement acide.

La Figure 110 illustre la surface de réponses correspondant aux effets combinés des deux variables opératoires. Cette surface de réponse est une projection des réponses fournies par le modèle mathématique dans l'ensemble du domaine expérimental défini par les niveaux « -1 » et « +1 » des deux paramètres. L'augmentation de la concentration en acide sulfurique et le temps de traitement améliore le rendement global en sucres jusqu'à une certaine valeur (environ 1,8 %) à partir de laquelle RGS diminue, quel que soit le temps de traitement probablement en raison de la dégradation des sucres. De la même façon, l'augmentation de RGS est visible jusqu'à un temps de 37 minutes à partir duquel il y a diminution et ce quelle que soit la concentration en acide sulfurique. En combinant l'ensemble des variations quadratiques, le modèle mathématique prévoit un optimum de 90% de RGS pour une concentration en H_2SO_4 de 1,75% et un temps de traitement de 37 minutes.

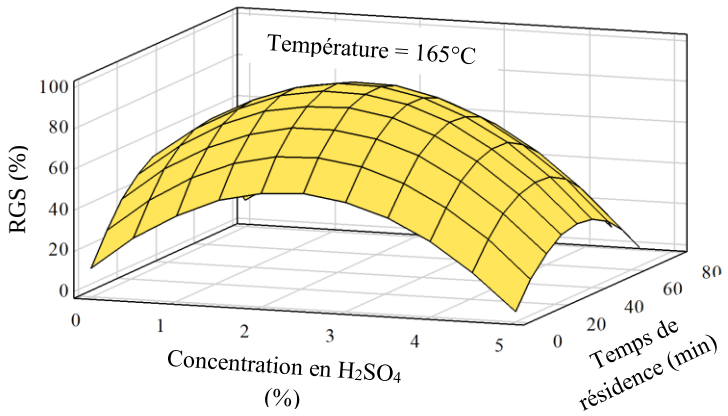


Figure 110 : Effet simultané de la concentration en acide sulfurique et du temps sur la réponse.

5.1.2 Optimisation du prétraitement en conditions alcalines

Pour le plan d'expériences effectué concernant le prétraitement alcalin, trois facteurs ont été étudiés : la concentration en NaOH (%), la température (°C) et le temps de traitement (min). Le domaine de température se situe entre 120 et 165 °C, celui du temps de prétraitement entre 4,8 à 60 minutes et celui de la concentration en NaOH de 0,4 à 7,4%, représentant une charge de de 0,8 à 15,9 g NaOH/100 g MS. Le plan composite centré a nécessité la réalisation de 18 points expérimentaux parmi lesquels 8 points pour le plan factoriel, 6 points axiaux et 4 points centraux. Ces points sont rassemblés dans le Tableau 26 dans lequel figure également la charge en hydroxyde de sodium calculée pour chaque point et le RGS obtenu après hydrolyse enzymatique.

D'après le tableau ANOVA (analyse de variance) il est clair que les trois paramètres ont statistiquement une influence significative sur RGS ($p<0,05$). On peut également relever que l'influence quadratique de la concentration en NaOH est également significative traduisant la présence d'un maximum à partir duquel RGS diminue. Le modèle empirique de bioconversion en conditions alcalines est donné par les équations 40 et 41, respectivement en coordonnées centrées réduites et en coordonnées courantes. La « p-value » du manque d'ajustement étant supérieure à 5%, on peut considérer celui-ci comme non significatif. De plus, la validité de ce modèle peut être appréciée avec son coefficient de corrélation qui est de 97%.

$$RGS\ (\%) = 73,83 + 8,80\ C + 3,53\ T + 13,92\ t - 12,09\ C^2 - 1,82\ C^*\ T - 3,17\ C^*\ t - 0,92\ T^2 - 1,56\ T^*\ t - 1,70\ t^2 \quad \text{Eq. 40}$$

$$RGS\ (\%) = -108,1 + 20,16\ C + 1,35\ T + 1,38\ t + 1,43\ C^2 - 0,04\ C^*\ T - 0,05\ C^*\ t - 0,003\ T^2 - 0,004\ T^*\ t - 0,003\ t^2 \quad \text{Eq. 41}$$

Avec C la concentration en NaOH, T la température et t le temps de traitement.

Tableau 26: Plan central composite à trois facteurs du prétraitement alcalin avec les valeurs codés, charge en hydroxyde de sodium et rendement globale en sucres calculés.

Essai	Conditions expérimentales			Charge en hydroxyde de sodium (%)	Rendement globale en sucres (%)
	Concentration en NaOH (%)	Température (°C)	Temps (min)		
1	1,8(-1)	134(-1)	16,0(-1)	3,9	49,3
2	5,9(+1)	134(-1)	16,0(-1)	12,9	63,5
3	1,8(-1)	158(+1)	16,0(-1)	3,9	58,7
4	5,9(+1)	158(+1)	16,0(-1)	12,9	67,3
5	1,8(-1)	134(-1)	49,0(+1)	3,9	67,2
6	5,9(+1)	134(-1)	49,0(+1)	12,9	73,1
7	1,8(-1)	158(+1)	49,0(+1)	3,9	71,5
8	5,9(+1)	158(+1)	49,0(+1)	12,9	75,7
9	0,4(-α)	148(0)	32,5(0)	0,8	49,6
10	7,4(+α)	148(0)	32,5(0)	15,9	65,8
11	3,9(0)	120(-α)	32,5(0)	8,4	72,3
12	3,9(0)	165(+α)	32,5(0)	8,4	74,7
13	3,9(0)	148(0)	4,8(-α)	8,4	58,6
14	3,9(0)	148(0)	60,2(+α)	8,4	86,2
15	3,9(0)	148(0)	32,5(0)	8,4	73,2
16	3,9(0)	148(0)	32,5(0)	8,4	75,8
17	3,9(0)	148(0)	32,5(0)	8,4	72,4
18	3,9(0)	148(0)	32,5(0)	8,4	73,6
Natif		-		-	23,4

Tableau 27 : Analyse de la variance présentant l'effet des trois variables sur le rendement global en sucres et les coefficients de régression du modèle statistique

Source	Somme des carrés	Ddl	Ratio-F	Valeur-p
Coefficient				
X_1	264,0	1	46,86	0,0001
X_2	42,65	1	7,51	0,0249
X_3	662,47	1	117,33	0,0000*
X_1^2	462,59	1	82,18	0,0000*
X_1X_2	6,66	1	1,21	0,3079
X_1X_3	20,16	1	3,63	0,0948
X_2^2	2,69	1	0,48	0,5084
X_2X_3	4,96	1	0,91	0,3749
X_3^2	9,14	1	1,63	0,2379
Erreur totale	44,94	8	-	-
R^2	97,04			

X_1 : Concentration en NaOH, X_2 : Température, X3 : Temps de résidence. *$p<0,0001$*

La Figure 111, A illustre les 9 effets normalisés possibles. Quatre influences peuvent être considérées comme ayant une influence significative sur le RGS avec un indice de confiance supérieur à 95 %. Par ordre décroissant : l'influence linéaire du temps de traitement, l'influence quadratique de la concentration en NaOH, puis suivent les influences linéaires de la concentration en NaOH et de la température. On peut noter que les trois interactions ne sont pas significatives.

Le diagramme des effets séparés (Figure 111, B) montre l'influence de chaque paramètre, les deux autres étant maintenus à leur niveau central « 0 ». Nous remarquons que l'augmentation du temps de traitement et de la température ont un effet positif sur le RGS. Cet effet est néanmoins plus important avec le temps pour lequel une augmentation du niveau « -1 » (16 min) au niveau « +1 » (49 min) induit une augmentation de 66% à 80 % alors qu'une même évolution au niveau de la température, c'est-à-dire avec une augmentation de 134 à 158 °C n'entraine une évolution de RGS que de 71,5 % à 75 %. Par ailleurs, l'influence quadratique est clairement visible avec un maximum de RGS de 74,7 % obtenu à environ 5% de concentration en NaOH. Au-delà de cette valeur, le rendement en sucres commence à diminuer, en raison principalement d'une inhibition de l'hydrolyse enzymatique.

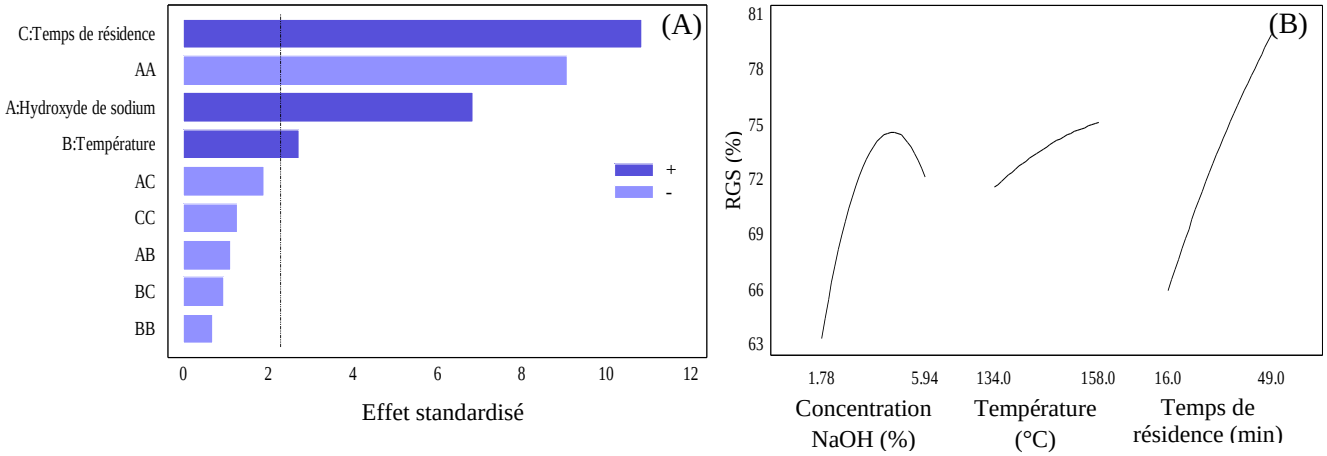


Figure 111 : Analyse par le diagramme de Pareto (a) et le diagramme des effets séparés (b) du rendement global en sucres réducteurs du prétraitement alcalin

La Figure 112 illustre les trois surfaces de réponses générées par les trois couples de paramètres. Dans chacune des surfaces, le 3ème paramètre est fixé à son niveau « 0 ». Sur les Figure 112a et Figure 112c, nous observons des courbures traduisant l'influence significative de la concentration en NaOH, alors qu'une surface plane est observée pour la surface de réponse Figure 112b traduisant le RGS en fonction de la température et du temps. Ces deux paramètres ayant une influence linéaire significative mais pas d'influence quadratique. Le modèle mathématique généré par cette étude prévoit un RGS optimum de 83,2 % dans les conditions suivantes : 4% en hydroxyde de sodium, une température de 150 °C et 60 minutes de temps de traitement.

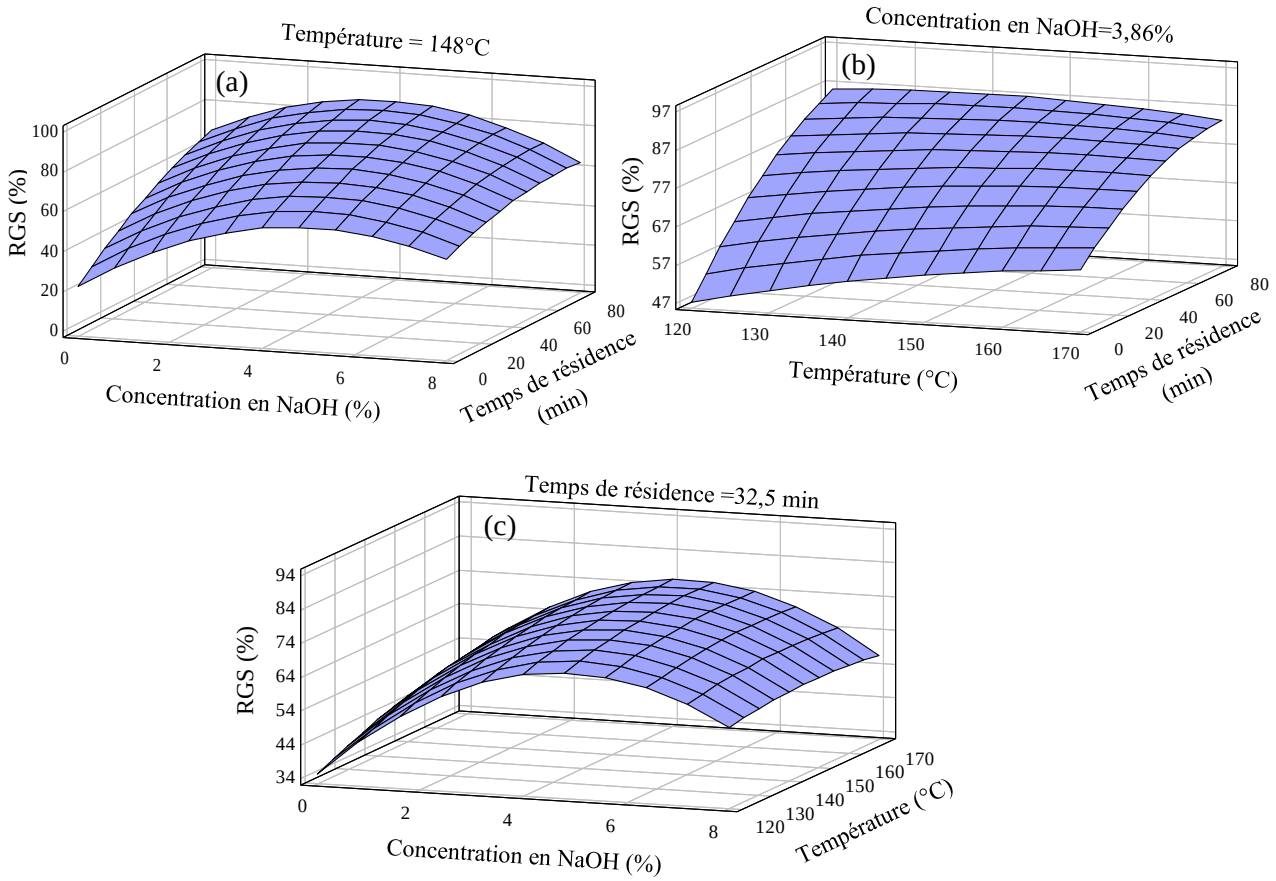


Figure 112 : Surfaces de réponses présentant simultanément l'effet de la concentration en hydroxyde de sodium, température et temps de résidence sur la réponse RGS. (a) RGS en fonction de la concentration et du temps de traitement ; (b) RGS en fonction de la température et du temps ; (c) RGS en fonction de la concentration en NaOH et de la température.

5.2 Optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique

Le développement du procédé de production de bioéthanol de deuxième génération étant actuellement au stade pilote, l'étape d'hydrolyse enzymatique fait l'objet de travaux d'optimisation visant la production d'hydrolysat assez riche en glucide tout en réduisant la consommation en enzymes. De nombreuses variables peuvent affecter la conversion de la cellulose par les enzymes, nous citons notamment : la structure du substrat, le cocktail enzymatique, les conditions de l'hydrolyse, etc.

Dans cette partie du travail de thèse, nous avons évalué l'impact de trois paramètres sur l'hydrolyse enzymatique, à savoir la concentration en enzymes, le rapport Solide/Liquide (S/L) et la vitesse d'agitation, sur l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique du substrat de chènevotte prétraité dans les conditions optimales par catalyseur acide sulfurique. En raison des concentrations élevées en enzymes et l'apport assez important en substrat utilisés, la durée de l'hydrolyse enzymatique a été prolongée à 48 h, ce qui permet d'assurer que la conversion cellulosique atteigne le plateau de saturation. La matrice expérimentale et le rendement en conversion cellulosique (RCC) analysé sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Plan central composite à trois facteurs avec leurs valeurs codés et le rendement en conversion cellulosique analysés.

Essai	Conditions expérimentales			Conversion cellulosique (%)
	Concentration en enzymes (%)	Rapport S/L (%)	Vitesse d'agitation (rpm)	
1	23(-1)	2,8(-1)	300(-1)	30,1
2	47(+1)	2,8(-1)	300(-1)	29,7
3	23(-1)	8,0(+1)	300(-1)	35,2
4	47(+1)	8,0(+1)	300(-1)	37,1
5	23(-1)	2,8(-1)	660(+1)	35,1
6	47(+1)	2,8(-1)	660(+1)	42,7
7	23(-1)	8,0(+1)	660(+1)	48,8
8	47(+1)	8,0(+1)	660(+1)	68,4
9	15(-α)	5,4(0)	480(0)	31,7
10	55(+α)	5,4(0)	480(0)	43,0
11	35(0)	1,0(-α)	480(0)	35,0
12	35(0)	10(+α)	480(0)	57,0
13	35(0)	5,4(0)	177(-α)	37,7
14	35(0)	5,4(0)	782(+α)	47,3
15	35(0)	5,4(0)	480(0)	38,6
16	35(0)	5,4(0)	480(0)	40,6
17	35(0)	5,4(0)	480(0)	38,0
18	35(0)	5,4(0)	480(0)	39,3
Natif		-		9,1

En se basant sur les probabilités du tableau ANOVA (Tableau 29), il est à affirmer que les trois paramètres ont une influence significative directe sur la conversion cellulosique ($p<0,05$). Les interactions concentration en enzymes/vitesse d'agitation et rapport solide-liquide/vitesse d'agitation ont également une influence significative. Le modèle empirique du second degré traduisant la conversion cellulosique en fonction des trois paramètres est donné par les équations 42 et 43, respectivement en coordonnées centrées réduites et en coordonnées courantes. Le coefficient de corrélation est de 93,5% traduisant une adéquation correcte entre les valeurs expérimentales et les valeurs prévues par le modèle mathématique.

RCC (%) = 62,78 - 0,29 E - 6,40 S/L - 0,08 V - 6,2.10-3 E2 + 5,7.10-2 E* S/L + 1,48.10-3 E* V + 0,32 (S/L)2 + 7,1.10-3 (S/L) * V + 2,85.10-5 V2 Eq. 42

RCC (%) = 39,18- 6,98 E + 13,02 S/L – 11,57 V - 1,78 E2 + 3,57 E*S/L + 6,42 E*V + 4,32 (S/L)2 + 6,73 (S/L) * V + 1,85 V2 Eq. 43

Avec E la concentration en enzymes, S/L le rapport solide/liquide et V la vitesse d'agitation.

Tableau 29 : Analyse de la variance présentant l'effet des trois variables sur la conversion cellulosique et les coefficients de régression du modèle statistique

Source	Somme des carrés	Ddl	Ratio-F	Valeur-p
Coefficient				
X_1	166,6	1	12,84	0,0071
X_2	580,88	1	44,76	0,0002
X_3	457,51	1	35,25	0,0003
X_1^2	10,21	1	0,79	0,4025
X_1X_2	25,56	1	1,97	0,1978
X_1X_3	82,56	1	6,36	0,0356
X_2^2	59,9691	1	4,62	0,0650
X_2X_3	90,45	1	6,97	0,0296
X_3^2	10,75	1	0,83	0,387
Erreur totale	103,82	8	12,95	-
Total (corr,)	1598,36	17	-	-
R^2	93,5			

X_1 : Concentration en enzymes, X_2 : Rapport S/L, X3 : Vitesse d'agitation

La Figure 113, illustre d'un côté les effets standardisés présentés dans un ordre d'influence décroissant et d'autre part l'influence des trois paramètres principaux séparément. Le trait vertical traduisant un degré de confiance de 95 % de confiance indique qu'il y a 5 parmi les neuf influences possibles qui sont significatives : les trois paramètres principaux et les interactions concentration en enzymes/vitesse d'agitation et rapport solide-liquide/vitesse d'agitation (Figure 113, a). L'influence linéaire et positive des trois paramètres est clairement visible sur la Figure 113b avec une importante augmentation de la conversion cellulosique en fonction du rapport S/L et de la vitesse d'agitation.

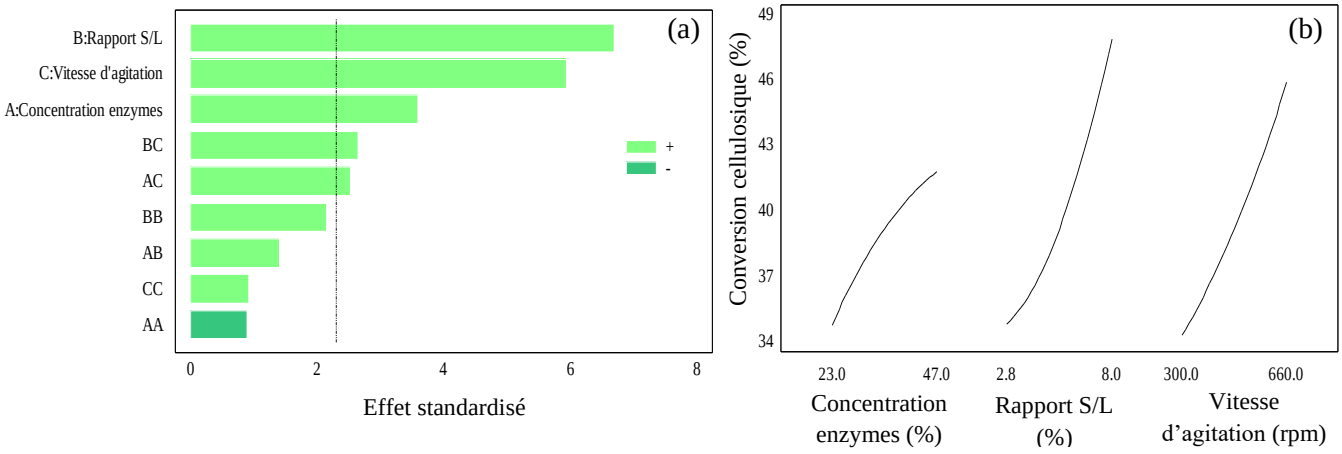


Figure 113 : Analyse par le diagramme de Pareto (a) et le diagramme des effets séparés (b) de la conversion cellulosique en hydrolyse enzymatique

La Figure 114 illustre les surfaces de réponses générées selon les trois couples facteurs. Pour chacune des figures le 3ème paramètre est maintenu à son niveau « 0 ». Nous pouvons visualiser sur cette figure les deux interactions significatives. L'interaction concentration en enzymes/vitesse d'agitation peut être visualisée sur la Figure 114b dans laquelle nous pouvons observer que pour des vitesses allant jusqu'à 400 rpm, RCC est dans un premier temps stable puis diminue lorsque la concentration en enzymes augmente alors qu'au-delà de 400 rpm, une augmentation continue de RCC en fonction de la concentration en enzymes est observée. L'interaction Rapport S/L/vitesse d'agitation peut être visualisée sur la Figure 114c. Pour les vitesses d'agitation les plus basses, une augmentation du rapport S/L n'engendre pas une hausse de RCC alors que pour des vitesses d'agitation élevées, une augmentation du rapport S/L entraine une augmentation franche de RCC. Ainsi, une augmentation de la concentration en enzymes améliore de manière très significative le RCC combiné à des valeurs élevées de la vitesse d'agitation et du rapport S/L. Le modèle mathématique prévoit une valeur maximale de 93 % pour une concentration en enzymes de 52 %, un rapport S/L de 9% et une vitesse d'agitation de 780 rpm. Il est à noter que des vitesses d'agitation élevées sont nécessaires lorsque le chargement en solide augmente, ce qui permet de compenser une viscosité élevée du milieu d'hydrolyse.

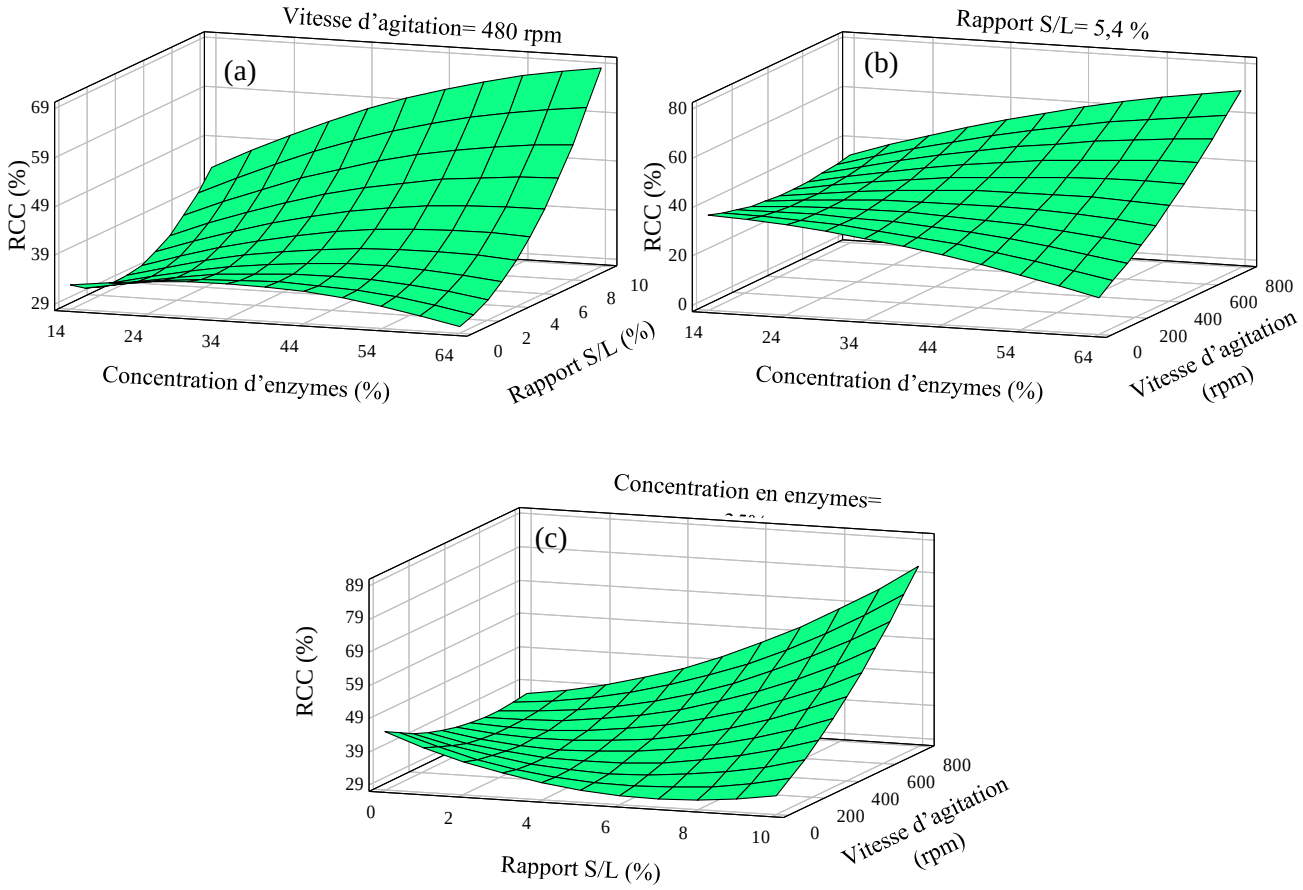


Figure 114 : Surfaces de réponses présentant simultanément l'effet de la concentration en enzymes, rapport S/L et vitesse d'agitation sur la réponse RCC. (a) RCC en fonction de la concentration en enzymes et le rapport S/L ; (b) RCC en fonction de la concentration en enzymes et la vitesse d'agitation ; (c) RCC en fonction du rapport S/L et la vitesse d'agitation.

Pour une bioconversion efficace du substrat lignocellulosique en éthanol, il est recommandé que l'hydrolysat obtenu après saccharification enzymatique contienne une forte concentration en sucres fermentescibles conduisant à un rendement élevé en éthanol. L'augmentation du chargement en biomasse dans la saccharification enzymatique est essentielle pour l'obtention des concentrations élevées en sucres qui, lors de la fermentation, donnent un rendement plus élevé en éthanol et minimise ainsi les coûts de distillation ultérieurs. Les coûts du traitement sont aussi réduits avec une diminution des besoins en eau.

6. ESSAIS DE FERMENTATION ALCOOLIQUE

La levure *saccharomyces cerevisiae* est un microorganisme très utilisé pour la conversion du glucose en éthanol. Le but de ces travaux est de tester la possibilité de fermentation de l'hydrolysat de la chènevotte prétraitée par cette souche qui présente de bons rendements de conversion des sucres glucose en éthanol sur des milieux de culture classiques. Des essais préliminaires ont été effectués sur du glucose standard, afin de déterminer les conditions favorables de croissance de la levure en présence de différentes concentrations en glucose et ainsi d'améliorer le rendement de la fermentation alcoolique. Ensuite un suivi de cinétique de fermentation des points optimaux précédemment obtenus par le prétraitement acide et alcalin est réalisé. Enfin, une comparaison des résultats de fermentation de différents hydrolysats est établie.

6.1 Essais préliminaires

Nous avons utilisé des préparations en glucose afin d'étudier l'effet de la concentration en glucose, le temps d'agitation, le temps de fermentation, le pH et la température sur la conversion du glucose en éthanol par le microorganisme *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus sont exprimés en termes de croissance de la levure et rendement en éthanol et présentés dans les Tableau 30Tableau 31. Les rendements sont calculés à base du rendement théorique maximum en éthanol de Gay Lussac qui est de 51,1 g d'éthanol par 100g de glucose.

Tableau 30 : Effet de la concentration en glucose, temps d'agitation et temps de fermentation sur le rendement en éthanol

Essai	Conditions expérimentales			Résultats expérimentaux			
	Concentration en glucose (g/L)	TA (h)	TF (h)	DO[a]	DO[b]	Concentration en éthanol (v/v)	Rendement en éthanol (%)
1	10	0	72	0,401	0,551	0,52	80,40
2	10	6	72	0,378	0,405	0,54	83,54
3	10	18	72	0,408	0,763	0,43	66,52
4	10	18	96	0,364	0,730	0,42	64,98
5	20	6	72	0,407	0,633	0,97	75,03
6	20	18	72	0,412	0,986	0,83	64,20
7	20	18	96	0,370	0,920	0,84	64,98

2% de levure, pH=5,5, T=25°C, Avec ajout du milieu YPD. TA : temps d'agitation, TF : temps de fermentation. DO : densité optique à 620 nm. [a] avant fermentation, [b] après fermentation

L'augmentation de la concentration initiale en glucose, présent dans le milieu de fermentation, de 10 à 20 g/L diminue visiblement le rendement en éthanol. Les mêmes remarques sont observées dans le cas de l'augmentation du temps d'agitation de 6 à 8h et du temps de fermentation de 72 à 96h. Néanmoins, une durée d'agitation de 6h semble améliorer légèrement le rendement en éthanol par rapport à l'essai effectué sans agitation (Tableau 30). Cela signifie que l'apport en oxygène est favorable en amont de l'opération de fermentation. L'oxygénation du milieu favorise effectivement la croissance des cellules de levure permettant d'obtenir une biomasse plus élevée qu'en anaérobie et favorisant ainsi par la suite une meilleure conversion des sucres en éthanol (Amillastre, 2012).

Le Tableau 31 montre l'effet de la concentration en levure, du pH et de la température sur le rendement en éthanol. Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en levure n'a pas d'effet significatif sur le rendement en éthanol, alors que l'augmentation du pH et de la température engendre une faible diminution du rendement en éthanol. Les conditions de fermentation favorables retenus sont alors : un ensemencement à 2% en levure, un pH de 5,5 et une température de 25°C.

Tableau 31 : Effet de la concentration en levure, pH et température sur le rendement en éthanol

Essai	Conditions expérimentales			Résultats expérimentaux			
	Concentration en levure (vol.)	pH	T(°C)	DO[a]	DO[b]	Concentration en éthanol (% vol.)	Rendement en éthanol (%)
1	2	6,5	25	0,429	0,402	0,49	75,8
2	2	5,5	30	0,443	0,366	0,53	82,0
3	2	5,5	25	0,129	0,518	0,54	83,5
4	5	5,5	25	0,192	0,481	0,55	85,1
5	10	5,5	25	0,332	0,416	0,55	85,1

DO : densité optique à 620 nm. [a] avant fermentation, [b] après fermentation

6.2 Fermentation des hydrolysats de la chènevotte

6.2.1 Effet de l'ajout des nutriments sur la fermentation de l'hydrolysat de chènevotte

Les essais de fermentation des hydrolysats de chènevotte sont basés sur les conditions favorables déterminés précédemment pour la fermentation alcoolique du glucose synthétique. Nous avons testé dans un premier temps l'effet de l'ajout de nutriments dans le milieu de fermentation sur le rendement en éthanol (Tableau 32). Les nutriments sont composés de Peptone pancréatique de viande, glucose, sulfate d'ammonium et l'extrait de levure. L'hydrolysat de chènevotte traitée à 0,6% en acide sulfurique imprégné par immersion a été alors choisi pour les essais. Les résultats montrent que l'ajout des nutriments améliore significativement le développement des cellules de levure. Cette croissance est corrélée positivement avec l'augmentation de la concentration en éthanol déterminée après fermentation. Nous constatons que, sans apport en nutriments, le rendement en éthanol est seulement de 15,5% en se basant sur la quantité initiale en glucose contenue dans l'hydrolysat.

Ce rendement a quasiment triplé (46,4%) dans l'essai de fermentation en présence de nutriments. L'apport en nutriments est donc bénéfique à la fermentation alcoolique des hydrolysats de chènevotte.

Tableau 32 : Effet de l'ajout des nutriments dans le milieu de fermentation de l'hydrolysat de la chènevotte

Essai	Nutriments	DO[a]	DO[b]	Concentration en alcool (% vol.)	Rendement en alcool (%)
1	Sans YPD	0,29	0,28	0,1	15,5%
2	Avec YPD	0,28	0,78	0,3	46,4%

DO : densité optique à 620 nm. [a] avant fermentation, [b] après fermentation

6.2.2 Suivi de la cinétique de fermentation des points optimaux

Les hydrolysats de la chènevotte prétraitée dans les conditions optimales de prétraitement acide et alcalin ont fait l'objet d'un suivi de la cinétique de fermentation alcoolique. Les rendements maximaux atteints après 24 h de fermentation sont respectivement de 54,2% et 46,4% pour les prétraitements en présence d'acide sulfurique et d'hydroxyde de sodium. Une légère diminution est observée après 24 h de fermentation (Figure 115).

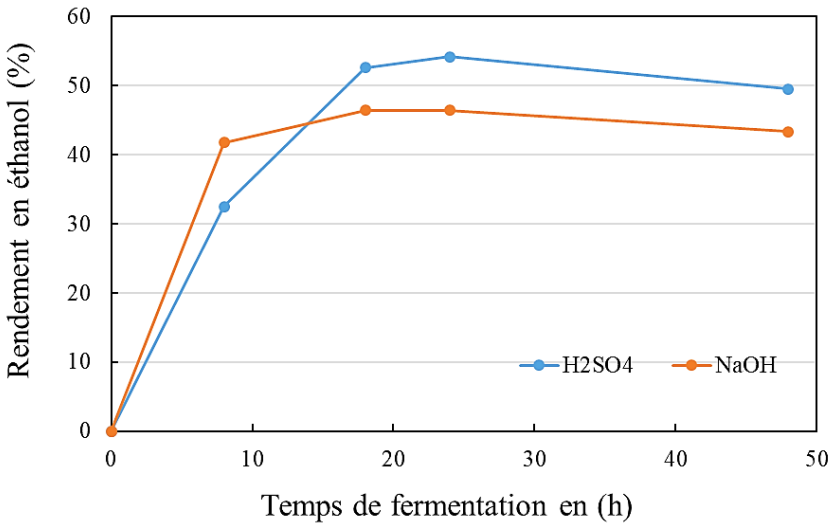


Figure 115 : Cinétique de la fermentation alcoolique

6.2.3 Comparaison du rendement en éthanol entre différents hydrolysats

Afin de comparer le rendement de fermentation alcoolique des hydrolysats de chènevotte issus du prétraitement dans différentes conditions, nous avons choisi un échantillon de chaque type de prétraitement ayant fourni la concentration la plus élevée en glucose. Avant fermentation, une étape de concentration du glucose jusqu'à une valeur de 10 g/L des hydrolysats a été effectuée. La Figure 116 affiche les rendements en éthanol obtenus calculés par rapport au rendement théorique (Gay Lussac 51,1 g d'éthanol par 100g de glucose).

D'une manière générale, nous constatons que les rendements en éthanol pour le prétraitement acide sont supérieurs à ceux du prétraitement alcalin quel que soit la technique d'imprégnation de l'agent chimique. En comparant les deux techniques aspersion et immersion, dans le cas du prétraitement acide, les rendements en éthanol semblent quasiment similaires, alors que dans le cas du traitement alcalin, la technique d'immersion fournit un rendement en éthanol plus élevé. En effet, la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae* pourrait être inhibée par la présence des composés de dégradation de la matière lignocellulosique susceptibles d'être présents dans le milieu de fermentation. Ces inhibiteurs sont le furfural et le HMF provenant de la dégradation du glucose et du xylose lors du prétraitement acide. La concentration mesurée du furfural pour l'essai à 20% de H_2SO_4 par aspersion est de 3,46 mg/l, alors que celle pour l'essai à 0,6% de H_2SO_4 par immersion est de 1,6 mg/L. Pour le HMF, la concentration mesurée à l'essai à 20% de H_2SO_4 par aspersion est de 46,4 mg/l, alors que celle de l'essai à 0,6% de H_2SO_4 par immersion est de 27 mg/L. Vu que les rendements obtenus par les deux techniques en conditions acides semblent quasiment similaires, nous pouvons conclure qu'à ces niveaux de concentrations, l'inhibition par ces composés n'est pas significative. Il a été démontré par Chen and Fu, (2016) que le furfural à faible concentration (jusqu'à 1,2 g/L) n'affectait pas la croissance des cellules de *Saccharomyces cerevisiae.* En revanche, des concentrations plus élevées peuvent engendrer une diminution de la croissance des cellules, augmentation de la phase latente et diminution de la conversion cellulosique en éthanol (Chen and Fu, 2016). Dans les conditions appliquées, les analyses des produits de dégradation des sucres ont montré que le prétraitement alcalin semble ne pas engendrer de production fr furfural et HMF, étant donné que leurs concentrations n'ont pas été détectés. Néanmoins, la production des composés phénoliques provenant de la dégradation de la lignine peut se produire pendant ce type de prétraitement, favorisée par les pH alcalins. Ce qui pourrait expliquer les rendements en éthanol obtenus moins élevés comparés à un prétraitement acide (Figure 116).

Nous pouvons conclure que le traitement alcalin de la chènevotte à basses concentrations par immersion a fourni un rendement plus élevé que celui obtenu par le traitement par aspersion à concentration plus élevée. Par-ailleurs, le traitement de la chènevotte dans les conditions optimales par aspersion avec une teneur en eau élevée, à savoir 220%, a permis d'obtenir le maximum de rendement ; 54,1 et 46,4% en conditions acides et alcalines, respectivement. Notons que les concentrations en éthanol restent relativement faibles, nécessitant ainsi une opération de distillation. Après récupération de l'éthanol, la matière résiduelle composés majoritairement de lignine, cendres, enzymes et d'autres composants peut être condensée, séchée pour servir comme combustible en vue d'alimenter le procédé, ou convertie en divers co-produits.

Il existe plusieurs facteurs pouvant être à l'origine de la diminution de la fermentation alcoolique, certains sont liés au procédé de prétraitement. En effet, un lavage du substrat prétraité et une détoxification de l'hydrolysat sont recommandés afin d'éliminer les substances chimiques résiduelles pouvant nuire à la croissance des microorganismes pendant la fermentation (Toquero et Bolado, 2014; Zabed et al., 2016). Toquero et Bolado, (2014) ont rapporté que l'augmentation du rendement en éthanol est attribuée à l'élimination des inhibiteurs par le lavage ainsi qu'à la disponibilité initiale de sucres dans l'hydrolysat.

Cependant, une partie des sucres solubilisés pendant le prétraitement sont aussi éliminés par le lavage, diminuant ainsi le rendement global en sucres récupérés. D'un point de vue économique et environnemental, ces techniques présentent également un impact non négligeable sur le procédé de bioconversion.

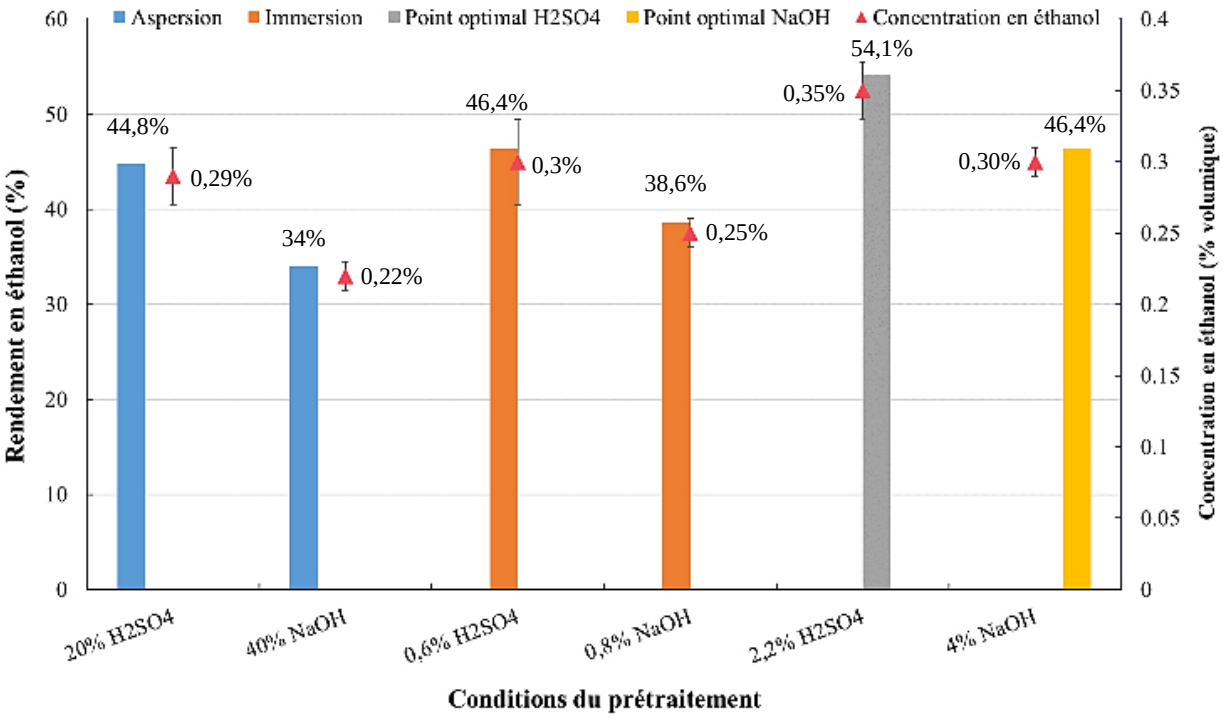


Figure 116 : Rendements de Gay-Lussac et concentrations finales en éthanol après 24 h de fermentation.

D'autres facteurs contribuant à la diminution de la fermentation alcoolique sont liés au procédé de fermentation. Les microorganismes naturels manifestent certaines limitations ; telle que la tolérance vis-à-vis des composés inhibiteurs et de l'éthanol, ou la faible capacité de fermentation des pentoses comme le xylose. Les recherches d'ingénierie sur les microorganismes tentent de modifier les comportements et les fonctions génétiques afin d'améliorer la fermentation alcoolique (Zabed et al., 2016).

7. CONCLUSION

Ce chapitre consacré à l'étude de l'effet du prétraitement thermomécanique, en conditions acides et alcalines, sur les performances de l'opération d'hydrolyse enzymatique, a permis d'établir des liens de corrélation entre la concentration en sucres réducteurs libérés avec, d'une part, les conditions appliquées lors du prétraitement, et d'autres part, avec les modifications produites au sein de la structure des deux substrats prétraités (la chènevotte et l'alfa).

En ce qui concerne le prétraitement de la chènevotte en conditions acides et quelle que soit la technique d'imprégnation, les résultats ont montré une nette amélioration des concentrations en

sucres réducteurs récupérés après hydrolyse enzymatique, par comparaison avec l'échantillons natif et celui prétraité sans imprégnation. En revanche, pour atteindre le maximum de sucres libérés, la technique d'aspersion a mobilisé des concentrations importantes en acide sulfurique, traduites par des valeurs élevées du facteur combiné de sévérité (CS). Pour cette technique, une partie de l'acide utilisé a été neutralisée par la matière minérale contenue dans la chènevotte. Aussi, la concentration en sucres réducteurs libérés a été corrélée positivement avec le critère CS, la surface spécifique et le taux de réduction en hémicelluloses jusqu'à un certain niveau de sévérité. Au-delà, une chute des concentrations en sucres a été constatée, révélant probablement la présence des réactions de dégradation des sucres au cours du prétraitement ou l'apparition des phénomènes d'inhibition lors de l'hydrolyse enzymatique. Par ailleurs, lors du prétraitement en conditions acides de l'alfa qui est un substrat de type herbacé, les demandes en acide pour atteindre le maximum en sucres réducteurs libérés ont été plus faibles que celles manifestées dans le cas du prétraitement de la chènevotte, qui est considérée comme un bois dur. La différence entre les deux substrats est due à la teneur initiale élevée en groupements acétyles de l'alfa, lui permettant de libérer d'avantage d'acide pendant le traitement hydrothermique, et à sa faible teneur en matière minérale.

Aussi, les conditions alcalines combinées au prétraitement thermomécanique ont contribué à améliorer la quantité de sucres libérés à partir de la chènevotte en comparaison aux substrats natif et celui traité sans agent chimique. En revanche, les concentrations obtenues ont été légèrement en deçà de ceux du traitement en conditions acides. Des liens ont été faits entre la charge appliquée de NaOH lors du prétraitement et la réduction du taux de lignine, avec la variation de la concentration en sucres libérés. On peut relever un léger avantage pour les substrats imprégnés par immersion par rapport à ceux obtenus par aspersion. Cette différence est certainement liée à la répartition plus homogène et au contact plus important entre le substrat et la solution d'imprégnation vu les quantités disponibles à l'inverse de la technique par aspersion. En effet, les conditions d'immersion permettent au substrat d'atteindre le maximum d'absorption d'eau avant le traitement thermomécanique. Quant au prétraitement de l'alfa en conditions alcalines, la concentration la plus importante en sucres récupérés a été obtenue par l'imprégnation par immersion. Ce qui nous amène aux mêmes conclusions que celles données précédemment.

Dans l'objectif d'une amélioration de l'étape d'hydrolyse enzymatique, d'autres champs d'investigations ont été explorés à travers l'étude de paramètres susceptibles d'influencer l'efficacité de l'étape de prétraitement, à savoir la taille granulométrique du substrat, sa teneur en eau ainsi que les modalités du cycle du procédé de traitement thermomécanique. La méthode des plans d'expériences a été utilisée afin d'optimiser les conditions opératoires du prétraitement en conditions acides et alcalines de la chènevotte, conditions qui permettent d'obtenir les rendements les plus élevés en sucres récupérés après hydrolyse enzymatique. Pour cette étude l'imprégnation du catalyseur par aspersion à une teneur en eau plus élevée (220%) a visiblement montré des améliorations au niveau de rendement en sucres récupérés.

Dans le cas du prétraitement en conditions acides, l'optimisation de la concentration en H_2S0_4 et du temps de traitement a permis d'atteindre un rendement optimal de 90% en sucres

réducteurs. Alors que dans le cas du prétraitement en conditions alcalines, le rendement global en sucres réducteurs atteint 83,2%, après optimisation de la concentration en NaOH, de la température et du temps de traitement. Ces résultats montrent le potentiel du prétraitement par aspersion à haute humification combiné au traitement thermomécanique dans la bioconversion de la chènevotte. Les conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique ont été également optimisées, à l'aide de la méthode des plans d'expériences, en vue d'augmenter les niveaux de concentration en sucres avant l'étape de fermentation. Des teneurs importantes en sucres libérées permettent d'atteindre des concentrations élevées en éthanol contribuant ainsi à conforter le potentiel intéressant du procédé de prétraitement.

Les essais de fermentation sur les hydrolysats de chènevotte ayant atteints le maximum de concentration en glucose et prétraitée dans le cas de l'acide sulfurique ont abouti à des rendements en éthanol presque similaires en comparant l'aspersion et l'immersion, en revanche, dans le cas de l'hydroxyde de sodium, une augmentation d'environ 11% par rapport à l'aspersion a été obtenue pour l'immersion. Les hydrolysats de chènevotte prétraitée dans les conditions optimales de prétraitement ont permis d'obtenir le maximum de rendement ; 54,1 et 46,4% en conditions acides et alcalines, respectivement. Notons que les concentrations en éthanol restent relativement faibles, nécessitant ainsi une opération de distillation.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont permis de contribuer dans le développement et l'optimisation des procédés de bioconversion de la biomasse en bioéthanol pour répondre aux problématiques liées à l'énergie et l'environnement. Le procédé développé dans le cadre de ces travaux s'intègre dans un processus de transformation de la biomasse lignocellulosique par voie biochimique, réparti principalement en quatre étapes ; prétraitement, hydrolyse enzymatique, fermentation et séparation. Nos travaux se sont focalisés particulièrement sur l'étude du procédé de prétraitement thermomécanique « DIC » combiné à un catalyseur chimique. L'effet de l'ajout de l'acide sulfurique et de l'hydroxyde de sodium a été étudié, et les performances de la technique d'aspersion ont été comparées à ceux de l'immersion. Dans une optique de diversification, deux matières lignocellulosiques ont été choisies, l'alfa, plante de type herbacé et le chanvre industriel de type ligneuse. Ces deux biomasses présentent à la fois une ressource importante en matière lignocellulosique et un caractère endémique pour l'alfa, et enfin la possibilité de convertir l'utilisation de la culture du chanvre au Maroc vers une culture énergétique participant au développement rural.

Les résultats des analyses de la composition chimique menées sur ces deux biomasses ont montré quelques différences au niveau des teneurs en composants pariétaux ; la chènevotte a une fraction plus importante en lignine alors que l'alfa a une fraction plus importante en hémicelluloses. Aussi, une teneur d'environ 73% en holocellulose a été déterminé chez les deux matières confirmant l'intérêt de leur utilisation comme ressources potentielles pour la bioconversion. Les résultats de la caractérisation structurale, texturale, morphologique et de composition chimique ont permis de suivre les modifications induites au sein de la structure interne de la biomasse après son prétraitement. En effet, l'étude du prétraitement s'est orientée principalement sur la mise en évidences des modifications physico-chimiques produites au sein du substrat prétraité en tenant compte de la variation des conditions opératoires. L'hydrolyse enzymatique a permis par la suite d'évaluer l'efficacité du prétraitement appliqué dans l'intensification de la saccharification en mettant l'accent sur les liens existants entre les paramètres du prétraitement et la réponse de réaction d'hydrolyse.

Les résultats de la caractérisation des deux substrats après prétraitement thermomécanique combiné à l'imprégnation par l'acide sulfurique ont montré des changements importants dans la composition de la biomasse prétraitée par comparaison aux échantillons natifs ; la réduction de la teneur en hémicelluloses a atteint 48%, 50% et 50% pour la chènevotte imprégnée par H_2SO_4, à des concentrations de 20%, 3% et 5% par aspersion et immersion pendant 10 et 30 min, respectivement. Alors que pour l'alfa, la réduction en proportion d'hémicelluloses a été plus élevée ; de 68% et 76% obtenue à des concentrations en H_2SO_4 de 15% et 3% imprégné par aspersion et immersion, respectivement. Les proportions en lignine des deux matières ont relativement diminué pour les fortes concentrations en acide sulfurique. Le maximum de réduction atteint pour la chènevotte était de 54%, 70%, 74% obtenu pour un prétraitement en présence de 50%, 10% et 10% d'acide sulfurique imprégné par aspersion, l'immersion à 10 et 30 min, respectivement. La réduction de la lignine après prétraitement de l'alfa a atteint 31% et

28% à des concentrations en acide sulfurique de 15% et 3% pour l'aspersion et l'immersion, respectivement.

Les modifications produites au niveau de la structure lignocellulosique ont contribué à améliorer la surface spécifique des deux substrats prétraités. La surface spécifique a augmenté au fur et à mesure de la solubilisation des hémicelluloses et de l'élimination de la lignine, ce qui a contribué à l'amélioration de l'accessibilité des enzymes cellulases aux sites actifs de la cellulose. Des observations par microscopie électronique à balayage ont permis de visualiser ces modifications par l'apparition d'une microstructure ouverte et poreuse en fonction des conditions du prétraitement acide pour les deux substrats hydrotraités. Les analyses de la structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont confirmé les résultats d'analyse de la composition chimique en termes de réduction des proportions des fractions des hémicelluloses et lignine, et ont également montré que le prétraitement en milieu acide des deux biomasses a provoqué une augmentation de leurs cristallinités. En effet, les résultats de l'analyse par diffraction des rayons X ont montré pour certaines conditions, un accroissement de la cristallinité de la structure due à l'élimination des fractions amorphes des hémicelluloses du substrat lignocellulosique.

Le prétraitement thermomécanique a provoqué une nette amélioration des concentrations en sucres réducteurs récupérés après hydrolyse enzymatique des deux substrats prétraités quel que soit la technique d'imprégnation, comparativement aux échantillons natif et prétraité sans imprégnation de catalyseur. Les analyses par chromatographie liquide à haute performance ont permis de mettre en évidence la présence des molécules de glucose et xylose dans l'hydrolysat. En ce qui concerne le glucose libéré, les concentrations maximales ont quasiment triplé par rapport à celle obtenue à partir de l'échantillon natif des deux substrats. Les concentrations maximales en glucose ont été obtenues en présence d'une concentration de H_2SO_4 imprégné par respectivement aspersion et immersion de 15 et 0,6% dans le cas de la chènevotte et de 7 et 1% dans le cas de l'alfa.

Etant donné les faibles quantités de solution répartie par aspersion à travers le substrat et la neutralisation d'une partie de l'acide imprégnée par cette technique par la matière minérale contenue dans la chènevotte, les concentrations en réactif chimique sont importantes, ce qui se traduit par des valeurs élevées du critère de sévérité (CS). La concentration en sucres réducteurs libérés a été corrélée positivement avec les valeurs de CS, de la surface spécifique et du taux de réduction en hémicellulose jusqu'à un certain niveau de sévérité. Au-delà de ce niveau, une chute des concentrations en sucres a été constatée, révélant probablement que des réactions de dégradation de sucres ont eu lieu pendant le prétraitement et/ou l'apparition de phénomènes d'inhibition lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique.

Lors du prétraitement en conditions acides de l'alfa, les demandes en acide pour atteindre le maximum en sucres réducteurs ont été plus faibles par comparaison à celles de la chènevotte. Cela est lié non seulement au fait que l'alfa est composé d'une fraction en hémicelluloses plus élevée, conduisant à la libération des acides acétiques pendant le traitement hydrothermique,

mais aussi à une neutralisation moindre de l'acide sulfurique. Il est à souligner que cet effet de neutralisation est beaucoup moins marqué lorsque le substrat est imprégné par immersion.

En ce qui concerne le prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium, les résultats de caractérisation des deux substrats prétraités ont aussi montré des modifications au niveau des fractions en hémicelluloses et en lignine. La réduction maximale des hémicelluloses a été de 35%, 38% et 40% pour la chènevotte imprégnée par une solution en NaOH à la concentration de 30%, 3% et 3% par aspersion, immersion à 10 et 30 min, respectivement. Pour ces mêmes conditions, l'élimination de la lignine a été de 44%, 62% et 67%. En ce qui concerne le prétraitement à l'hydroxyde de sodium de l'alfa, les résultats ont montré des diminutions maximales en hémicelluloses de 72% et 73% et en lignine de 75% et 80%, pour respectivement 15% et 3% de charge en NaOH imprégnée par aspersion et immersion. Ces résultats suggèrent que l'effet de la technique d'imprégnation est significatif dans le cas du traitement en conditions alcalines que celui en conditions acides. Des observations par microscopie électronique à balayage ont permis de montrer l'effet des conditions du prétraitement thermomécanique combiné à l'hydroxyde de sodium sur l'altération de la microstructure des deux substrats. Les analyses de la structure par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en plus de ceux effectués par diffraction des rayons X ont montré que pour les deux biomasses, le prétraitement en milieu alcalin permet l'élimination des hémicelluloses et de la lignine contribuant à la diminution de la cristallinité du substrat.

Les conditions alcalines combinées au prétraitement thermomécanique ont également permis d'améliorer la quantité de sucres libérés à partir de la chènevotte et l'alfa en comparaison aux substrats natif et sans catalyseur. La charge en NaOH appliquée lors du prétraitement est positivement corrélée à la réduction du taux de lignine, mais aussi à la concentration des sucres réducteurs libérés. Le maximum de concentration en glucose a doublé et triplé pour l'aspersion et l'immersion respectivement, comparée à celle obtenu par l'échantillon natif pour les deux matières étudiées. Les concentrations maximales en glucose ont été obtenues après application d'une charge en NaOH par respectivement aspersion et immersion de 7,8 et 4% dans le cas de la chènevotte et de 4,7 et 5,9% dans le cas de l'alfa. Ces résultats suggèrent que dans le cas du prétraitement en milieu alcalin, l'imprégnation du réactif en présence de quantité importante en eau favorise plus les réactions de déstructuration de la biomasse lignocellulosique et parait plus bénéfique pour l'hydrolyse enzymatique.

L'effet des conditions du prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique a été explorer davantage en étudiant la taille granulométrique du substrat, sa teneur en eau ainsi que les modalités du cycle du procédé de traitement thermomécanique. Une fraction granulométrique de 1-8 mm, une teneur en eau de 220% et un profil du traitement thermomécanique intégrant un vide initial et final ont abouti aux meilleurs résultats au niveau de l'hydrolyse enzymatique et par la suite choisis pour le travail d'optimisation éventuel.

Dans l'objectif d'obtenir des rendements saccharidiques élevés après hydrolyse enzymatique, la méthode des plans d'expériences a été utilisée pour optimiser les conditions opératoires du prétraitement de la chènevotte en présence des deux agents chimiques (acide et alcalin)

imprégnés par aspersion à une teneur en eau de 220%. Dans le cas du prétraitement en conditions acides, l'optimisation de la concentration en H_2S0_4 et du temps de traitement a permis d'atteindre un rendement optimal de 90% en sucres réducteurs, alors qu'en conditions alcalines, le rendement optimal en sucres réducteurs obtenu est de 83,2%. Ces résultats prouvent le potentiel du procédé de bioconversion développé dans le cadre de cette thèse.

La méthode des plans d'expériences a également été utilisée pour optimiser les conditions de la réaction d'hydrolyse enzymatique dans l'objectif d'augmenter les niveaux de concentration en sucres avant l'étape de fermentation.

La fermentation de divers hydrolysats de chènevotte ayant fourni des concentrations maximales en glucose a engendré la production d'éthanol à des niveaux plus ou moins différents. Les hydrolysats de chènevotte prétraitée par traitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique ont produit des rendements en éthanol presque identiques pour l'aspersion et l'immersion. En revanche dans le cas du prétraitement en présence d'hydroxyde de sodium, le rendement en éthanol a été légèrement plus élevé dans le cas de l'immersion que l'aspersion. Dans le cas des échantillons traités dans les conditions optimales de prétraitement, nous avons atteint les rendements en éthanol les plus élevés ; 54,1 et 46,4% en conditions acides et alcalines, respectivement. En revanche, il parait judicieux de procédé à une étape de concentration de l'éthanol obtenu notamment par distillation afin d'élaborer un produit similaire au carburant.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse fournit une base de compréhension des liens qui existent entres les paramètres opératoires du prétraitement, les modifications produites au sein de la biomasse lignocellulosique prétraitée ainsi que leurs effets sur la saccharification des polymères cellulosiques lors de l'hydrolyse enzymatique. Un certain nombre de perspectives peuvent être dégagés permettant l'amélioration de la compréhension des corrélations qui gouvernent le schéma du procédé de bioconversion.

Il serait intéressant de :

- → Compléter ce travail par une étude d'analyse des composés phénoliques provenant de la dégradation de la lignine pendant le prétraitement ainsi que leur effet sur l'opération de fermentation.
- → Approfondir les connaissances concernant les liens qui existent entre l'adsorption des enzymes et les caractéristiques du substrat prétraité serait une continuité du travail de l'hydrolyse enzymatique réalisé.
- → Aussi, il serait intéressant d'explorer les pistes d'intégration de la fermentation des sucres xylose provenant de la fraction hémicellulosique afin d'améliorer le rendement en éthanol.
- → Valoriser l'éthanol par reformage catalytique en hydrogène en formulant et caractérisant des catalyseurs.
- → Développer une étude technico-économique de l'installation du procédé de prétraitement thermomécanique combiné à l'acide sulfurique ou l'hydroxyde de

sodium imprégné par aspersion, avec une étude complémentaire sur la rentabilité et l'impact écologique.

→ Exploiter les résultats obtenus à l'échelle laboratoire pour les transférer à l'échelle pilote, et résoudre les difficultés liées au changement d'échelle.

Enfin, en tenant compte de la complexité structurale du substrat lignocellulosique, il serait judicieux d'approfondir l'expérimentation au niveau des réactions chimiques qui ont lieu pendant le prétraitement en aval du procédé de bioconversion, afin de permettre d'améliorer la sélectivité et ainsi garantir l'exploitation de la biomasse lignocellulosique dans son intégralité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, A., Templeton, D., 2008. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf. Tech. Rep. NREL/TP-510-42619 1–9. doi:NREL/TP-510-42621

Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., Overend, R.P., 1992. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. Chem. Eng. Sci. 47, 1109–1122. doi:10.1016/0009-2509(92)80235-5

Abraham, R.E., Barrow, C.J., Puri, M., 2013. Relationship to reducing sugar production and scanning electron microscope structure to pretreated hemp hurd biomass (Cannabis sativa). Biomass and Bioenergy 58, 180–187. doi:10.1016/j.biombioe.2013.06.006

Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Nur, H., Sebayang, A.H., 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. Renew. Sustain. Energy Rev. 66, 631–653. doi:10.1016/j.rser.2016.07.015

AFNOR, 2016. FD U44-162 - Amendements organiques et supports de culture - Caractérisation de la matière organique par fractionnement biochimique et estimation de sa stabilité biologique.

AFNOR, 2011. NF EN 13039 - Amendements du sol et supports de culture - Détermination de la matière organique et des cendres.

AFNOR, 2007. NF EN 13040 - Amendements organiques et supports de culture - Préparation des échantillons pour les essais physiques et chimiques, détermination de la teneur en matière sèche, du taux d'humidité et de la masse volumique compactée en laboratoire.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Biotechnol. Adv. 29, 675–685. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.005

Aita, G.M., Kim, M., 2010. Pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic materials to bioethanol. ACS Symp. Ser. 1058, 117–145. doi:10.1021/bk-2010-1058.ch008

Albers, E., Larsson, C., 2009. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 1085–1091. doi:10.1007/s10295-009-0592-1

Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Gorsich, S., Lidén, G., 2009. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, 625–638. doi:10.1007/s00253-009-1875-1

Alonso, D.M., Bond, J.Q., Dumesic, J.A., 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. Green Chem. 12, 1493. doi:10.1039/c004654j

Alonso, E., 2018. The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat

bran-based biorefinery. J. Supercrit. Fluids 133, 603–614. doi:10.1016/j.supflu.2017.09.010

Alves, E.F., Bose, S.K., Francis, R.C., Colodette, J.L., Iakovlev, M., Van Heiningen, A., 2010. Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. Carbohydr. Polym. 82, 1097–1101. doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.038

Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2013. Progress on Enzymatic Saccharification Technologies for Biofuels Production, in: Biofuel Technologies: Recent Developments. pp. 1–25. doi:10.1007/978-3-642-34519-7

Alvira, P., Toms-Pej, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101, 4851–4861. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093

Amaducci, S., Zatta, A., Pelatti, F., Venturi, G., 2008. Influence of agronomic factors on yield and quality of hemp (Cannabis sativa L.) fibre and implication for an innovative production system. F. Crop. Res. 161–169. doi:10.1016/j.fcr.2008.02.002

Amillastre, E., 2012. Amélioration de la robustesse de souches de levures aux stress technologiques par une stratégie de génie microbiologique. Application à la production industrielle de bio-éthanol à partir de matières premières agricoles. Université de Toulouse.

Amini, N., Haritos, V.S., Tanksale, A., 2018. Microwave assisted pretreatment of eucalyptus sawdust enhances enzymatic saccharification and maximizes fermentable sugar yield. Renew. Energy 127, 653–660. doi:10.1016/J.RENENE.2018.05.001

Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29, 719–739. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.006

Asghar, U., Irfan, M., Iram, M., Huma, Z., Nelofer, R., Nadeem, M., Syed, Q., 2015. Effect of alkaline pretreatment on delignification of wheat straw. Nat. Prod. Res. 29, 125–131. doi:10.1080/14786419.2014.964712

Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017a. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. Biotechnol. Biofuels 10, 1–16. doi:10.1186/s13068-017-0718-z

Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., Wood, I.P., Elliston, A., Collins, S.R.A., Wilson, D., Bancroft, I., Waldron, K.W., 2017b. Steam explosion of oilseed rape straw: Establishing key determinants of saccharification efficiency. Biotechnol. Biofuels 162, 175–183. doi:10.1186/s13068-017-0718-z

Bahrani, S.A., 2013. Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couplés chaleur-masse. Université de La Rochelle.

Bahrani, S.A., Loisel, C., Monteau, J.Y., Rezzoug, S.A., Maache-Rezzoug, Z., 2011.

Estimation of Effective Moisture Diffusivity in Starchy Materials Following Hydrothermal Treatments. Defect Diffus. Forum 312–315, 364–369. doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.312-315.364

Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnol. Adv. 26, 89–105. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.002

Bai, F.W., Chen, L.J., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2004. Parameter oscillations in a very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on a multistage packed column bioreactor system. Biotechnol. Bioeng. 88, 558–566. doi:10.1002/bit.20221

Bajpai, P., 2016. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production, SPRINGER B. ed. Springer.

Balan, V., Bals, B., Chundawat, S.P.S., Marshall, D., Dale, B.E., 2009. Lignocellulosic Biomass Pretreatment Using AFEX, in: Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). pp. 61–77. doi:10.1007/978-1-60761-214-8_5

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Convers. Manag. 52, 858–875. doi:10.1016/j.enconman.2010.08.013

Ballerini, D., 2011. Les biocarburants : répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports, TECHNIP. ed.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Navarro, A.A., González, A., Carrasco, J., Ballesteros, M., 2000. Effect of Chip Size on Steam Explosion Pretreatment of Softwood. Appl. Biochem. Biotechnol. 84–86, 97–110. doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:97

Ballesteros, M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Saez, F., Oliva, J.M., 2007. Fractionation of Cynara cardunculus (Cardoon) Biomass by Dilute-Acid Pretreatment. Appl. Biochem. Biotechnol. 105, 2003.

Bals, B., Wedding, C., Balan, V., Sendich, E., Dale, B., 2011. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. Bioresour. Technol. 102, 1277–1283. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.058

Barman, D.N., Haque, M.A., Kang, T.H., Kim, G.H., Kim, T.Y., Kim, M.K., Yun, H.D., 2014. Effect of mild alkali pretreatment on structural changes of reed (Phragmites communis Trinius) straw. Environ. Technol. (United Kingdom) 35, 232–241. doi:10.1080/09593330.2013.824009

Barta, Z., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Dienes, D., Ballesteros, M., Reczey, K., 2010. Refining hemp hurds into fermentable sugars or ethanol. Chem. Biochem. Eng. Q. 24, 331–339.

Bassil, S., 2015. Etude de la répartition structurale des acides férulique et p-coumarique dans la chènevotte et la poudre organique de chanvre (Cannabis sativa) Exploration des voies de fractionnement pour l'obtention d'extraits à valeur ajoutée. Thèse, Université de

Toulouse.

Beckham, G.T., Matthews, J.F., Bomble, Y.J., Bu, L., Adney, W.S., Himmel, M.E., Nimlos, M.R., Crowley, M.F., 2010. Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. J. Phys. Chem. B 114, 1447–1453. doi:10.1021/jp908810a

Belkhir, S., Koubaa, A., Khadhri, A., Ksontini, M., Smiti, S., 2012. Variations in the morphological characteristics of Stipa tenacissima fiber: The case of Tunisia. Ind. Crops Prod. 37, 200–206. doi:10.1016/j.indcrop.2011.11.021

Belmokhtar, N., 2012. Etude de la saccharification enzymatique du miscanthus par des cocktails cellulolytiques de Trichoderma reesei. Université de Reims Champagne-Ardenne.

Benjamin, Y., Cheng, H., Görgens, J.F., 2014. Optimization of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment to Maximize Combined Sugar Yield from Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. Appl. Biochem. Biotechnol. 172, 610–630. doi:10.1007/s12010-013-0545-z

Bhutto, A.W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A.A., Karim, S., Yu, G., 2017. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. Energy 122, 724–745. doi:10.1016/j.energy.2017.01.005

Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T., Plöger, A., Schmidt, A.S., 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. Biotechnol. Bioeng. 49, 568–577. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960305)49:5<568::AID-BIT10>3.0.CO;2-6

Boakye-Boaten, N.A., Xiu, S., Shahbazi, A., Wang, L., Li, R., Mims, M., Schimmel, K., 2016. Effects of fertilizer application and dry/wet processing of Miscanthus x giganteus on bioethanol production. Bioresour. Technol. 204, 98–105. doi:10.1016/j.biortech.2015.12.070

Borchani, K.E., Carrot, C., Jaziri, M., 2015. Untreated and alkali treated fibers from Alfa stem: effect of alkali treatment on structural, morphological and thermal features. Cellulose 22, 1577–1589. doi:10.1007/s10570-015-0583-5

Boucher, J., 2014. Etude des possibilités de production d ' éthanol hémicellulosique dans le cadre d ' une bioraffinerie. UNIVERSITÉ DE GRENOBLE.

Bouiri, B., Amrani, M., 2010. Elemental chlorine-free bleaching halfa pulp. J. Ind. Eng. Chem. 16, 587–592. doi:10.1016/j.jiec.2010.03.015

Bouloc, P., 2006. Le chanvre industriel: production et utilisations, France Agr. ed.

Boussarsar, H., Rogé, B., Mathlouthi, M., 2009. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. Bioresour. Technol. 100, 6537–6542. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.019

Brazdausks, P., Paze, A., Rizhikovs, J., Puke, M., Meile, K., Vedernikovs, N., Tupciauskas, R., Andzs, M., 2015. Effect of aluminium sulphate-catalysed hydrolysis process on furfural

yield and cellulose degradation of Cannabis sativa L. shives. Biomass and Bioenergy 89, 98–104. doi:10.1016/j.biombioe.2016.01.016

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. Enzyme Res. 2011. doi:10.4061/2011/787532

Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2009. Pretreatment of Miscanthus x giganteus Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production. Ind. Eng. Chem. Res. ACS ASAP, 8328–8334.

Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. J. Am. Chem. Soc. 60, 309–319. doi:10.1021/ja01269a023

Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S.W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., Bridgwater, A. V., 2017. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. 76, 309–322. doi:10.1016/j.rser.2017.03.072

Carrasco, C., Baudel, H.M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G., Lidén, G., 2010. SO2-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. Enzyme Microb. Technol. 46, 64–73. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2009.10.016

Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A., Kuhad, R.C., 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by Candida shehatae NCIM 3501. Bioresour. Technol. 98, 1947–1950. doi:10.1016/j.biortech.2006.07.047

Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. Appl. Biochem. Biotechnol. 84–86, 5–38. doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:5

Chaturvedi, V., Verma, P., 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3 Biotech 3, 415–431. doi:10.1007/s13205-013-0167-8

Chauve, M., 2011. Modélisation cinétique de l â€™ hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques. Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.

Chen, H., Fu, X., 2016. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. Renew. Sustain. Energy Rev. 57, 468–478. doi:10.1016/j.rser.2015.12.069

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S., 2017. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. Fuel Process. Technol. 160, 196–206. doi:10.1016/j.fuproc.2016.12.007

Chen, H.Z., Liu, Z.H., 2015. Steam explosion and its combinatorial pretreatment refining technology of plant biomass to bio-based products. Biotechnol. J. 10, 866–885. doi:10.1002/biot.201400705

Chen, W.H., Pen, B.L., Yu, C.T., Hwang, W.S., 2011. Pretreatment efficiency and structural

characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. Bioresour. Technol. 102, 2916–2924. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.052

Chen, W.H., Tu, Y.J., Sheen, H.K., 2011. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. Appl. Energy 88, 2726–2734. doi:10.1016/j.apenergy.2011.02.027

Chen, Y., Stevens, M.A., Zhu, Y., Holmes, J., Moxley, G., Xu, H., 2012. Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39, 691–700. doi:10.1007/s10295-011-1068-7

Chiesa, S., Gnansounou, E., 2014. Use of empty fruit bunches from the oil palm for bioethanol production: A thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. Bioresour. Technol. 159, 355–364. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.122

Choi, W.-I., Park, J., Lee, J.-P., Park, J.-Y., Kim, C., Park, Y., Lee, J.-S., Oh, Y.-K., Kim, J., 2013. Optimization of NaOH-catalyzed steam pretreatment of empty fruit bunch. Biotechnol. Biofuels 6, 170. doi:10.1186/1754-6834-6-170

Conforto, E., Joguet, N., Buisson, P., Vendeville, J.E., Chaigneau, C., Maugard, T., 2015. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. Mater. Sci. Eng. C 47, 357–366. doi:10.1016/j.msec.2014.11.054

Cormos, C., 2014. Renewable hydrogen production concepts from bioethanol reforming with carbon capture. Int. J. Hydrogen Energy 39, 5597–5606. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.01.114

Cullis, I.F., Saddler, J.N., Mansfield, S.D., 2004. Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics. Biotechnol. Bioeng. 85, 413–421. doi:10.1002/bit.10905

Cybulska, I., Brudecki, G., Lei, H., 2013. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, in: Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production. doi:10.1007/978-94-007-2409-9

Dallel, M., 2012. Evaluation du potentiel textile des fibres d'Alfa (Stipa Tenacissima L.) : caractérisation physico-chimique de la fibre au fil. These Dr. Ph.D. Université de Haute Alsace.

Damien, A., 2013. La biomasse énergie, Dunod. ed.

Daza Serna, L. V., Orrego Alzate, C.E., Cardona Alzate, C.A., 2016. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 199, 113–120. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.078

Demirbaş, A., 2001. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. Energy Convers. Manag. 42, 1357–1378. doi:10.1016/S0196-8904(00)00137-0

Dheeran, P., Reddy, L., 2017. Biorefining of Lignocelluloses: An Opportunity for Sustainable Biofuel Production, in: Biorefining of Biomass to Biofuels : Opportunities and Perception. Springer, p. 1. doi:10.1007/978-3-319-67678-4

Didderen, I., Destain, J., Thonart, P., 2008. Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Presses agronomiques de Gembloux.

Duff, S.J.B., Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: A review. Bioresour. Technol. 55, 1–33. doi:10.1016/0960-8524(95)00122-0

Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2016. Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment, Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-802323-5.00015-3

EIHA, 2015. European Industrial Hemp Association, Eiha.org/. [WWW Document].

Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G., 1995. The influence of SO2 and H2SO4 impregnation of willow prior to steam pretreatment. Bioresour. Technol. 52, 225–229. doi:10.1016/0960-8524(95)00042-D

El Achaby, M., Kassab, Z., Barakat, A., Aboulkas, A., 2018. Alfa fibers as viable sustainable source for cellulose nanocrystals extraction: Application for improving the tensile properties of biopolymer nanocomposite films. Ind. Crops Prod. 112, 499–510. doi:10.1016/J.INDCROP.2017.12.049

El Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., Brosse, N., 2010. Effect of autohydrolysis of Miscanthus x giganteus on lignin structure and organosolv delignification. Bioresour. Technol. 101, 9321–9329. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.143

Esteghlalian, A., Hashimoto, A.G., Fenske, J.J., Penner, M.H., 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. Bioresour. Technol. 59, 129–136. doi:10.1016/S0960-8524(97)81606-9

Faik, A., 2013. "Plant Cell Wall Structure-Pretreatment" the Critical Relationship in Biomass Conversion to Fermentable Sugars, in: T. GU (Ed.), Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production. Springer.

Fan, X., Cheng, G., Zhang, H., Li, M., Wang, S., Yuan, Q., 2014a. Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corncob. Carbohydr. Polym. 114, 21–26. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.051

Fan, X., Cheng, G., Zhang, H., Li, M., Wang, S., Yuan, Q., 2014b. Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corncob. Carbohydr. Polym. 114, 21–26. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.051

Faulon, J.-L., Carlson, G.A., Hatcher, P.G., 1994. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. Org. Geochem 21, 1169–1179.

Feng, L., Chen, Z., 2008. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. J. Mol. Liq. 142, 1–5. doi:10.1016/J.MOLLIQ.2008.06.007

Galbe, M., Zacchi, G., 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. Biomass and Bioenergy 46, 70–78. doi:10.1016/j.biombioe.2012.03.026

Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 108, 41–65. doi:10.1007/10_2007_070

Gandolfi, S., Ottolina, G., Consonni, R., Riva, S., Patel, I., 2014. Fractionation of hemp hurds by organosolv pretreatment and its effect on production of lignin and sugars. ChemSusChem 7, 1991–1999. doi:10.1002/cssc.201301396

Gandolfi, S., Ottolina, G., Riva, S., Fantoni, G.P., Patel, I., 2013a. Complete chemical analysis of carmagnola hemp hurds and structural features of its components. BioResources 8, 2641–2656.

Gandolfi, S., Ottolina, G., Riva, S., Fantoni, G.P., Patel, I., 2013b. Complete chemical analysis of carmagnola hemp hurds and structural features of its components. BioResources 8, 2641–2656. doi:10.15376/biores.8.2.2641-2656

García-Aparicio, M.P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 129, 278–288. doi:10.1385/ABAB:129:1:278

García, A., González Alriols, M., Labidi, J., 2014. Evaluation of different lignocellulosic raw materials as potential alternative feedstocks in biorefinery processes. Ind. Crops Prod. 53, 102–110. doi:10.1016/j.indcrop.2013.12.019

Gaur, R., Soam, S., Sharma, S., Gupta, R.P., Bansal, V.R., Kumar, R., Tuli, D.K., 2016. Bench scale dilute acid pretreatment optimization for producing fermentable sugars from cotton stalk and physicochemical characterization. Ind. Crops Prod. 83, 104–112. doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.056

Gavahian, M., Farahnaky, A., Sastry, S., 2016. Ohmic-assisted hydrodistillation: A novel method for ethanol distillation. Food Bioprod. Process. 98, 44–49. doi:10.1016/j.fbp.2015.11.003

GIEC, 2013. Changements climatiques.

Goh, C.S., Tan, H.T., Lee, K.T., Brosse, N., 2011. Evaluation and optimization of organosolv pretreatment using combined severity factors and response surface methodology. Biomass and Bioenergy 35, 4025–4033. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2011.06.034

Gomis, V., Font, A., Pedraza, R., Saquete, M.D., 2005. Isobaric vapor–liquid and vapor–liquid–liquid equilibrium data for the system water + ethanol + cyclohexane. Fluid Phase Equilib. 235, 7–10. doi:10.1016/J.FLUID.2005.07.015

Goupy, J., 2006. Introduction aux plans d'expériences. Dunod.

Goupy, J. (1934-. . . .)., 2005. Pratiquer les plans d'expériences.

Gu, T., Held, M.A., Faik, A., 2013. Supercritical CO2and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. Environ. Technol. (United Kingdom) 34, 1735–1749. doi:10.1080/09593330.2013.809777

Guerrero, A.B., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2017. Optimal conditions of acid-catalysed steam explosion pretreatment of banana lignocellulosic biomass for fermentable sugar production. J. Chem. Technol. Biotechnol. 92, 2351–2359. doi:10.1002/jctb.5239

Gupta, V.K., Tuohy, M.G., 2014. Biofuel technologies: Recent developments, Springer. doi:10.1007/978-3-642-34519-7

Hames, B.R., 2009. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, in: Jonathan R. Mielenz (Ed.), Biofuels, Methods in Molecular Biology. pp. 145–167. doi:10.1007/978-1-60761-214-8

Hanana, S., Elloumi, A., Placet, V., Tounsi, H., Belghith, H., Bradai, C., 2015. An efficient enzymatic-based process for the extraction of high-mechanical properties alfa fibres. Ind. Crops Prod. 70, 190–200. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.018

Haryanto, A., Fernando, S., Murali, N., Adhikari, S., 2005. Current status of hydrogen production techniques by steam reforming of ethanol: A review. Energy and Fuels 19, 2098–2106. doi:10.1021/ef0500538

Hassan, S.S., Williams, G.A., Jaiswal, A.K., 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 262, 310–318. doi:10.1016/j.biortech.2018.04.099

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 100, 10–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027

Hodgson, E.M., Nowakowski, D.J., Shield, I., Riche, A., Bridgwater, A. V., Clifton-Brown, J.C., Donnison, I.S., 2011. Variation in Miscanthus chemical composition and implications for conversion by pyrolysis and thermo-chemical bio-refining for fuels and chemicals. Bioresour. Technol. 102, 3411–3418. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.017

Hou, T., Zhang, S., Chen, Y., Wang, D., Cai, W., 2015. Hydrogen production from ethanol reforming : Catalysts and reaction mechanism. Renew. Sustain. Energy Rev. 44, 132–148. doi:10.1016/j.rser.2014.12.023

Hu, Z., Wen, Z., 2008. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. Biochem. Eng. J. 38, 369–378. doi:10.1016/j.bej.2007.08.001

Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W., Ramarao, B.V., 2008. A review of separation technologies in current and future biorefineries. Sep. Purif. Technol. 62, 1–21. doi:10.1016/J.SEPPUR.2007.12.011

IEA, 2017a. CO2 emissions from fuel combustion: overview.

IEA, 2017b. Energy Policies of IEA Countries_France_2016_Review.

IEA, 2014. Maroc 2014 - Politiques énergétiques hors des pays de l'AIE.

Isikgor, F.H., Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. Polym. Chem. 6, 4497–4559. doi:10.1039/C5PY00263J

Jang, S.K., Kim, H.Y., Jeong, H.S., Kim, J.Y., Yeo, H., Choi, I.G., 2016. Effect of ethanol organosolv pretreatment factors on enzymatic digestibility and ethanol organosolv lignin structure from Liriodendron tulipifera in specific combined severity factors. Renew. Energy 87, 599–606. doi:10.1016/j.renene.2015.10.045

Jin, Y.-S., Jeffries, T.W., 2004. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant Saccharomyces cerevisiae. Metab. Eng. 6, 229–238. doi:10.1016/J.YMBEN.2003.11.006

Jung, Y.H., Kim, K.H., 2014. Acidic Pretreatment, Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-12-800080-9.00003-7

Juszczak, L., Fortuna, T., Wodnicka, K., 2002. Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. J. Food Eng. 54, 103–110. doi:10.1016/S0260-8774(01)00190-X

Kabir, M.M., Wang, H., Lau, K.T., Cardona, F., 2013. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. Appl. Surf. Sci. 276, 13–23. doi:10.1016/j.apsusc.2013.02.086

Karimi, K., Shafie, M., Kumar, R., 2014. Progress in Physical and Chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, in: Biofuel Technologies: Recent Developments. pp. 1–534. doi:10.1007/978-3-642-34519-7

Karimi, K., Taherzadeh, M.J., 2016. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. Bioresour. Technol. 203, 348–356. doi:10.1016/j.biortech.2015.12.035

Karus, M., 2002. European hemp industry 2001: Cultivation, processing, and product lines.

Kataria, R., Mol, A., Schulten, E., Happel, A., Mussatto, S.I., 2017. Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis. Ind. Crops Prod. 106, 48–58. doi:10.1016/j.indcrop.2016.08.050

Khelifa, M.R., Leklou, N., Bellal, T., Hebert, R.L., Ledesert, B.A., 2016. Is alfa a vegetal fiber suitable for making green reinforced structure concrete? Eur. J. Environ. Civ. Eng. 1–21. doi:10.1080/19648189.2016.1217792

Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 199, 42–48. doi:10.1016/J.BIORTECH.2015.08.085

Kim, S., Holtzapple, M.T., 2006. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. Bioresour. Technol. 97, 778–785. doi:10.1016/J.BIORTECH.2005.04.002

Klimiuk, E., Pokój, T., Budzyński, W., Dubis, B., 2010. Theoretical and observed biogas production from plant biomass of different fibre contents. Bioresour. Technol. 101, 9527–9535. doi:10.1016/J.BIORTECH.2010.06.130

Köhler, E., 1898. Book of Medicinal Plants. Colorado, United states.

Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. Bioresour. Bioprocess. 4. doi:10.1186/s40643-017-0137-9

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. (Analytical Ed. 48, 3713–3729. doi:10.1021/ie801542g

Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009a. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. Bioresour. Technol. 100, 3948–3962. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.075

Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009b. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. Bioresour. Technol. 100, 3948–3962. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.075

Kumar, R., Tabatabaei, M., Karimi, K., Sárvári Horváth, I., 2016. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review. Biofuel Res. J. 3, 347–356. doi:10.18331/BRJ2016.3.1.4

Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. Biotechnol. Bioeng. 103, 252–267. doi:10.1002/bit.22258

Kumar, S., Singh, N., Prasad, R., 2010. Anhydrous ethanol: A renewable source. Renew. Sustain. Energy Rev. 14, 1830–1844. doi:10.1016/J.RSER.2010.03.015

Kumari, D., Singh, R., 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. Renew. Sustain. Energy Rev. 90, 877–891. doi:10.1016/j.rser.2018.03.111

Lai, L.W., Idris, A., 2016. Comparison of steam-alkali-chemical and microwave-alkali pretreatment for enhancing the enzymatic saccharification of oil palm trunk. Renew. Energy 99, 738–746. doi:10.1016/j.renene.2016.07.059

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.-O., 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. Enzyme Microb. Technol. 24, 151–159. doi:10.1016/S0141-0229(98)00101-X

Lee, C., Zheng, Y., VanderGheynst, J.S., 2015. Effects of pretreatment conditions and post-pretreatment washing on ethanol production from dilute acid pretreated rice straw. Biosyst.

Eng. 137, 36–42. doi:10.1016/j.biosystemseng.2015.07.001

Li, C., Cheng, G., Balan, V., Kent, M.S., Ong, M., Chundawat, S.P.S., Sousa, L. daCosta, Melnichenko, Y.B., Dale, B.E., Simmons, B.A., Singh, S., 2011. Influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. Bioresour. Technol. 102, 6928–6936. doi:10.1016/J.BIORTECH.2011.04.005

Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A., Singh, S., 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. Bioresour. Technol. 101, 4900–4906. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.066

Li, Y., Liu, X., Zhang, S., Yao, Y., Yao, X., 2015. Dissolving process of a cellulose bunch in ionic liquids : a molecular dynamics study †. Phys. Chem. Chem. Phys. 17, 17894–17905. doi:10.1039/C5CP02009C

Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 627–642. doi:10.1007/s00253-005-0229-x

Linder, R., 2005. Les plans d'expériences : un outil indispensable à l'expérimentateur. Presses de l'École nationale des ponts et chaussées.

Liu, Z.H., Qin, L., Pang, F., Jin, M.J., Li, B.Z., Kang, Y., Dale, B.E., Yuan, Y.J., 2013. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. Ind. Crops Prod. 44, 176–184. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.009

LÜ, H., REN, M., ZHANG, M., CHEN, Y., 2013. Pretreatment of Corn Stover Using Supercritical CO2 with Water-Ethanol as Co-solvent. Biotechnol. Bioeng. 21, 551–557. doi:10.1016/S1004-9541(13)60508-X

Luo, C., Brink, D.L., Blanch, H.W., 2002. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. Biomass and Bioenergy 22, 125–138. doi:10.1016/S0961-9534(01)00061-7

Maache-Rezzoug, Z., Pierre, G., Nouviaire, A., Maugard, T., Rezzoug, S.A., 2011. Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology. Biomass and Bioenergy 35, 3129–3138. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.012

Maache-Rezzoug, Z., T., Maugard, Qiuyu, Z.J.M., Nouviaire, A., Sid-Ahmed, R., 2015. Combined steam-explosion toward vacuum and dilute-acid spraying of wheat straw. Impact of severity factor on enzymatic hydrolysis. Renew. Energy 78, 516–526. doi:10.1016/j.renene.2015.01.038

Marrakchi, Z., Khiari, R., Oueslati, H., Mauret, E., Mhenni, F., 2011. Pulping and papermaking properties of Tunisian Alfa stems (Stipa tenacissima)-Effects of refining process. Ind. Crops Prod. 34, 1572–1582. doi:10.1016/j.indcrop.2011.05.022

Mathew, A.K., Parameshwaran, B., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2016. An evaluation of

dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. Bioresour. Technol. 199, 13–20. doi:10.1016/J.BIORTECH.2015.08.121

McIntosh, S., Zhang, Z., Palmer, J., Wong, H.-H., Doherty, W.O.S., Vancov, T., 2016. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. Biofuels, Bioprod. Biorefining. doi:10.1002/bbb.1651

McMillan, J.D., 1992. Processes for Pretreating Lignocellulosic Biomass: A Review.

Meng, X.Z., Wells, T., Sun, Q.N., Huang, F., Ragauskas, A.J., 2015. Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus. Green Chem. 17, 4239–4246. doi:10.1039/c5gc00689a

Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Prog. Energy Combust. Sci. 38, 522–550. doi:10.1016/j.pecs.2012.02.002

Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. Biofuels 108, 95–120. doi:10.1007/10_2007_066

Mirahmadi, K., Mohseni Kabir, M., Jeihanipour, A., Karimi, K., Taherzadeh, M.J., 2010. Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. BioResources 5, 928–938.

Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. Biomass and Bioenergy 56, 526–544. doi:10.1016/j.biombioe.2013.05.031 Review

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.P., Carrère, H., 2013. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: Impact of structural features and pretreatment. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 43, 260–322. doi:10.1080/10643389.2011.604258

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 96, 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025

Moxley, G., Zhu, Z., Zhang, Y.H.P., 2008. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. J. Agric. Food Chem. 56, 7885–7890. doi:10.1021/jf801303f

Mutturi, S., Palmqvist, B., Lidén, G., 2014. Developments in bioethanol fuel-focused biorefineries, in: Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation. pp. 259–302. doi:10.1533/9780857097385.1.259

Narayanaswamy, N., Faik, A., Goetz, D.J., Gu, T., 2011. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. Bioresour. Technol. 102, 6995–7000. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.052

Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabañas, A., Ballesteros, M., 2003.

Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. Appl. Biochem. Biotechnol. 105, 87–100. doi:10.1385/ABAB:105:1-3:87

Nitsos, C.K., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S., 2013. Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process. ChemSusChem 6, 110–122. doi:10.1002/cssc.201200546

Noori, M.S., Karimi, K., 2016. Detailed study of efficient ethanol production from elmwood by alkali pretreatment. Biochem. Eng. J. 105, 197–204. doi:10.1016/j.bej.2015.09.019

Öhgren, K., Galbe, M., Zacchi, G., 2005. Optimization of steam pretreatment of SO2-impregnated corn stover for fuel ethanol production. Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol. 124, 1055–1067. doi:10.1385/ABAB:124:1-3:1055

Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J. a., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 321, 523–536. doi:10.1098/rsta.1987.0029

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresour. Technol. 74, 25–33. doi:10.1016/S0960-8524(99)00161-3

Papatheofanous, M.G., Billa, E., Koullas, D.P., Monties, B., Koukios, E.G., 1995. Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. Bioresour. Technol. 54, 305–310. doi:10.1016/0960-8524(95)00152-2

Pedersen, M., Meyer, A.S., 2010. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. N. Biotechnol. 27, 739–750. doi:10.1016/j.nbt.2010.05.003

Pereira, S.C., Maehara, L., Machado, C.M.M., Farinas, C.S., 2016. Physical-chemical-morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. Renew. Energy 87, 607–617. doi:10.1016/j.renene.2015.10.054

Pierre, G., Maache-Rezzoug, Z., Sannier, F., Rezzoug, S.A., Maugard, T., 2011. High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulase and thermomechanical pretreatment. Process Biochem. 46, 2194–2200. doi:10.1016/j.procbio.2011.09.002

Pinkert, A., Marsh, K.N., Pang, S., Staiger, M.P., 2009. Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. Chem. Rev. 109, 6712–6728. doi:10.1021/cr9001947

Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resour. Conserv. Recycl. 50, 1–39. doi:10.1016/j.resconrec.2006.05.007

Privas, E., 2013. Matériaux ligno-cellulosiques : " Elaboration et caractérisation ". Thèse. Mines ParisTech.

Pye, E., Lora, J., 1991. The Alcell process: a proven alternative to Kraft pulping. Tappi J. 113–118.

Rabelo, S.C., Carrere, H., Maciel Filho, R., Costa, A.C., 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. Bioresour. Technol. 102, 7887–7895. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.081

Rabemanolontsoa, H., Saka, S., 2016. Various pretreatments of lignocellulosics. Bioresour. Technol. 199, 83–91. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.029

Ragauskas, A.J., Nagy, M., Kim, D.H., Eckert, C.A., Hallett, J.P., Liotta, C.L., 2006. From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production. Ind. Biotechnol. 2, 55–65. doi:10.1089/ind.2006.2.55

Rastogi, M., Shrivastava, S., 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. Renew. Sustain. Energy Rev. 80, 330–340. doi:10.1016/j.rser.2017.05.225

Rawat, R., Kumbhar, B.K., Tewari, L., 2013. Optimization of alkali pretreatment for bioconversion of poplar (Populus deltoides) biomass into fermentable sugars using response surface methodology. Ind. Crop. Prod. 44, 220–226. doi:10.1016/j.indcrop.2012.10.029

Rehman, M.S.U., Rashid, N., Saif, A., Mahmood, T., Han, J.I., 2013. Potential of bioenergy production from industrial hemp (Cannabis sativa): Pakistan perspective. Renew. Sustain. Energy Rev. 18, 154–164. doi:10.1016/j.rser.2012.10.019

Rezende, C.A., Lima, M.A. De, Maziero, P., Ribeiro, E., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. Biotechnol. Biofuels 4, 54.

Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol. Adv. 27, 185–194. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

Sangnark, A., Noomhorm, A., 2003. Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse. Food Chem. 80, 221–229. doi:10.1016/S0308-8146(02)00257-1

Saqib, A.A.N., Whitney, P.J., 2011. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. Biomass and Bioenergy 35, 4748–4750. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2011.09.013

Sassner, P., Mårtensson, C.G., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. Steam pretreatment of H2SO4-impregnated Salix for the production of bioethanol. Bioresour. Technol. 99, 137–145. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.039

Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. Text. Res. J. 29, 786–794. doi:10.1177/004051755902901003

Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Prog. 23, 1333–1339.

doi:10.1021/bp0702018

Sharma, S., Kumar, R., Gaur, R., Agrawal, R., Gupta, R.P., Tuli, D.K., Das, B., 2015. Pilot scale study on steam explosion and mass balance for higher sugar recovery from rice straw. Bioresour. Technol. 175, 350–357. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.112

Shirkavand, E., Baroutian, S., Gapes, D.J., Young, B.R., 2016. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 54, 217–234. doi:10.1016/j.rser.2015.10.003

Silva, T.A.L., Zamora, H.D.Z., Varão, L.H.R., Prado, N.S., Baffi, M.A., Pasquini, D., 2017a. Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. Waste and Biomass Valorization 0, 1–11. doi:10.1007/s12649-017-9989-7

Silva, T.A.L., Zamora, H.D.Z., Varão, L.H.R., Prado, N.S., Baffi, M.A., Pasquini, D., 2017b. Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. Waste and Biomass Valorization 1–11. doi:10.1007/s12649-017-9989-7

Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresour. Technol. 98, 3000–3011. doi:10.1016/j.biortech.2006.10.022

Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2014a. Physicochemical characterization of alkali pretreated sugarcane tops and optimization of enzymatic saccharification using response surface methodology. Renew. Energy 62, 362–368. doi:10.1016/j.renene.2013.07.041

Sindhu, R., Pandey, A., Binod, P., 2014b. Alkaline Treatment. Pretreat. Biomass Process. Technol. 51–60. doi:10.1016/B978-0-12-800080-9.00004-9

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. Renew. Sustain. Energy Rev. 32, 713–728. doi:10.1016/j.rser.2014.01.051

Singh, Y.D., Mahanta, P., Bora, U., 2017. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. Renew. Energy 103, 490–500. doi:10.1016/j.renene.2016.11.039

Singh Nee Nigam, P., Pandey, A., 2009. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues, in: Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. pp. 13–33. doi:10.1007/978-1-4020-9942-7

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Nrel, D.C., 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass 2011.

Sluiter, a, Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples

Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. Lab. Anal. Proced. NREL/TP-510-42623 1–14.

Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W., 2010. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. J. Agric. Food Chem. 58, 9043–9053. doi:10.1021/jf1008023

Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (College teacher), 1995. Principles of fermentation technology.

Stevulova, N., Cigasova, J., Estokova, A., Terpakova, E., Geffert, A., Kacik, F., Singovszka, E., Holub, M., 2014. Properties characterization of chemically modified hemp hurds. Materials (Basel). 7, 8131–8150. doi:10.3390/ma7128131

Stuart, P., El-Halwagi, M., 2012. Integrated biorefineries: design, analysis, and optimization.

Sui, W., Chen, H., 2015. Water transfer in steam explosion process of corn stalk. Ind. Crops Prod. 76, 977–986. doi:10.1016/J.INDCROP.2015.08.001

Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. Ind. Crops Prod. 4, 127–145. doi:10.1016/0926-6690(95)00025-8

Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Bioresour. Technol. 199, 49–58. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.061

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. Bioresour. Technol. 83, 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7

Sun, Y.G., Ma, Y.L., Wang, L.Q., Wang, F.Z., Wu, Q.Q., Pan, G.Y., 2015. Physicochemical properties of corn stalk after treatment using steamexplosion coupled with acid or alkali. Carbohydr. Polym. 117, 486–493. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.066

Tabassum, F., Irfan, M., Shakir, H.A., Qazi, J.I., 2017. Statistical optimization for deconstruction of poplar substrate by dilute sulfuric acid for bioethanol production. Green Chem. Lett. Rev. 10, 69–79. doi:10.1080/17518253.2017.1293176

Taherzadeh, M., Karimi, K., Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci. 9, 1621–1651. doi:10.3390/ijms9091621

Takai, M., Colvin, J.R., 1978. Mechanism of transition between cellulose I and cellulose II during mercerization. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 16, 1335–1342. doi:10.1002/pol.1978.170160614

Teghammar, A., Karimi, K., Sárvári Horváth, I., Taherzadeh, M.J., 2012. Enhanced biogas production from rice straw, triticale straw and softwood spruce by NMMO pretreatment. Biomass and Bioenergy 36, 116–120. doi:10.1016/j.biombioe.2011.10.019

Tian, S.-Q., Zhao, R.-Y., Chen, Z.-C., 2018. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. Renew. Sustain. Energy Rev. 91, 483–489. doi:10.1016/J.RSER.2018.03.113

Toor, S.S., Rosendahl, L., Hoffmann, J., Holm-Nielsen, J.B., Ehimen, E.A., 2013. Lignocellulosic Biomass—Thermal Pretreatment with Steam, in: Green Energy and Technology. Springer, pp. 59–75. doi:10.1007/978-3-642-32735-3_1

Toquero, C., Bolado, S., 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. Bioresour. Technol. 157, 68–76. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.090

Torr, K.M., Love, K.T., Simmons, B.A., Hill, S.J., 2016. Structural features affecting the enzymatic digestibility of pine wood pretreated with ionic liquids. Biotechnol. Bioeng. 113, 540–549. doi:10.1002/bit.25831

Toyir, J., Gélin, P., Belatel, H., Kaddouri, A., 2010. Ir / Ce 0 . 9 Gd 0 . 1 O 2 − x as a new potential anode component in solid oxide fuel cells integrating the concept of gradual internal reforming of methane. Catal. Today 157, 451–455. doi:10.1016/j.cattod.2010.03.066

Tye, Y.Y., Lee, T., Nadiah, W., Abdullah, W., Peng Leh, C., 2016. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. doi:10.1016/j.rser.2016.01.072

Uppugundla, N., da Costa Sousa, L., Chundawat, S.P., Yu, X., Simmons, B., Singh, S., Gao, X., Kumar, R., Wyman, C.E., Dale, B.E., Balan, V., 2014. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX^{TM} pretreated corn stover. Biotechnol. Biofuels 7, 72. doi:10.1186/1754-6834-7-72

Van soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 46, 829–835.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vanwerts, F., 2015. NATIONS UNIES ET COP21 Quel pouvoir d'action pour sauver le climat ?

Vázquez, G., Freire, M.S., Antorrena, G., 2007. Valorisation of lignocellulosic waste materials : Tannins as a source of new products, in: Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6).

Vignon, M.R., Garcia-Jaldon, C., Dupeyre, D., 1995. Steam explosion of woody hemp chènevotte 17, 395–404.

Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason. Sonochem. 8, 303–313. doi:10.1016/S1350-4177(01)00071-2

Wang, G.S., Lee, J.W., Zhu, J.Y., Jeffries, T.W., 2011. Dilute acid pretreatment of corncob for efficient sugar production. Appl. Biochem. Biotechnol. 163, 658–668. doi:10.1007/s12010-010-9071-4

Wang, K., Chen, J., Sun, S.N., Sun, R.C., 2014. Steam Explosion, Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-12-800080-9.00006-2

Wildschut, J., Smit, A.T., Reith, J.H., Huijgen, W.J.J., 2013. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. Bioresour. Technol. 135, 58–66. doi:10.1016/J.BIORTECH.2012.10.050

Wiman, M., Dienes, D., Hansen, M.A.T., van der Meulen, T., Zacchi, G., Lidén, G., 2012. Cellulose accessibility determines the rate of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce. Bioresour. Technol. 126, 208–215. doi:10.1016/J.BIORTECH.2012.08.082

Wood, I.P., Elliston, A., Collins, S.R.A., Wilson, D., Bancroft, I., Waldron, K.W., 2014. Steam explosion of oilseed rape straw: Establishing key determinants of saccharification efficiency. Bioresour. Technol. 162, 175–183. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.115

Wright, J., 1998. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. Chem. Eng. Prog. 84, 62–74.

Wu, G., Xu, Z., Jönsson, L.J., 2017. Profiling of Saccharomyces cerevisiae transcription factors for engineering the resistance of yeast to lignocellulose-derived inhibitors in biomass conversion. Microb. Cell Fact. 16, 199. doi:10.1186/s12934-017-0811-9

Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. Appl. Energy 104, 801–809. doi:10.1016/j.apenergy.2012.12.019

Xu, H., Li, B., Mu, X., 2016. Review of Alkali-Based Pretreatment to Enhance Enzymatic Saccharification for Lignocellulosic Biomass Conversion. Ind. Eng. Chem. Res. 55, 8691–8705. doi:10.1021/acs.iecr.6b01907

Xu, J., 2014. Microwave Pretreatment, in: Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies. pp. 157–172. doi:10.1016/B978-0-12-800080-9.00009-8

Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-Shivappa, R.R., Burns, J.C., 2010. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. Energy and Fuels 24, 2113–2119. doi:10.1021/ef9014718

Xu, Q.-Q., Zhao, M.-J., Yu, Z.-Z., Yin, J.-Z., Li, G.-M., Zhen, M.-Y., Zhang, Q.-Z., 2017. Enhancing enzymatic hydrolysis of corn cob, corn stover and sorghum stalk by dilute aqueous ammonia combined with ultrasonic pretreatment. Ind. Crops Prod. 109, 220–226. doi:10.1016/J.INDCROP.2017.08.038

Yang, S.-T., El-enshasy, H.A., Thongchul, N., 2013. Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers. doi:10.1007/978-1-4614-5797-8

Yu, Q., Zhuang, X., Wang, Q., Qi, W., Tan, X., Yuan, Z., 2012. Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water. Bioresour. Technol. 116, 220–225. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.031

Yu, Z., Zhang, B., Yu, F., Xu, G., Song, A., 2012. A real explosion: The requirement of steam explosion pretreatment. Bioresour. Technol. 121, 335–341. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.055

Zaafouri, K., Ziadi, M., Ben Farah, R., Farid, M., Hamdi, M., Regaya, I., 2016. Potential of Tunisian Alfa (Stipa tenassicima) fibers for energy recovery to 2G bioethanol: Study of pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation. Biomass and Bioenergy 94, 66–77. doi:10.1016/j.biombioe.2016.08.008

Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. Renew. Sustain. Energy Rev. 66, 751–774. doi:10.1016/j.rser.2016.08.038

Zhang, K., Pei, Z., Wang, D., 2016. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. Bioresour. Technol. 199, 21–33. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.102

Zhao, Y., Wang, Y., Zhu, J.Y., Ragauskas, A., Deng, Y., 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. Biotechnol. Bioeng. 99, 1320–1328. doi:10.1002/bit.21712

Zhao, Z., Li, N., Bhutto, A.W., Abdeltawab, A.A., Al-Deyab, S.S., Liu, G., Chen, X., Yu, G., 2016. N-methyl-2-pyrrolidonium-based Brönsted-Lewis acidic ionic liquids as catalysts for the hydrolysis of cellulose. Sci. China Chem. 59, 564–570. doi:10.1007/s11426-016-5592-1

Zhu, J.Y., Pan, X., Zalesny, R.S., 2010. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: Energy efficiency, technologies, and recalcitrance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 847–857. doi:10.1007/s00253-010-2654-8

Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzapple, M.T., 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. Bioresour. Technol. 99, 3817–3828. doi:10.1016/J.BIORTECH.2007.07.033

Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Liao, J., Zhang, Y., 2005. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. Process Biochem. 40, 3082–3086. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.016

Zhu, Z., Rezende, C.A., Simister, R., McQueen-Mason, S.J., Macquarrie, D.J., Polikarpov, I., Gomez, L.D., 2016. Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. Biomass and Bioenergy 93, 269–278. doi:10.1016/j.biombioe.2016.06.017

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Yuan, Z., 2016. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. Bioresour. Technol. 199, 68–75.

doi:10.1016/j.biortech.2015.08.051

Zhuang, X., Yu, Q., Yuan, Z., Kong, X., Qi, W., 2015. Effect of hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse on enzymatic digestibility. J. Chem. Technol. Biotechnol. 90, 1515–1520. doi:10.1002/jctb.4467

Zhuang, X., Yuan, Z., Ma, L., Wu, C., Xu, M., Xu, J., Zhu, S., Qi, W., 2009. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. Biotechnol. Adv. 27, 578–82. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.019

Valorisation scientifique des travaux réalisés

- Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture

Semhaoui, I., Maugard, T., Zarguili, I., Rezzoug, S.A., Zhao, J.M.Q., Toyir, J., Nawdali, M., Maache-Rezzoug, Z., **2018**. Eco-friendly process combining acid-catalyst and thermomechanical pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of hemp hurds. Bioresour. Technol. 257, 192–200.

Semhaoui, I., Zarguili, I., Rezzoug, S.A., Maugard, T., Zhao, J.M.Q., Toyir, J., Nawdali, M., Maache-Rezzoug, Z., **2017**. Bioconversion of Moroccan alfa (Stipa Tenacissima) by thermomechanical pretreatment combined to acid or alkali Spraying for ethanol production J Mater Environ Sci, 8, 2619-2631.

Semhaoui, I., Zarguili, I., Rezzoug, S.A., Maugard, T., Zhao, J.M.Q., Toyir, J., Nawdali, M., Maache-Rezzoug, Z., **2016**. Intensification of hemp hurds hydrolysis by combined steam-explosion toward vacuum and alkali or dilute-acid spraying pretreatment. European Biomass Conference and Exhibition Proceedings Volume 2016, Issue 24thEUBCE, 2016, Pages 1013-1024.

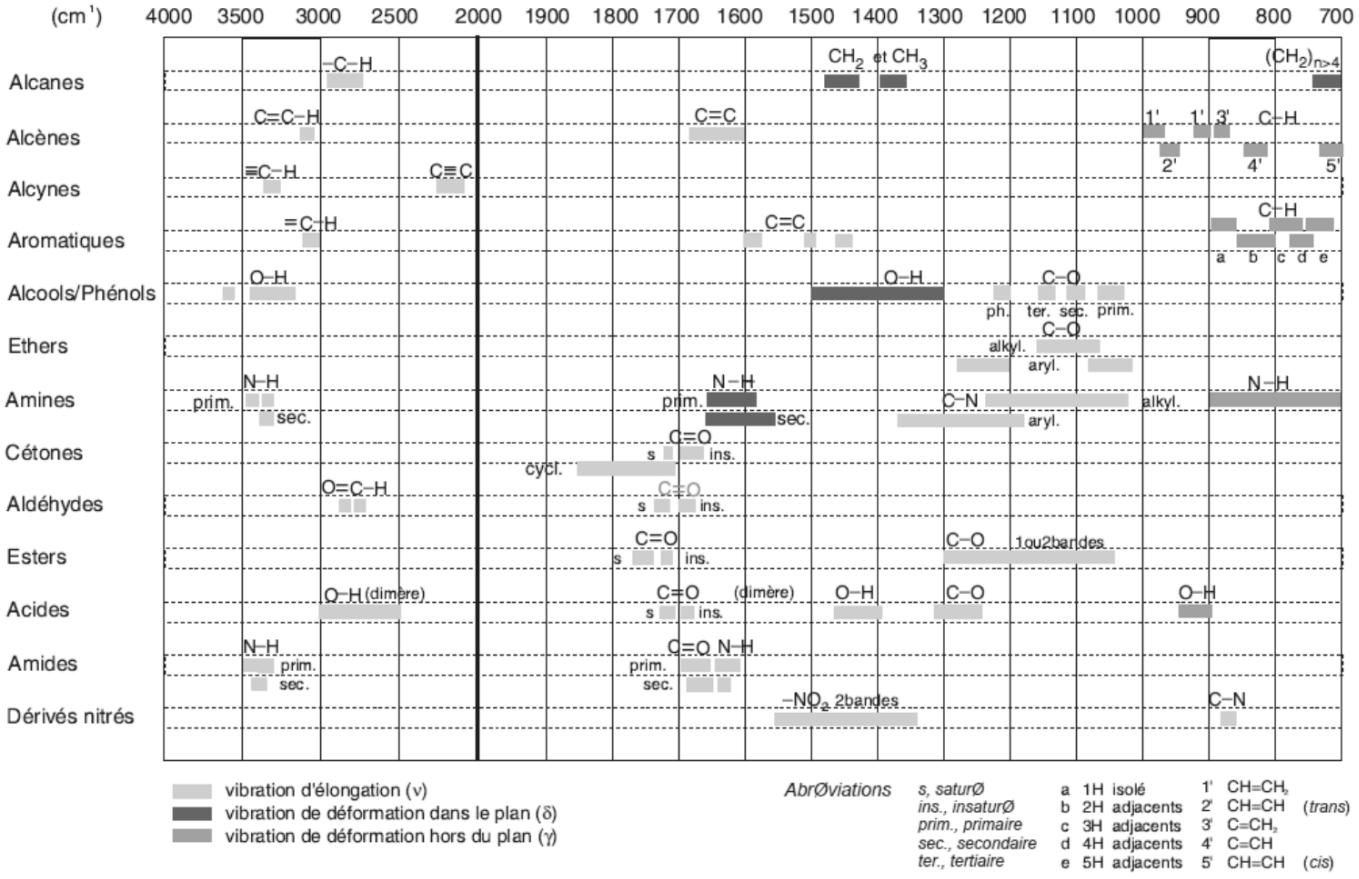
- Communications nationales et internationales

4th International Congress on Catalysis for Biorefineries (Catbior, 2017), Lyon, France
Semhaoui I., Zarguili I., Rezzoug S.A., Maugard T., Zhao J.M.Q., Toyir J., Nawdali M., Maache-Rezzoug Z. Effect of dilute acid impregnation by spraying or soaking combined to steam pretreatment of hemp hurds. Communication écrite.

2ème Journées de Procédés pour l'Energie et l'Environnement (JP2E, 2016), Taza, Maroc
Semhaoui I., Zarguili I., Rezzoug S.A., Maugard T., Zhao J.M.Q., Toyir J., Nawdali M., Maache-Rezzoug Z. Valorisation de l'alfa (stipa tenacissima) par prétraitement thermomécanique DIC (détente instantanée contrôlée) combinée à un catalyseur chimique en vue de la production du bioéthanol. Communication orale.

24th European Biomass Conference and Exhibition (EUBCE, 2016), Amsterdam, Pays-Bas
Semhaoui I., Zarguili I., Rezzoug S.A., Maugard T., Zhao J.M.Q., Toyir J., Nawdali M., Maache-Rezzoug Z. Intensification of hemp hurds hydrolysis by combined steam-explosion toward vacuum and alkali or dilute-acid spraying pretreatment. Communication orale.

Colloque du Génie des Procédés au Service de l'Environnement (GPSE, 2015), Fès, Maroc
Semhaoui I., Zarguili I., Rezzoug S.A., Maugard T., Zhao J.M.Q., Toyir J., Nawdali M., Maache-Rezzoug Z. Prétraitement de la biomasse lignocellulosique par DIC (Détente Instantanée Contrôlée) combiné à l'acide dilué en vue de la production de bioéthanol. Communication écrite.

Annexes

Corrélation dans le moyen infrarouge entre groupes fonctionnels et bandes d'absorption