



HAL
open science

Approche intégrée du procédé de rouissage des fibres de chanvre : Vers une amélioration de la qualité des intrants pour la fabrication des matériaux biocomposites

Brahim Mazian

► To cite this version:

Brahim Mazian. Approche intégrée du procédé de rouissage des fibres de chanvre : Vers une amélioration de la qualité des intrants pour la fabrication des matériaux biocomposites. Biomatériaux. IMT - MINES ALES - IMT - Mines Alès Ecole Mines - Télécom, 2018. Français. NNT : 2018EMAL0006 . tel-03019451

HAL Id: tel-03019451

<https://theses.hal.science/tel-03019451>

Submitted on 23 Nov 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR D'IMT MINES ALÈS

En Biomatériaux

École doctorale GAIA : Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche : Centre des Matériaux des Mines d'Alès (C2MA) & Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel (LGEI)

APPROCHE INTEGREE DU PROCEDE DE ROUISSAGE DES FIBRES DE CHANVRE : VERS UNE AMELIORATION DE LA QUALITE DES INTRANTS POUR LA FABRICATION DES MATERIAUX BIOCOSITES

Présentée par Brahim MAZIAN

Le 04 Décembre 2018

Sous la direction de Luc MALHAUTIER & Anne BERGERET

Devant le jury composé de

Johnny BEAUGRAND, Directeur de recherche, INRA de Nantes

Simon HAWKINS, Professeur, Université de Lille 1

Pierre OUAGNE, Professeur, INP- ENIT Tarbes

Marie-Laure FAUCONNIER, Professeur, Université de Liège

Anne BERGERET, Professeur, IMT Mines Alès

Luc MALHAUTIER, Maître-assistant HDR, IMT Mines Alès

Jean-Charles BENEZET, Maître de recherche HDR, IMT Mines Alès

Sandrine BAYLE, Maître-assistant, IMT Mines Alès

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président du jury

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Membre invité

Membre invité

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre deux laboratoires de l'IMT d'Alès (Laboratoire de Génie de l'Environnement Industriel (LGEI) et Centre des matériaux de l'école des mines d'Alès (C2MA)).

La thèse de doctorat est une expérience très enrichissante, une belle aventure humaine et scientifique. La curiosité, l'envie d'acquérir de nouvelles connaissances, l'écoute et l'échange sont les mots clés pour mener ce travail à terme.

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à Messieurs Johnny Beaugrand et Simon Hawkins d'avoir accepté de juger mes travaux en tant que rapporteurs. Je suis également très honoré et profondément reconnaissant envers Madame Marie-Laure Fauconnier et Monsieur Pierre Ouagne d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Par ailleurs, je tiens à remercier Hélène Carrere d'avoir accepté de juger mon travail lors de mes comités de thèse.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements et ma reconnaissance à mes directeurs de thèse : Monsieur Luc Malhautier et Madame Anne Bergeret pour leur confiance afin de mener à bien ce projet. Un grand merci à vous pour votre disponibilité, votre sympathie, votre aide, vos judicieux conseils qui m'ont permis d'effectuer cette thèse dans des conditions très favorables.

Je tiens à remercier également l'équipe d'encadrement : Monsieur Jean-Charles Bénézet et Madame Sandrine Bayle pour leurs remarques pertinentes, leur bon humour et leur gentillesse.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à l'association Chanvre Gardois CIVAM en particulier Madame Flavie Millet et Monsieur Matthieu Bournonville d'avoir mis à notre disposition une parcelle de terrain pour réaliser cette étude.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans certaines personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail. Pour cela, je remercie Stéphane Cariou, Mathilde Chaignaud, Janick Rocher, Benjamin Gallard, Alain Diaz, Loïc Dumazert, et Robert Lorquet. J'adresse également un grand merci à Monsieur Jean-Louis Fanlo pour nos discussions enrichissantes.

Trois ans de thèse sont pleins de souvenirs et de rencontres. Par crainte d'oublier certaines personnes, j'ai préféré de ne pas citer de noms. Je tiens ainsi à remercier tous mes amis et collègues soit au C2MA, LGEI ou LGI2P pour leur sympathie, leur gentillesse, et leur amitié. Merci à vous tous mes amis !!

Enfin, je ne saurais terminer ces phrases sans remercier l'équipe de l'ombre : mes parents, ma chérie et mes frères pour leur patience, leur confiance, leurs encouragements. Je ne pourrais jamais les remercier suffisamment pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Un grand MERCI à tous !!!

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	9
-----------------------------	---

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La culture du chanvre.....	15
1.1. Systématique et description du chanvre.....	15
1.2. Histoire de l'utilisation du chanvre.....	16
1.3. Culture et récolte de chanvre	18
1.4. Valorisation actuelle du chanvre	23
1.4.1. Graines pour l'industrie alimentaire	24
1.4.2. Fibres pour l'industrie des pâtes à papier et du papier, le textile, la construction et l'automobile	25
1.4.3. Chènevotte pour l'industrie de construction	27
1.4.4. Fleurs pour l'industrie des extraits de cannabidiol.....	28
2. Propriétés des fibres de chanvre.....	28
2.1. Structure et morphologie des tiges et des fibres.....	28
2.1.1. Tiges	28
2.1.2. Fibres	30
2.2. Composition biochimique des fibres de chanvre	32
2.2.1. Cellulose.....	32
2.2.2. Hémicelluloses	34
2.2.3. Lignine.....	35
2.2.4. Pectines.....	36
2.2.5. Composés lipophiles.....	37
2.2.6. Cendres	38
2.3. Propriétés mécaniques des fibres de chanvre	38
2.4. Propriétés physiques des fibres de chanvre.....	40
2.4.1. Densité.....	40
2.4.2. Dimension.....	40
3. Composites à base de fibres de chanvre.....	41
3.1. Généralités	41
3.2. Matrice.....	41
3.3. Renfort.....	42
3.4. Propriétés mécaniques des composites à base de fibres végétales	43
3.5. Verrous scientifiques et techniques freinant le développement des composites à base de fibres végétales.....	44
3.5.1. Stabilité thermique.....	44
3.5.2. Qualité de l'adhésion interfaciale entre les fibres et la matrice	45
4. Rouissage.....	46
4.1. Les différentes techniques de rouissage	46
4.1.1. Rouissage à l'eau	46

4.1.2.	Rouissage chimique et enzymatique	47
4.1.3.	Rouissage au champ	48
4.2.	Changements liés au traitement du rouissage	49
4.2.1.	Couleur	49
4.2.2.	Composition biochimique des fibres	50
4.2.3.	Cristallinité des fibres	51
4.2.4.	Propriétés thermiques des fibres	52
4.2.5.	Morphologie	52
4.2.6.	Propriétés mécaniques des fibres	53
4.2.7.	Communauté microbienne	54
4.2.8.	Emission de Composés Organiques Volatils (COV)	56
5.	Conclusions	59
	Références	62

CHAPITRE II : INFLUENCE DU ROUISSAGE EN CHAMP SUR LES PROPRIETES DES FIBRES DE CHANVRE RECOLTEES A DIFFERENTS STADES DU CYCLE DE VIE DE LA PLANTE

Introduction du chapitre	77
---------------------------------------	-----------

P-1/ Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering

Abstract	80
1. Introduction	81
2. Materials and methods	83
2.1. Raw material	83
2.1.1. Cultivation	83
2.1.2. Sampling and weather conditions	83
2.2. Experimental methods	85
2.2.1. Visual aspect	85
2.2.2. Microscopy observations	85
2.2.3. Biochemical analysis	85
2.2.4. X-Ray diffraction	88
2.2.5. Thermogravimetric analysis	88
2.2.6. Tensile test of fibre bundle	89
3. Results and discussion	89
3.1. Influence of field retting duration on the color of the hemp fibres	89
3.2. Influence of field retting duration on the biochemical composition of hemp fibres	91
3.3. Influence of field retting duration on the morphology of the hemp fibres	95
3.4. Influence of field retting duration on thermal stability of the hemp fibres	96
3.5. Influence of field retting duration on the tensile properties of the fibre bundles	100
4. Conclusion	102
Acknowledgements	103
References	103

P-2/ A comparative study of the effect of field retting time on the properties of hemp fibres harvested at different growth stages

Abstract	106
1. Introduction	106
2. Materials and methods	108
2.1. Raw material	108
2.1.1. Cultivation and sampling.....	108
2.1.2. Weather conditions.....	109
2.2. Experimental methods.....	111
2.2.1. Visual aspect.....	111
2.2.2. Microscopic observations.....	112
2.2.3. Biochemical analysis	112
2.2.4. X-Ray diffraction	113
2.2.5. Thermogravimetric analysis.....	113
2.2.6. Tensile test of fibre bundles	113
3. Results and discussion	114
3.1. Color change	114
3.2. Biochemical composition.....	116
3.3. Cellulose crystallinity.....	119
3.4. Thermal stability.....	120
3.5. Morphology.....	123
3.6. Tensile properties	125
4. Conclusions	129
Acknowledgements	130
References	131

CHAPITRE III : ETUDE DE LA DYNAMIQUE TEMPORELLE DES EMISSIONS DE COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COV) ET DES EMISSIONS ODORANTES PAR LES TIGES DE CHANVRE LORS DU ROUISSAGE EN CHAMP

Introduction du chapitre	137
Abstract	138
1. Introduction	139
2. Materials and methods	140
2.1. Raw material	140
2.1.1. Cultivation and sampling.....	140
2.1.2. Weather conditions.....	141
2.2. Experimental methods.....	143
2.2.1. Color	143
2.2.2. TD-GC-MS analyses	143
2.2.3. Olfactometric analyses	144
2.2.4. Odor intensity and quality	145
3. Results and discussion	146
3.1. Color change	146
3.2. VOCs identification and quantification.....	147
3.3. Odor evaluation.....	161

3.4. Odor quality	162
4. Conclusion	164
Acknowledgements.....	165
References.....	165

CHAPITRE IV : APPROCHE MICROBIOLOGIQUE DU ROUISSAGE

1. Introduction.....	173
2. Matériaux et méthodes.....	174
2.1. Prélèvements.....	174
2.2. Localisation de la biomasse dégradant la pectine.....	175
2.3. Dosage des pectines	176
2.4. Extraction et amplification de l'ADN.....	177
2.5. Principe de la qPCR.....	180
3. Résultats et discussion	181
3.1. Localisation de la communauté microbienne responsable de la dégradation de la pectine.	181
3.2. Densités de peuplement des communautés bactérienne et fongique	183
4. Conclusion.....	186
Références.....	187

CHAPITRE V : IMPACT DU ROUISSAGE EN CHAMP ET D'UN ROUISSAGE ACCELERE AU LABORATOIRE SUR LES PROPRIETES D'UN BIOCOMPOSITE POLYPROPYLENE /FIBRES DE CHANVRE

Introduction du chapitre.....	193
1. Introduction	194
2. Materials and methods.....	196
2.1. Raw materials	196
2.1.1. Hemp cultivation and sampling.....	196
2.1.2. Retting conditions	196
2.1.3. Weather conditions.....	198
2.1.4. Matrix.....	199
2.1.5. Composite material processing.....	199
2.2. Experimental methods.....	200
2.2.1. Biocomposite thermal stability.....	200
2.2.2. Mechanical characterization of biocomposites	200
2.2.3. Microstructure characterization of biocomposites	200
2.2.4. Microscopic observations.....	201
3. Results and discussion.....	201
3.1. Color of stems after different types of retting.....	201
3.2. Evolution of biocomposite thermal stability with hemp fibre retting.....	202
3.3. Change in biocomposite microstructure with hemp fibre retting	206
3.4. Evolution of biocomposite mechanical properties with the hemp retting.....	208
3.5. Effect of retting on fibre/matrix interfacial adhesion.....	212

4. Conclusion	213
Acknowledgements.....	214
Résultats supplémentaires et discussion	215
References.....	218
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	225

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGU	Anhydroglucose unit
ASTM	Standards élaborés par l'American Society for Testing Material
ATG/TGA	Analyse thermogravimétrique / Thermogravimetric analysis
CBD	Cannabidiol
CI	Indice de cristallinité
CIVAM	Association Chanvre Gardois
COV/VOC	Composés Organiques Volatils/ Volatile Organic compounds
DF/BF	Début de floraison/ Beginning of flowering
DRX	Diffraction de rayons X
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimétrie à balayage différentiel)
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique
EIHA	European Industrial Hemp Association
EL	Epidermis layer / couche d'épiderme
FNPC	Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre
FF/EF	Fin de floraison / End of flowering
GalA	Acide galacturonique
ICP	Inductively coupled plasma (Plasma à couplage inductif)
ISO	International Organization for Standardization
MEB/ESEM	Microscope électronique à balayage / Scanning electron microscopy
ML	Middle lamella (lamelle mitoyenne)
NIST	National Institute of Standards and Technology
PBS	Polybutylène succinate
PFL	Primary Fiber Layer / couche de fibres primaires ;
PC	Parenchyma cell
PMMA	Polyméthacrylate de méthyl
PP	Polypropylène
PPgMA	Polypropylène greffé anhydride maléique
PS/SM	Période de semence/Seed maturity
PVC	Polychlorure de vinyle
qPCR	(quantitative) Polymerase Chain Reaction
SFL	Secondary Fiber Layer (couche des fibres secondaires)
THC	Tétrahydrocannabinol
TD-GC-MS	Thermodésorption-chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
UO	Unité Odeur
UV	Ultraviolet
VS	Void space / Espace vide
Tf/tm	Température de fusion (unité : °C)
ΔH_c	Enthalpie de cristallisation (unité : J.g ⁻¹)
ΔH_m	Enthalpie de fusion (unité : J.g ⁻¹)

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications parues ou à soumettre dans des revues internationales à comité de lecture

P-1 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, L. Malhautier, “ Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering” Journal of Industrial Crops and Products. 2018; 116:170–81 DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.062.

P-2 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, L. Malhautier, “A Comparative study of the effect of field retting time on the properties of hemp fibres harvested at different growth stages” soumise dans «Fibers».

P-3 B. Mazian, S. Cariou, M. Chaignaud, J.L. Fanlo, A. Bergeret, L. Malhautier, “Evolution of temporal dynamic of Volatile organic compounds (VOCs) and odor of hemp stem during field retting” prochainement soumise dans « Planta».

P-4 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, L. Malhautier, “Impact of field retting and accelerated retting performed in a lab-scale pilot unit on the properties of hemp fibres/polypropylene biocomposites” prochainement soumise dans « Industrial Crops and Products »

Publications soumises dans des revues nationales à comité de lecture

P-1 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, S. Bayle, L. Malhautier, “Impact du rouissage en champ sur la structure de fibre de chanvre” soumise dans «Revue des Composites et des Matériaux Avancés »

Communications avec actes dans des congrès internationaux

ACTI-1 B. Mazian, A. Bergeret, J.L. Fanlo, J.C. Benezet, S. Cariou, S. Bayle, L. Malhautier, “Effect of dew retting of different harvesting periods on the hemp fibers quality” (3rd International conference on natural fibers. Braga-Portugal, June 21-23, 2017)

ACTI-2 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, S. Bayle, L. Malhautier, “Influence of Controlled Retting on the Quality of the Hemp Fibres Harvested at the Seed Maturity by Using a

Designed Lab-Scale Pilot Unit” ICFFM 2018: 20th International Conference on Fibers and Fibrous Materials. Istanbul-Turkey, September 06-07, 2018

Communications avec actes dans des congrès nationaux

ACTN-1 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, L. Malhautier, “The influence of field retting duration on the quality of the hemp fibers harvested at the beginning of flowering” (GDR3710-SYnthons et Matériaux BIOSourcEs- Montpellier – La Grande Motte, 29 Mai - 1er Juin 2017)

ACTN-2 B. Mazian, A. Bergeret, J.C. Benezet, L. Malhautier, “Influence du rouissage sur la microstructure, les propriétés biochimiques, thermiques et mécaniques des fibres de chanvre récoltées à différentes étapes de croissance de la plante.” 3ème édition des Journées Jeunes Chercheurs en Eco-composites et Composites Bio-sourcés. Tarbes – 15 et 16 Mars 2018.

INTRODUCTION GENERALE

Les termes Durabilité, Recyclage, Réduction, Valorisation, Renouvelable résument les préoccupations de l'Homme moderne face aux questions du réchauffement climatique et de la raréfaction des ressources de la planète. Les caractéristiques exceptionnelles des énergies fossiles ont fortement contribué au développement de nos sociétés industrialisées (Europe, Amérique du Nord) auxquelles se joignent désormais la Chine, l'Inde et le Brésil, pays à forte densité de population. Il est clair que la croissance démographique va induire, à court terme, un épuisement des ressources de la planète (énergies fossiles, eau, minerais et terres rares...). De fait, la sécurisation des sources d'approvisionnement devient un enjeu stratégique majeur dans toutes les régions du monde. Des alternatives à ce paradigme, caractérisé par la dépendance des secteurs industriels à l'utilisation de ces ressources, voient le jour. De nouvelles stratégies accompagnées de plans d'action se développent aux Etats-Unis et en Europe en faveur d'une bioéconomie durable [1]. Ces stratégies visent à faciliter l'avènement d'une société plus innovante, plus économe en ressources et plus compétitive qui concilie l'utilisation durable des ressources renouvelables à des fins industrielles tout en garantissant la protection de l'environnement. Dans ce cadre, la prise de conscience de la préservation de la planète a motivé chercheurs et industriels à élaborer de nouveaux matériaux issus de ressources renouvelables respectueux de l'environnement afin de limiter l'utilisation intensive des ressources fossiles.

Dans ce contexte, le marché des agro matériaux/biocomposites n'a cessé d'augmenter pendant ces dernières années avec une croissance annuelle comprise entre 8 et 10%. L'Europe constitue le second bassin de production des fibres végétales (214 000 tonnes) à usage industriel après le gigantesque bassin de production asiatique (2.5 millions de tonnes)[2][3]. Ces fibres issues de ressources renouvelables (chanvre, lin, kenaf...) sont de plus en plus utilisées en tant que renfort dans les matériaux composites en raison de leurs nombreux avantages par rapport aux fibres conventionnelles (verre, carbone). En effet, les fibres végétales présentent des propriétés mécaniques spécifiques (rapport entre la propriété mécanique considérée et la densité) identiques à celles des fibres de verre couramment utilisées pour le renfort des matériaux. Ainsi, Ces fibres végétales sont très intéressantes sur les plans économique et environnemental car elles sont légères et biodégradables/compostables. Ces avantages leur permettent d'offrir des solutions durables dans un large éventail d'industries dont le textile, la fabrication de produits de

consommation et les secteurs de l'automobile (panneaux de porte, panneaux de garniture de toit, doublure de démarrage, banquette arrière) et de la construction (béton de chanvre, laine isolante).

Cependant, la variabilité des caractéristiques intrinsèques des fibres végétales en termes de propriétés physico-chimiques, de stabilité thermique et de propriétés mécaniques d'une part et la qualité de l'interface entre les fibres et la matrice d'autre part, limitent leur utilisation dans la fabrication de composants structurels. Différents facteurs dont la variété cultivée, les conditions de croissance (nature du sol, conditions météorologiques), les processus traditionnels d'extraction et de séparation peuvent être à l'origine de cette variabilité.

La fibre de chanvre a fait l'objet de nombreux travaux de recherche et possède des propriétés compatibles avec une utilisation dans le cadre de la fabrication de matériaux biocomposites. Cette fibre subit un traitement de rouissage (première étape de transformation dans les champs) qui consiste à couper et mettre les tiges de chanvre en contact avec le sol, où elles sont colonisées par des microorganismes (micromycètes et bactéries) produisant notamment des enzymes pectinolytiques. Ce développement microbien entraîne l'élimination de certains composés dits « ciments naturels » qui assurent le lien entre les faisceaux de fibres. Ce traitement de rouissage est réalisé à l'heure actuelle de manière empirique et les fibres obtenues ne possèdent pas de manière homogène les caractéristiques requises en termes de couleur, de microstructure, de composition biochimique et de propriétés thermiques et mécaniques pour répondre aux exigences des industriels.

Afin de lever ces verrous technologiques, l'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans le développement d'une approche globale de cette étape-clé de la transformation des fibres végétales en combinant à la fois l'étude du mécanisme biologique du rouissage, celle des caractéristiques intrinsèques des fibres et celle des émissions gazeuses associées à l'étape de rouissage.

Ce travail de thèse présenté dans ce document est organisé en cinq chapitres :

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique des différents aspects inhérents à la problématique du rouissage du chanvre pour une utilisation des fibres dans l'élaboration de matériaux composites. Cette partie rappelle tout d'abord le contexte de la culture du chanvre, son histoire, sa valorisation et ses applications. La structure, la

composition biochimique ainsi que les propriétés physiques et mécaniques des fibres de chanvre sont ensuite détaillées. L'utilisation des fibres de chanvre en tant que renfort dans les matériaux composites est ensuite présentée avant d'aborder les avantages puis les verrous scientifiques et techniques limitant le développement de ces biocomposites. Ce chapitre présente également la mise en œuvre du rouissage, ses effets sur les caractéristiques intrinsèques des fibres végétales, les mécanismes biologiques du rouissage ainsi que les émissions de composés organiques volatils et d'odeurs liées à cette pratique.

Le deuxième chapitre se focalise sur l'étude des caractéristiques intrinsèques des fibres de chanvre (couleur, morphologie, composition biochimique, microstructure, propriétés mécaniques, propriétés thermiques). Il est divisé en deux parties :

- L'impact de la durée de rouissage en champ sur les propriétés intrinsèques des fibres de chanvre récolté au début de la floraison a été dans un premier temps étudié. Ce travail a été valorisé par une publication **P-1 (parue dans Industrial Crops and Products en 2018)**,
- Une étude comparative de l'effet du rouissage sur les propriétés des fibres de chanvre récoltées à différents stades de croissance (début de floraison, fin de floraison et la période de semence) a été également examinée. Ce travail a fait l'objet d'une publication **P-2 (soumise à Composites Part A)**.

Le troisième chapitre consiste à étudier la dynamique temporelle des émissions de composés organiques volatils (COVs) et des odeurs par les tiges de chanvre pendant le rouissage en champ. Ce travail est présenté sous la forme d'une publication **P-3 (à soumettre)**

Le quatrième chapitre est dédié à une approche microbiologique du procédé de rouissage. Il n'a pas été possible d'étudier en détail les mécanismes biologiques du rouissage. Deux aspects ont été cependant abordés dans ce chapitre : i) la localisation du/des compartiment(s) (sol, système racinaire, tige) responsables de la dégradation des pectines ; ii) la dynamique temporelle des densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques se développant sur les tiges de chanvre pendant le rouissage en champ en fonction de la période de récolte (fin de floraison et période de semence).

Le cinquième et le dernier chapitre, évalue l'impact du rouissage sur les propriétés (propriétés mécaniques, stabilité thermique, taux de cristallinité) d'un matériau composite

renforcé par les fibres de chanvre récoltées en fin de floraison et ayant différents degrés de rouissage en champ, en lien avec les caractéristiques intrinsèques des fibres de chanvre décrites dans les chapitres précédents. Une analyse comparative est effectuée avec un matériau composite renforcé par des fibres de chanvre récoltées en période de semence et rouies artificiellement dans des enceintes contrôlées en humidité et température. Cette partie du travail de thèse a fait l'objet de la publication **P-4 (à soumettre)**.

Références

- [1] Staffas L, Gustavsson M, McCormick K. Strategies and Policies for the Bioeconomy and Bio-Based Economy: An Analysis of Official National Approaches. *Sustainability* 2013;5:2751–69.
- [2] Lampinen J., Trends in bioplastics and biocomposites. Developments in advanced Biocomposites. Eds Harlin, A., Vikman, M. VTT Technical Research Centre of Finland 2010, Finland, 12-20 n.d.
- [3] Fernandez Tendero E. Origines biologiques et environnementales de la variabilité de la qualité des fibres de chanvre (*Cannabis sativa L.*) à destination d'agromatériaux 2010; PhD. n.d.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La culture du chanvre

1.1. Systématique et description du chanvre

Le chanvre est une plante herbacée annuelle appartenant au groupe des dicotylédones. A l'état naturel, cette plante est dioïque i.e. fleurs mâles et fleurs femelles fleurissent sur des pieds séparés. Or, les pieds mâles sont moins productifs en fibres, ne produisent pas de graines et meurent au sein du champ avant les pieds femelles. Par conséquent, l'amélioration génétique du chanvre a conduit à la création de variétés monoïques qui possèdent des fleurs mâles et femelles sur le même pied et qui sont plus faciles à cultiver. Toutefois, aujourd'hui, le choix de la variété dépend de l'origine géographique de la culture.

La plante du chanvre qui appartient à la famille Cannabinacées ou Cannabacées a été classifiée selon différents critères. Cronquist. [1] a rattaché cette famille à l'ordre des urticales. En revanche, des études récentes fondées sur la phylogénie moléculaire des gènes de la RuBisCo (ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase, enzyme clé dans la fixation carbonée) ont abouti à une nouvelle classification des Cannabinacées dans l'ordre des Rosales [2]. Ce groupe rassemble également d'autres plantes riches en fibres corticales (ramie, lin, ortie...). Au-delà de ces classifications des Cannabinacées, le chanvre est constitué d'un seul genre *Cannabis* associée à une espèce *Cannabinus sativa*, qui se subdivise en trois groupes :

- *Cannabinus ruderalis* : forme sauvage,
- *Cannabinus indica* L: plante connue par ses effets psychotropes due à la présence de la teneur élevée de tétrahydrocannabinol THC,
- *Cannabis sativa* : chanvre industriel source de fibres corticales.

Plus récemment, Bouloc. [3] a proposé de distinguer seulement deux espèces au sein du genre *Cannabis* avec *Cannabinus indica* L et *Cannabinus sativa* L, cette dernière se subdivisant en deux sous-espèces, *Cannabinus sativa ssp spontanea* pour la forme sauvage et *Cannabinus sativa ssp culta* pour les variétés cultivées pour une exploitation industrielle.



Figure I.1. La plante du chanvre

1.2. Histoire de l'utilisation du chanvre

Le chanvre est une des plantes les plus abondamment cultivées depuis de nombreuses décennies. Les premières traces d'utilisation du chanvre remontent à plus de 10 000 ans avant J.C au sein de l'île de Taiwan située au large de la Chine continentale.

Des restes de tissus de chanvre qui datent de 8000 avant J.C en Mésopotamie ont été également identifiés. Dans la Chine ancienne, des traces de graines de chanvre et d'extraits de chanvre utilisés comme aliments datant de 6 000-4 000 av. J.C. ont été découverts par les archéologues. A cette époque, les chinois fabriquaient leurs vêtements à partir de chanvre tissé et utilisaient la fibre robuste pour fabriquer des chaussures. Les manuscrits anciens sont remplis de passages exhortant la population à planter du chanvre pour se vêtir. La Chine est un producteur historique de chanvre, néanmoins, des tissus de chanvre ont été également trouvés en Suisse, Autriche, Irlande, Grèce et Turquie et sont datés de 2500 avant J.C [3,4].



Figure I.2. Le travail du chanvre en Chine continentale [5]

En France, au XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles, le chanvre est largement utilisé pour fabriquer les cordages, les câbles, les échelles et les haubans, ainsi que les voiles. A cette période, les cordes de la marine royale de Rochefort, fondée en 1666 par Colbert, étaient faites en chanvre (figure I.3). Les voiles et les cordages de l’Hermione (frégate de 1779) (figure I.4), sur laquelle a embarqué le marquis de Lafayette en 1780 pour soutenir la guerre de l’Indépendance des américains contre les anglais, sont constitués de chanvre.



Figure I.3. Le travail du chanvre au XVII^{ème} siècle [4]



Figure I.4. Frégate L'Hermione [6]

A la fin du XIX^{ème} siècle et dans la première moitié du XX^{ème} siècle, les surfaces cultivées de chanvre diminuent de manière vertigineuse (plus de 70% des surfaces de chanvre cultivées) [3]. A titre exemple, en France, 176 000 hectares sont cultivés en 1840, tandis qu'en 1939, la superficie cultivée n'est plus que de 3 400 hectares. Ce déclin rapide du chanvre est lié à l'apparition du coton (*Gossypium herbaceum*) qui séduit l'industrie du textile, le remplacement des cordages traditionnels par les câbles métalliques et le début de l'ère pétrochimique avec le polyamide, le polyester et le polypropylène utilisés pour la fabrication de tissus techniques et présentant une résistance à la rupture élevée.

Pendant la seconde guerre mondiale, la culture de chanvre destinée à la fabrication de cordages pour la marine de guerre est encouragée aux Etats-Unis. Le gouvernement américain relance la production de fibres de chanvre et réalise même un film de propagande intitulé « Hemp for Victory » (Le chanvre pour la Victoire). Mais la seconde guerre mondiale terminée, la production du chanvre a été définitivement interdite aux Etats-Unis.

Aujourd'hui, avec l'augmentation du prix du pétrole, les obligations de recyclage de la matière et la prise de conscience de la protection de l'environnement, le chanvre est devenu une alternative grâce à ses atouts en termes de ressources et de disponibilité et grâce au savoir-faire acquis dans le temps. Plusieurs pays (France, Allemagne, Australie, Canada, Pologne, Tchéquie, Ukraine et Chine) ont subventionné des programmes de culture de variétés de chanvre monoïques non psychotropes.

1.3. Culture et récolte de chanvre

Selon l'European Industrial Hemp Association (EIHA), la culture de chanvre a connu une augmentation de 14 000 ha depuis 2012 pour atteindre plus de 42 500 ha en 2017 (figure I.5), soit un taux de croissance de 33% pour la culture européenne du chanvre. Aujourd'hui,

la France est le premier producteur de chanvre en Europe avec presque 17 000 hectares de surface cultivée, suivie par l'Estonie et l'Italie. Le cycle de la culture de chanvre est relativement rapide, varie entre 120 à 150 jours et il s'intègre facilement dans les parcours culturaux des agriculteurs. Le chanvre est sensible à la photopériode, il est donc préférable de semer dès que possible au printemps afin d'obtenir des plants plus hauts ayant un meilleur rendement en fibres. En général, le semis se fait en avril jusqu'à début mai et la récolte des graines est réalisée en septembre (figure I.6).

Hemp Cultivation Area in the EU (ha) 2017: ca. 42,500 ha

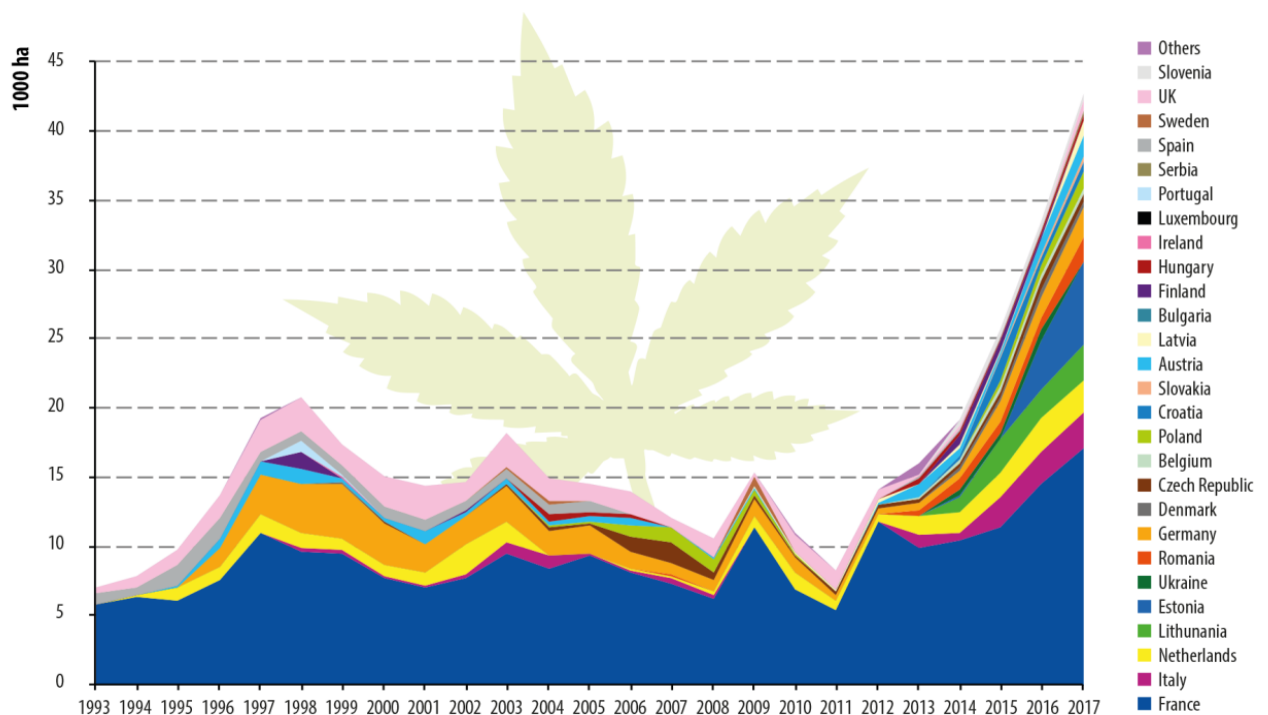


Figure I.5. La culture de chanvre en Europe [7]

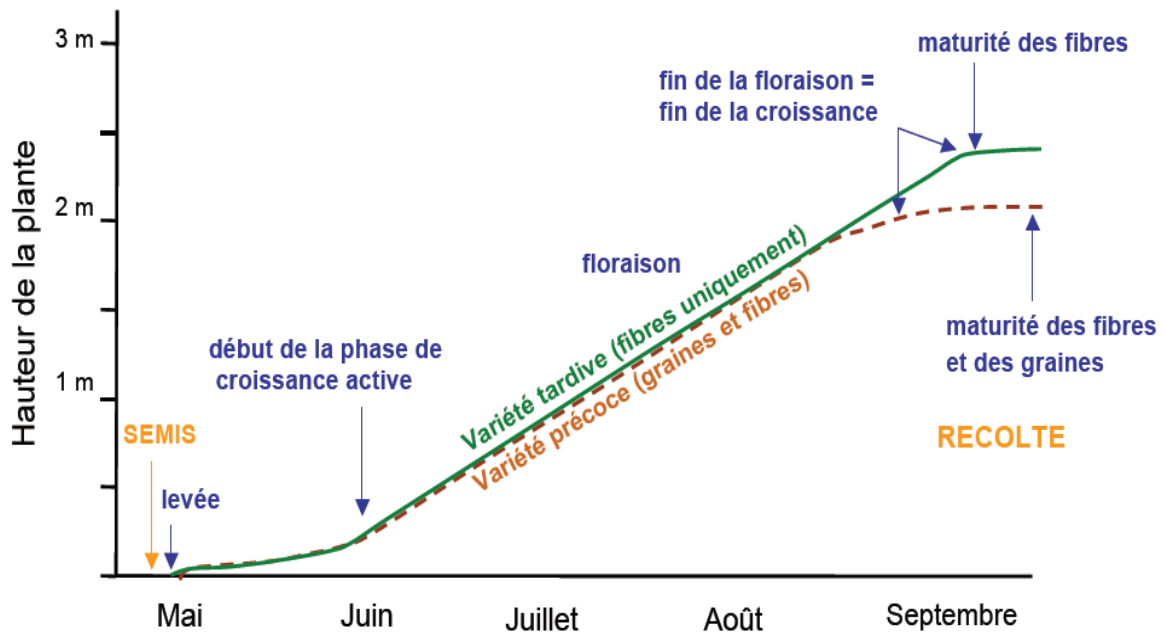


Figure I.6. Croissance du chanvre, exemple d'un semis réalisé début mai [8]

En France, le chanvre est cultivé dans différents types de sols (figure I.7). Plus de 70% du chanvre cultivé sont implantés sur des limons argileux (17%), des argilo-calcaires (23%) et des craies de Champagne (29%). Le chanvre est donc une plante plutôt rustique.

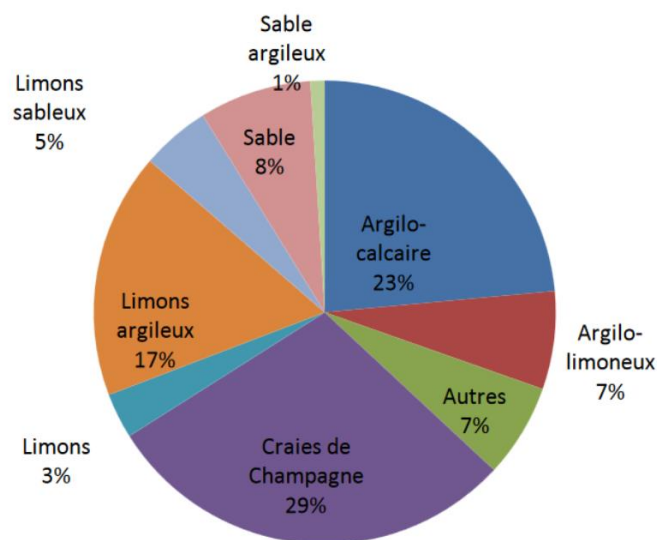


Figure I.7. Type de sols où le chanvre est cultivé en France en 2016 [9]



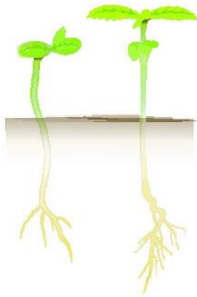







Il existe plusieurs variétés de chanvre industriel qui sont caractérisées par des degrés de précocité, de rendement de paille, de teneur en fibres, de taille des graines et de teneur en huile, etc. On distingue les variétés qui fleurissent tôt (variétés précoces), et celles qui fleurissent plus tard (variétés tardives) (figure I.6). Certaines variétés ont des usages

multiples. Ces variétés contiennent moins de 0,3% de concentration de THC contrairement aux cultivars de marijuana qui contiennent 3 à 15% de THC. Le tableau I.1 présente quelques variétés de chanvre inscrites aux catalogues français. Ces variétés sont commercialisées en France par la Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre (FNPC).

**Tableau I.1. Variétés de chanvre inscrites aux catalogues français
(1) essais agronomiques ITC, 2007-2009, (2) Picault S., 2004 - Expérimentation «
chanvre » : Bilan et perspectives**

Variétés	Type	Précocité	Année	Rendement paille t/ha	Teneur en fibre (%)	Rendement graine Qx/ha
Uso 31	<i>Monoïque</i>	<i>Très précoce</i>		<i>+ (1)</i>	<i>36.4 (1)</i>	<i>++ (1)</i>
Férimon	<i>Monoïque</i>	<i>Précoce</i>	<i>1981</i>	<i>++ (1)</i>	<i>32.1 (1)</i>	<i>+++ (1)</i>
Fédora 17	<i>Monoïque</i>	<i>Précoce</i>	<i>1998</i>	<i>++ (1)</i>	<i>29.4 (1)</i>	<i>+++ (1)</i>
Félina 32	<i>Monoïque</i>	<i>Moyenne</i>	<i>1998</i>	<i>++ (1)</i>	<i>31.0 (1)</i>	<i>+++ (1)</i>
Santhica 27	<i>Monoïque</i>	<i>Moyenne</i>	<i>2002</i>	<i>++ (1)</i>	<i>36.81 (1)</i>	<i>++ (1)</i>
Epsilon 68	<i>Monoïque</i>	<i>Tardive</i>	<i>1996</i>	<i>++ (1)</i>	<i>30.6 (1)</i>	<i>+++ (1)</i>
Futura 75	<i>Monoïque</i>	<i>Tardive</i>	<i>1998</i>	<i>+++ (1)</i>	<i>31.2 (1)</i>	<i>++ (1)</i>
Santhica 23	<i>Monoïque</i>	<i>Moyenne</i>	<i>1996</i>	<i>++</i>	<i>35.85</i>	<i>++</i>
Félina 34	<i>Monoïque</i>	<i>Moyenne</i>	<i>1974</i>	<i>++ (2)</i>	<i>30.60 (2)</i>	<i>++ (2)</i>
Santhica 70	<i>Monoïque</i>	<i>Tardive</i>	<i>2007</i>	<i>+++ (1)</i>	<i>36.8 (1)</i>	<i>++ (1)</i>
Dioica 88	<i>Dioïque</i>	<i>Très tardive</i>	<i>1998</i>	<i>++ (2)</i>	<i>32.0 (1)</i>	<i>+ (1)</i>

Différents repères pendant la croissance de la plante ont été identifiés, du semis à la maturité de la plante (tableau I.2). Le stade de pleine (ou fin) floraison indique le degré de précocité du chanvre. En général, la croissance de la plante du chanvre s'arrête après le stade de « fin de floraison ». Les graines arrivent ensuite à maturité progressivement du bas vers le haut de la tige. La récolte des tiges se fait à la période de la maturité de la plante après que les agriculteurs aient récupéré les graines. Certains travaux (Mediavilla et al. [10] ; Keller et al. [11]) ont rapporté que la structure des fibres diffère selon le degré de maturité de la plante. La récolte de début à fin de floraison conduit à un rendement maximal de fibres. En revanche, la récolte à la période de semence n'affecte pas la résistance à la traction des fibres. De plus, la décortication mécanique à partir des tiges non-rouies récoltées pendant la période de semence est favorisée.

Stade de croissance	Période de l'année	
Semis 	début avril à début mai	
Levée 	mi-avril à mi-mai	
Implantation 	avril/mai	
Croissance active 	mai à fin juillet	
Début floraison 	fin juillet à début août	







		
<p>Pleine / fin floraison</p> 	<p>mi-août à fin août</p>	
<p>Maturité</p> 	<p>fin août à fin septembre selon le mode de culture</p>	

Tableau I.2. Stades de croissance du chanvre

1.4. Valorisation actuelle du chanvre

L'intégration des considérations environnementales et les besoins urgents de produits verts et durables favorisent la renaissance de la culture du chanvre. Le chanvre industriel a un marché mondial d'environ 25 000 produits à base de chanvre dans différents sous marchés tels que les aliments pour animaux, les meubles, les textiles, l'automobile, les matériaux de construction et le papier [12,13] (figure I.8).

Les données de base sur la culture et la transformation du chanvre donnent un bon aperçu de l'économie du chanvre. Sur les 15700 ha de chanvre récoltés en Europe en 2013, 25000 tonnes de fibres, 43000 tonnes de chènevotte, 1500 tonnes de graines et 240 tonnes de fleurs et de feuilles ont été obtenues. Environ 25% de la production actuelle de chanvre est utilisée pour l'isolation. Ces différents produits directs ou dérivés de la culture du chanvre sont détaillés dans les paragraphes ci-dessous.

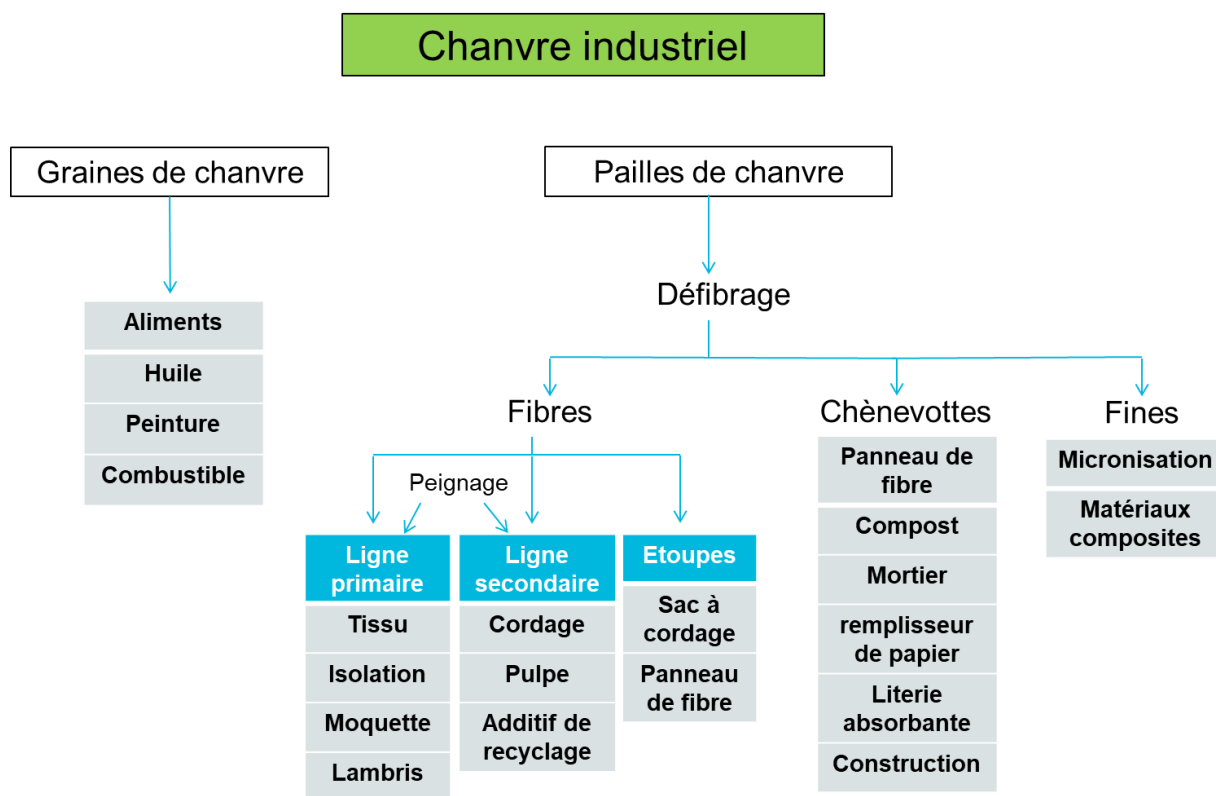


Figure I.8. Diagramme des produits potentiels à base de chanvre [14]

1.4.1. Graines pour l'industrie alimentaire

Les graines de chanvre appelées chènevis (figure I.9) jouent une contribution importante dans l'économie mondiale du chanvre. Bien que le chanvre ait été produit initialement pour la production de fibres, cette plante devient une culture alimentaire émergente.

Les chènevis répondent à une demande spécifique du marché de la part de personnes qui accordent une attention particulière à leur santé, préférant un approvisionnement alimentaire sans pesticides. Une autre raison est la haute valeur nutritionnelle des graines qui contiennent des protéines digestes et l'huile obtenue après le pressage des chènevis est riche en acides gras oméga-3 et oméga 6 GLA (Acides Gamma Linoléique). Sa composition en acides gras particulière est très appréciée par les oiseaux et les poissons. De plus, les composés antioxydants tels que les polyphénols apportent une valeur nutritionnelle supplémentaire en réduisant le risque de maladies chroniques (cancer, troubles neurodégénératifs et hypertension) [15,16]. Le broyage des graines permet d'obtenir la farine de chanvre, sans gluten ou des protéines auxquelles certaines personnes présentent une intolérance. En 2016, les données de l'EIHA (European Industrial Hemp Association)

ont montré une production européenne globale de 11 500 tonnes de graines, contre 6 000 tonnes en 2010.



Figure I.9. Chènevis de chanvre [17]

1.4.2. Fibres pour l'industrie des pâtes à papier et du papier, le textile, la construction et l'automobile

Les fibres de chanvre sont peu utilisées dans l'industrie textile. Toutefois, le taux de production de fibres de chanvre est presque trois fois plus élevé que celui des fibres de coton. En effet, 1,35 tonnes de fibre de coton sont produites par hectare, tandis que le chanvre produit 3 tonnes de fibres par hectare. De plus, 9 800 litres d'eau sont nécessaires pour la culture et le traitement de 1 kg de fibres de coton, alors que la culture du chanvre nécessite en moyenne environ 2 200 litres d'eau par kilogramme de fibres, soit quatre fois moins que le coton [18]. Enfin, selon la « Environmental Justice Foundation », la culture du chanvre ne nécessite pas l'utilisation d'insecticides contrairement à la culture du coton. En effet, l'implantation rapide de la plante lui permet de recouvrir rapidement la surface du sol ce qui limite ainsi l'émergence de plantes adventices et donc le traitement par des herbicides [4].

Les fibres de chanvre, sous forme de textiles ou même de non tissés, sont utilisées à hauteur de 15% de leur production en tant que renfort dans les biocomposites destinés aux applications automobiles (figure I.10)[15]. Les applications concernent principalement des pièces intérieures de véhicule qui sont sous forme de composants non structurels tels que les intérieurs de portes, dossiers ou tableaux de bord. L'utilisation de composites renforcés de fibres végétales dans les véhicules peut permettre un gain de masse global de 10% pour

des performances mécaniques équivalentes à celles des composites traditionnels [19]. En plus, la fabrication des composites renforcés de fibres végétales nécessite seulement 60% d'énergie par rapport à celle requise pour les composites à fibres synthétiques [20]

Cependant, l'utilisation des composites renforcés de fibres de chanvre pour des composants structurels est encore limitée due à la variabilité des propriétés des fibres de chanvre et le manque de compatibilité entre les fibres et la matrice.

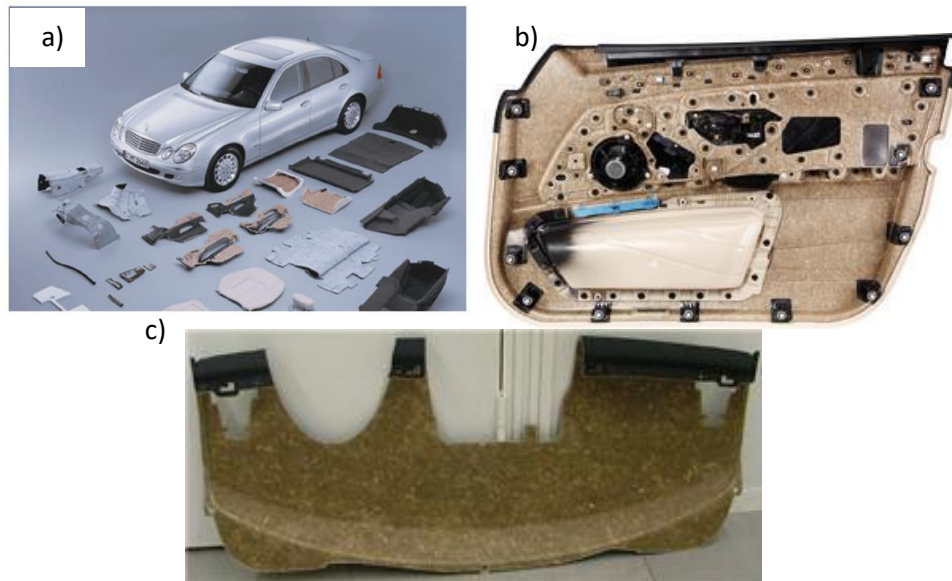


Figure I.10. Pièces intérieures de véhicules de constructeurs allemands (Mercedes E-class (a)[21] Panneau de porte en composites à fibres naturelles b)[22], c) Planche de bord de Smart

Les fibres de chanvre sont également transformées en laines isolantes qui sont de plus en plus utilisées dans le secteur de construction pour isoler le toit, les murs, les rampants et les planchers (figure I.11).

Enfin, environ 60% de fibres de chanvre sont utilisées dans l'industrie de la pâte à papier et du papier, dont la production de cigarettes, la fabrication de papier bible et la fabrication de billets de banque. Cette part du marché de fibres de chanvre est en déclin par rapport aux nouvelles applications de l'automobile et de la construction.



Figure I.11. La laine de chanvre [23]

1.4.3. Chènevotte pour l'industrie de construction

La plus grande partie de la production actuelle de chènevotte est destinée à la construction et à la litière des animaux [12]. La chènevotte est mélangée à un liant à base de chaux permettant de fabriquer des bétons de chanvre qui présentent des caractéristiques spécifiques et performantes. Ces bétons de chanvre sont utilisés pour la réalisation des murs, l'isolation (sous-toiture) ou encore l'isolation de sol (figure I.12).



Figure I.12. Application du chanvre dans le bâtiment [24]

1.4.4. Fleurs pour l'industrie des extraits de cannabidiol

Les inflorescences de chanvre contiennent un nombre important de composés organiques tels que les alcools, les esters, les stéroïdes, les terpènes, les diols et les cannabinoïdes dont le cannabidiol. [25].

Les industries pharmaceutiques et de fabrication de compléments alimentaires s'intéressent de plus en plus au cannabidiol (CBD). De nombreuses études scientifiques ont révélé des effets des cannabinoïdes sur le système nerveux, certains seraient préconisés comme anti-inflammatoires et d'autres présenteraient une activité anticancéreuse. Par exemple, El-Alfy et al. [26] ont constaté que les cannabinoïdes peuvent avoir une action antidépressive et Rock et al. [27] ont constaté qu'ils pouvaient atténuer significativement les vomissements et les comportements nauséux [27].

L'industrie du CBD est actuellement un marché en pleine croissance. L'EIHA indique qu'une production de 240 tonnes de feuilles et de fleurs en 2016 (soit + 3200% depuis 2010) a été utilisée pour des applications médicales (THC et CBD), la fabrication de compléments alimentaires (CBD) et la production d'huiles essentielles.

L'industrie du CBD en Europe et en Amérique du Nord représenterait un marché de 2 milliards d'euros dans les prochaines années. Bien que les avantages du cannabis médical soient rapportés dans de nombreuses études scientifiques, les pays d'Europe sont encore très fermés à l'usage de ce composé en tant que médicament. Les Pays-Bas est le seul pays ayant une industrie active du cannabis médical [28].

2. Propriétés des fibres de chanvre

2.1. Structure et morphologie des tiges et des fibres

2.1.1. Tiges

Les tiges de chanvre peuvent atteindre 2 à 4 m de haut et environ 1 à 3 cm de diamètre [3]. Comme celles des Dicotylédones, les tiges de chanvre sont constituées, de la périphérie vers le centre, de l'épiderme, du cortex (appelé aussi parenchyme cortical ou écorce), du phloème (qui contient les fibres primaires et secondaires), du cambium, du xylème (appelé aussi le bois) et d'une lacune [29–31] (figure I.13).

L'épiderme est la première barrière d'échange et de protection de la plante. Il est constitué d'une assise cellulaire qui peut être parfois interrompue par des glandes sécrétrices ou des

poils sécréteurs. L'épiderme a pour principales fonctions de protéger la plante contre les agents pathogènes et contre la déshydratation (limiter les pertes d'eau par évaporation).

Les fibres corticales (également appelées fibres techniques) sont entourées de cellules parenchymateuses à parois minces. Ces cellules contiennent beaucoup de chlorophylle, de pectines et de lignine. La couche de fibres corticales contient entre 15 et 40 faisceaux de fibres. Chacun de ces faisceaux est composé de plusieurs fibres élémentaires.

La couche de cambium est l'assise cellulaire génératrice des tissus conducteurs : du xylème vers le centre de la tige et du phloème vers l'extérieur i.e. à l'interface entre le xylème et le phloème. Le cambium produit des tissus secondaires pour transporter les nutriments.

Le noyau ligneux est composé d'un tissu de bois externe, le xylème et la moelle, qui entourent le canal central de la tige.

La morphologie de la tige peut varier en fonction des conditions de culture (date de semis et densité de semis), du temps de la récolte et des conditions climatiques [30,32]. Une densité de semis faible favorise la mise en place de ramifications, les plantes sont moins grandes et présentent une plus forte croissance en épaisseur. En revanche, une densité de semis élevée entraîne une diminution de l'épaisseur des couches de la section transversale de la tige et par voie de conséquence, les tiges sont plus fines et plus hautes. Le même phénomène est observé en période de sécheresse [30]. En outre, Schäfer et Honermeier. [30] ont rapporté également que la proportion de fibres secondaires dépend des conditions météorologiques.

Même si cette organisation de la tige n'est pas modifiée lors des différents stades de développement de la plante, des variations des différentes parties de la section transversale de la tige sont observées [10,29,30]. A titre d'exemple, les fibres secondaires commencent à apparaître en début de floraison et tendent à se développer durant la croissance de la plante.

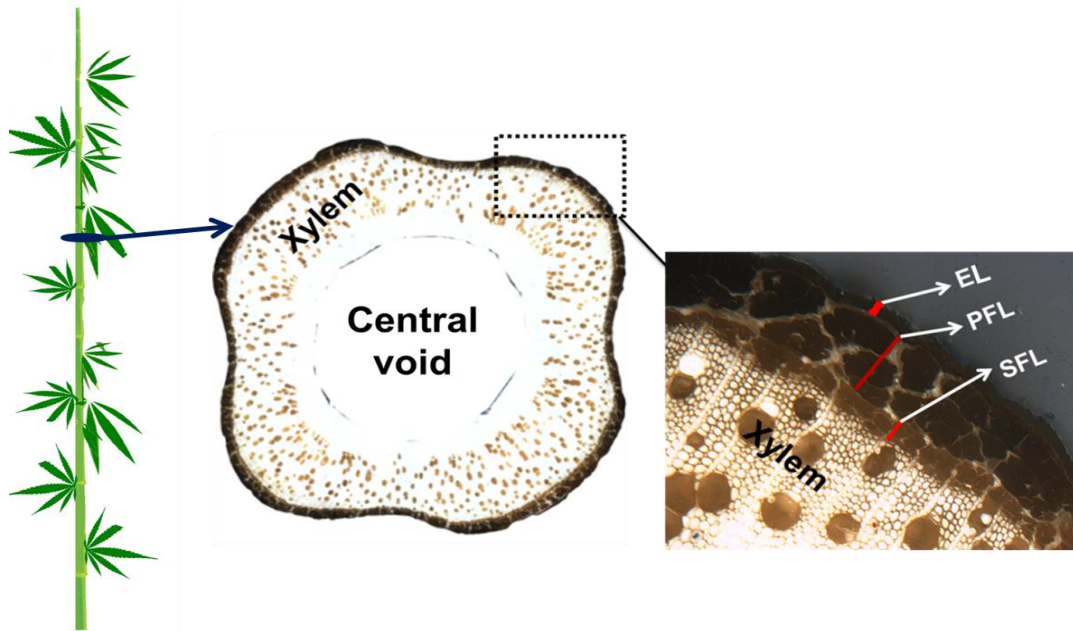


Figure I.13. Section transversale d'une tige de chanvre (epidermis layer EL : couche d'épiderme ; PFL(Primary Fiber Layer) : couche de fibres primaires ; SFL (Secondary Fiber Layer): couche des fibres secondaires; central void : lacune ; Xylem : Xylème

2.1.2. Fibres

a) Faisceaux de fibres

A la périphérie de la tige, des faisceaux (figure I.14) de fibres sont situés dans le phloème. Ces faisceaux ont une longueur de plusieurs dizaines de centimètres. Ils sont constitués de 30 à 40 fibres élémentaires assemblées entre elles par une interphase à base de polysaccharides amorphes (notamment des pectines), appelée lamelle mitoyenne. Les tiges de chanvre sont caractérisées par la présence de faisceaux de fibres secondaires qui sont plus minces (figure I.13) et plus lignifiées que les fibres primaires [29,33,34].

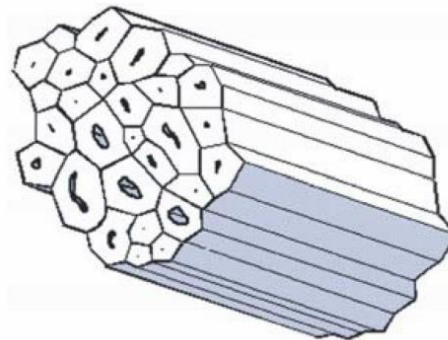


Figure I.14. Faisceaux de fibres [35]

b) Fibres élémentaires

Une fibre élémentaire de chanvre est un matériau multicouche composé de parois cylindriques concentriques (figure I.15). Elle a une longueur de l'ordre du centimètre et un diamètre de quelques dizaines de micromètres (de 25 à 30 μm environ). La forme de la fibre élémentaire de chanvre peut être assimilée à une ellipse légèrement écrasée [36]. Elle possède en son centre une cavité (le lumen) qui permet de déterminer la qualité et le degré de maturité de la fibre selon sa taille [37–39]. Le lumen n'occupe que quelques pourcents de la section transversale de la fibre [36].

Une fibre élémentaire de chanvre est subdivisée en deux parois principales. L'une d'entre elles est la paroi externe (aussi appelée paroi primaire) avec une épaisseur d'environ de 0.2 μm . Cette paroi joue un rôle de colle et permet de relier les fibres élémentaires entre elles. Elle est majoritairement constituée de pectines, de lignine et de composés lipophiles [40], mais elle contient aussi quelques microfibrilles orientées aléatoirement [41]. La seconde paroi est la paroi interne (ou paroi secondaire) qui représente la majorité du volume de la fibre avec une épaisseur de l'ordre de 10 μm . Cette paroi comprend trois couches, nommées S1, S2 et S3, dont la couche S2 est la plus épaisse [42]. Chacune de ces couches est constituée de lamelles concentriques qui consistent en un enroulement en spirale de microfibrilles de cellulose parallèles entre elles dans une matrice de polysaccharides amorphes, notamment des pectines et des hémicelluloses. Les fibrilles de cellulose sont un assemblage de mesofibrilles d'un diamètre de 0,5 μm . Elles-mêmes formées par l'association de microfibrilles de quelques nanomètres de diamètre.

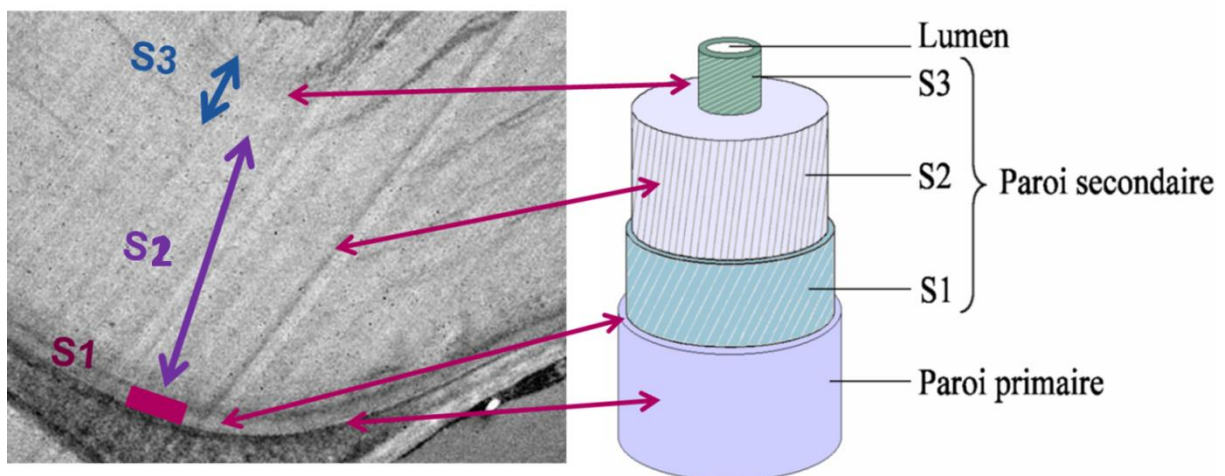


Figure I.15. Différentes couches concentriques de la fibre élémentaire de lin [43]

2.2. Composition biochimique des fibres de chanvre

Les fibres végétales en général, et les fibres de chanvre en particulier, sont constituées de cellulose, lignine, hémicelluloses, pectines, protéines et de composés lipophiles. La quantité relative de ces composants peut varier considérablement en fonction de la variété de chanvre, de la période de la récolte, des traitements de transformations (rouissage, teillage,...) ainsi que des méthodes utilisées pour l'extraction des fibres [44]. Le tableau I.3 présente la composition biochimique des cultivars de chanvre les plus utilisés.

La composition chimique joue un rôle important dans le comportement mécanique des fibres végétales [45,46]. Par conséquent, la détermination de la composition chimique permet généralement une meilleure compréhension des propriétés mécaniques des fibres. Il existe trois méthodes principales pour identifier et quantifier les polymères constitutifs de la paroi cellulaire. Deux d'entre elles sont basées sur des extractions chimiques et la troisième, sur une méthode chromatographique. Les proportions massiques des constituants sont déterminées à partir d'un paquet de fibres et non d'une seule fibre élémentaire.

Tableau I.3. Composition chimique des fibres de chanvre de différentes variétés d'après la littérature

Variété	Cellulose (m%)	Hemicelluloses (m%)	Pectines (m%)	Lignine (m%)	références
Santhica 27	80.6	6.07	-	12.4	[47]
USO31	64-71	4-6	6-10	3-8	[29]
USO	54.4	-	8.7	6.1	[48]
Fedora 17	79.8	5.65	-	11.6	[47]
Fedora 17	65.6-84.9	6.0-8.1	9.4-25	2.7-4.5	[34]
Fedora 19	58.6	9.3	-	5.0	[49]
Fedora	55	16	8	4	[50]
Kompolti	68.2-69.2	6.7-8.5	-	5	[49]
Sárgaszárú					
Unspecified	82.0-88.9	4.1-8.1	-	2.2-3.8	[51]
Unspecified	53.9-57.6	16.3-18.2	6.5-7.1	20-21	[52]
Unspecified	63.7-78.4	11.8-17.3	1.9-7.3	1.7-5.0	[53]

2.2.1. Cellulose

La cellulose est un polymère naturel et le principal réservoir de carbone organique sur Terre, avec une production annuelle d'environ 180 milliards de tonnes [54]. Elle est

produite principalement par les plantes supérieures, par certaines algues, et par des bactéries (procaryotes inférieurs ex : *Acetobacter*), mais aussi par les tuniciers qui sont les seuls animaux capables de produire de la cellulose [55].

La structure chimique de la cellulose végétale se compose de macromolécules linéaires d'environ 1 000 à 30 000 unités d'anhydroglucose (AGU) reliées entre elles par des liaisons β -1,4-glycosidiques (figure I.16). Les trois groupes hydroxyle et les atomes d'oxygène des cycles AGU peuvent interagir les uns avec les autres pour former un réseau dense de liaisons hydrogène intra et inter chaînes de cellulose. Cela conduit à la formation de microfibrilles de cellulose ordonnées et cristallines de 3 à 30 nm de diamètre, composées de plusieurs dizaines de macromolécules de cellulose [56,57]. Dans la paroi cellulaire secondaire des plantes, les microfibrilles de cellulose sont alignées parallèlement le long de l'axe de la fibre (figure I.17). Généralement, la cellulose constitue 15 à 30% de la masse sèche de la paroi cellulaire primaire et plus de 40% de la masse sèche de la paroi cellulaire secondaire chez les plantes supérieures [58]. La cellulose joue un rôle très important concernant les propriétés mécaniques des fibres [36]. La cellulose cristalline est parmi les polymères ayant un module d'élasticité élevé, soit environ 136 GPa plus élevé que celui mesuré pour les fibres de verre dans les mêmes conditions expérimentales (75 GPa) [59,60].

La dégradation de la cellulose est complexe et peut s'expliquer par sa structure elle-même. Classiquement, trois cellulases sont nécessaires pour dégrader la cellulose: l'exocellulase (exocellobiose hydrolase), l'endocellulase et la cellobiase [61].

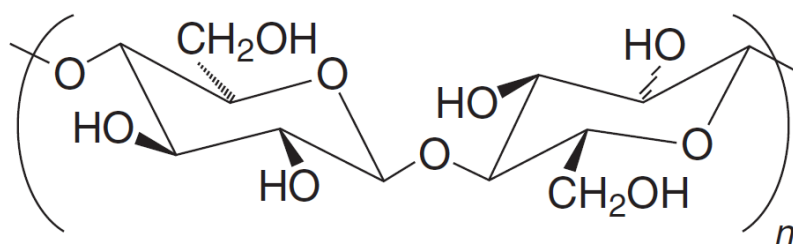


Figure I.16. Structure de la cellulose : polymère de cellobiose

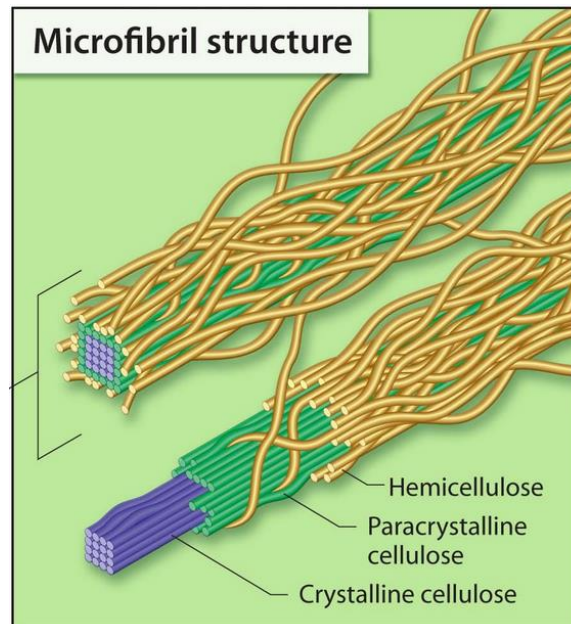


Figure I.17. Structure de la microfibrille de cellulose [62]

2.2.2. Hémicelluloses

Après la cellulose, l'hémicellulose est la deuxième classe de carbohydrate le plus abondant dans les parois cellulaires végétales [61]. Elle représente environ 20 à 35% de la biomasse lignocellulosique dans la nature [63]. La composition chimique des hémicelluloses, ainsi que leur quantité et leur localisation dans les parois primaires et secondaires, dépendent du type de plante. Les principaux types d'hémicelluloses sont les heteroglucan (exemple xyloglucan) ou β -glucan mixte $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ou $\beta(1\rightarrow6)$. (figure I.18). Les principales différences entre la cellulose et les hémicelluloses sont (i) la composition car la cellulose ne contient que des unités 1,4- β -D-glucopyranose; (ii) les chaînes sont ramifiées et plus courtes contrairement à la cellulose; et (iii) le degré de polymérisation qui est plus élevé (environ de 10 à 100 fois) pour la cellulose que pour l'hémicellulose. De plus, l'hémicellulose est un composant très hydrophile soluble en milieu alcalin, et facilement hydrolysable par les acides [64,65]. Cousins.[66] a montré que les hémicelluloses possèdent une importante capacité de sorption d'eau.

Un taux élevé d'hémicelluloses dans la structure des fibres de chanvre constitue un frein lors de la fabrication des matériaux biocomposites. En effet, la plupart des matrices polymères qui interagissent avec les fibres de chanvre, lorsqu'elles sont utilisées comme renforts dans les matériaux composites, sont non polaires. Par conséquent, le caractère hydrophile de l'hémicellulose pose un problème d'interaction entre les fibres et la matrice, nécessitant un prétraitement des fibres de chanvre pour éliminer ce composé.

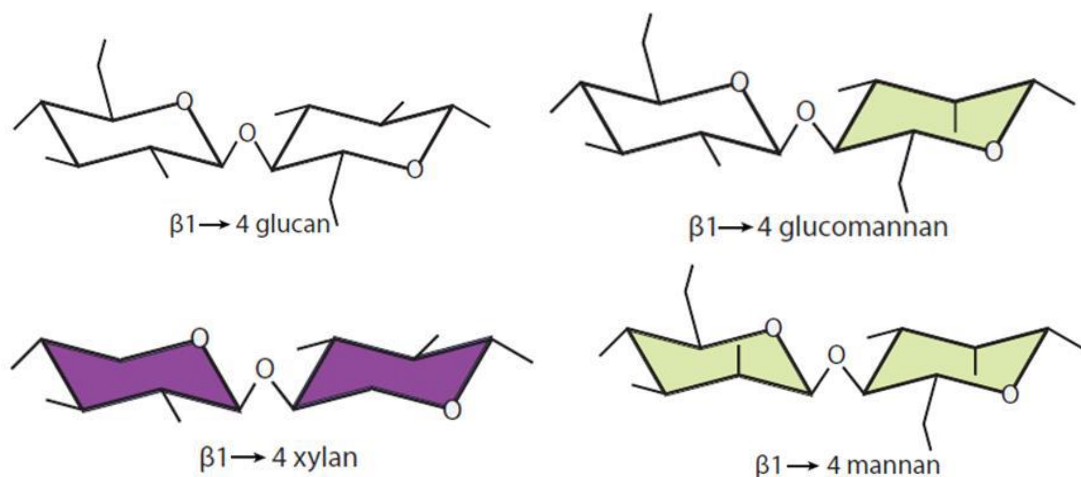


Figure I.18. Structure moléculaire des principales unités disaccharidiques récurrentes des hémicelluloses [67]

2.2.3. Lignine

La lignine est un hétéro-biopolymère complexe qui représente 30% du carbone organique de la terre, juste après la cellulose. Il est principalement composé de trois composants phénoliques : le p-hydroxyphényle, le guaiacyle et le syringyle, dérivés de trois monomères différents : les alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique (figure I.19) et formant un réseau réticulé tridimensionnel complexe [68]. La distribution de la lignine n'est pas homogène au sein de la paroi cellulaire.

Les principales fonctions de la lignine dans les plantes sont : (i) préserver la structure des parois cellulaires, (ii) apporter rigidité et résistance aux tiges grâce à ses liaisons covalentes avec les hémicelluloses [69] ; (iii) permettre le transport de l'eau et des solutés en imperméabilisant les parois des cellules; et (iv) protéger la plante contre les agents pathogènes [70]. La lignine est moins hydrophile que l'hémicellulose et la cellulose amorphe. Cette propriété, combinée à sa structure complexe, rend sa dissolution / dégradation difficile.

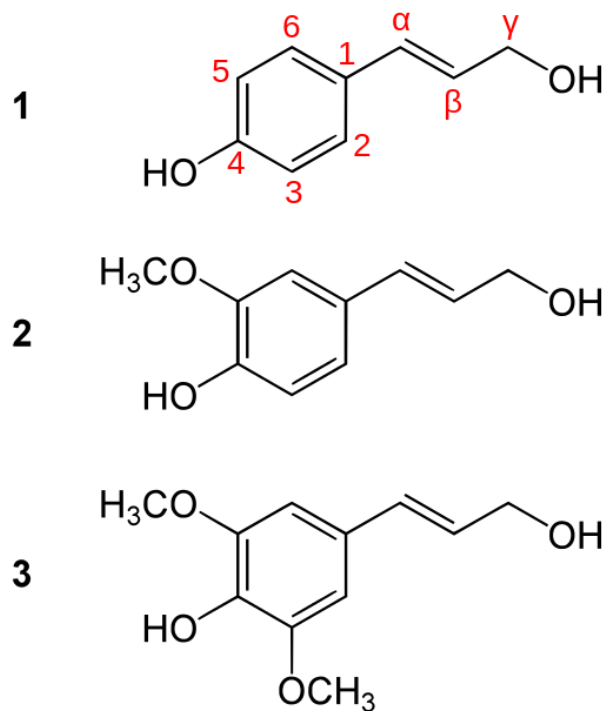


Figure I.19. Monomères de lignine (1 : alcool paracoumarylique. 2: alcool coniférylique. 3: alcool sinapylique) [71]

2.2.4. Pectines

Les pectines sont des hétéro-polysaccharides structuraux complexes responsables de l'intégrité structurelle et de la cohésion des tissus végétaux supérieurs. Les pectines sont riches en acide galacturonique (GalA), et contiennent des unités de rhamnose et de galactose qui sont très représentatives des pectines [66](figure I.20). Dans les fibres végétales, les pectines sont abondantes dans les lamelles mitoyennes entre les fibres élémentaires, où elles régulent l'adhésion intercellulaire. Dans la deuxième paroi cellulaire, les pectines sont présentes en faible quantité. Les trois principaux motifs polysaccharidiques rapportées des pectines sont l'homogalacturonane (HGA), le rhamnogalacturonane-I (RG-I) et le rhamnogalacturonane-II (RG-II) [18]. Les pectines ont une capacité de sorption d'eau élevée [72]. La pectine est le composé le plus hydrophile des fibres végétales en raison de la présence de groupes acides. Les liaisons spécifiques de la structure de la pectine sont dégradées par différentes enzymes, soit par une dépolymérisation ou une désestérification. Ces enzymes sont largement connues sous le nom de pectinases et la plupart d'entre elles provoquent la dégradation de GalA.

Les pectines peuvent être extraites des fibres par l'EDTA (acide éthylène diaminetétraacétique) ou l'eau bouillante [73-75].

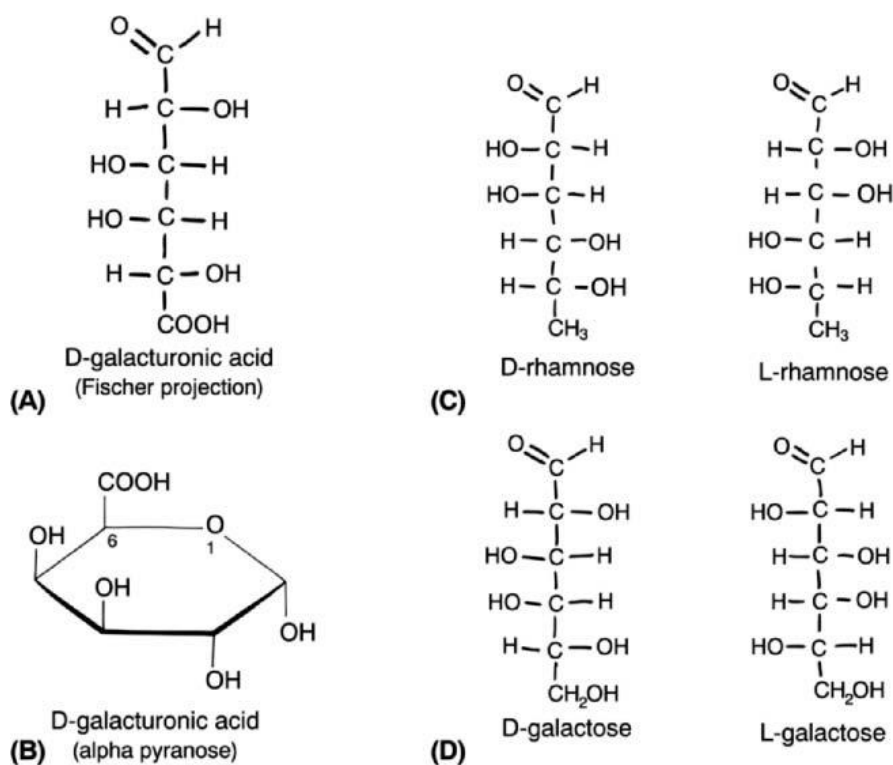


Figure I.20. (A) Acide D-galacturonique sous forme de chaîne ouverte en projection de Fisher, (B) Acide D-galacturonique sous forme de cycle (α -pyranose), (C) D- et L-rhamnose en chaîne ouverte dans la projection de Fisher et (D) D- et L-galactose en tant que chaîne ouverte dans la projection de Fisher [76].

2.2.5. Composés lipophiles

Les extraits lipophiles sont une combinaison de différents composants de faible masse moléculaire, tels que les acides gras et de molécules de masse moléculaire élevée, tels que les cires, les esters de stérols et les triglycérides [77]. Les principales structures chimiques des extraits lipophiles sont présentées sur la figure I.21. Les composés lipophiles sont présents à la fois sur la partie de la plante en contact direct avec l'atmosphère et au sein de la tige et notamment dans les fibres. Parmi ces composés, les cires situées sur la cuticule jouent le rôle d'une barrière protectrice qui empêche le séchage et l'entrée de microorganismes au sein de la plante [78].

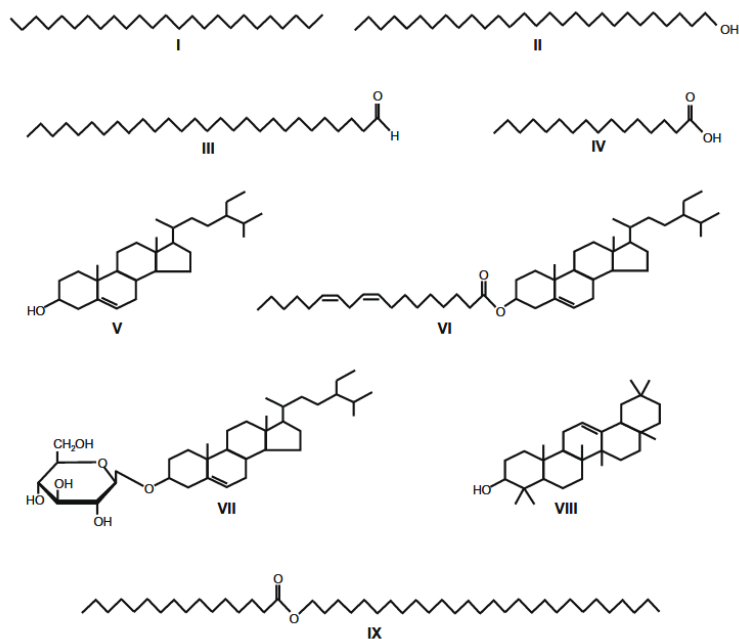


Figure I.21. Structure chimique des composés représentant les principales classes des extraits lipophiles présents dans les fibres lignocellulosiques: (I) pentacosane; (II) octacosanol; (III) octacosanal; (IV) acide palmitique; (V) sitostérol; (VI) linoléate de sitostéryle; (VII) sitostéryl 3b-D-glucopyranoside; (VIII) b-amyrine [79]

2.2.6. Cendres

Les cendres constituent les matières minérales restantes lorsque les fibres sont consommées à une température élevée (environ 600°C) dans un four. La teneur en cendres (taux de cendres) est une indication de l'absorption de minéraux par la plante, elle dépend donc du type de sol où la plante de chanvre est cultivée. Les principaux composants minéraux des fibres sont le potassium (K), le phosphore (P), le magnésium (Mg) et le calcium (Ca). Le calcium joue un rôle très important dans la structure des fibres en stabilisant la pectine sous forme de pectate de calcium. La teneur en minéraux insolubles du matériel végétal peut être déterminée par divers procédés, par exemple, par la méthode gravimétrique ou spectroscopie par absorption atomique ou plasma à couplage inductif (ICP), pour quantifier plusieurs éléments. Le pourcentage de cendres provenant de diverses fibres est de 1 à 4% pour la plupart des fibres végétales.

2.3. Propriétés mécaniques des fibres de chanvre

Le principal atout des fibres de chanvre est directement lié à leurs propriétés mécaniques. Différents essais mécaniques existent pour caractériser les fibres, tel que la traction dynamique, la flexion, la compression et la nanoindentation. Toutefois, l'essai le plus répandu dans la littérature est l'essai de traction dans la direction longitudinale de la fibre.

Cet essai est délicat à mettre en place en lien avec le faible diamètre des fibres. Il est parfois réalisé sur des fibres élémentaires ou sur des faisceaux de fibres. La plupart des approches utilisées dans la littérature estiment que la section a une géométrie 'circulaire'. Les vitesses de déformation sont souvent de l'ordre du mm/min et la longueur libre de la fibre est généralement de 10mm. Les propriétés mécaniques des fibres sont généralement mesurées en termes de résistance à la traction, de module élastique (ou module d'Young) et d'élongation. La résistance à la traction représente la charge maximale qu'un matériau peut supporter en étant étiré, avant la rupture. L'élongation est une mesure de la déformation avant la rupture. Le module d'élasticité est une mesure de la rigidité (plus le module d'Young est fort, plus le matériau est rigide). Ces paramètres sont obtenus à partir d'une courbe typique charge-déplacement (figure I.22). Les trois propriétés sont liées les unes aux autres selon la loi de Hooke [76].

Le comportement en traction sur les fibres de chanvre est complexe. Trois types de comportement sont souvent observés dans la littérature, (figure I.22) [80]. Le 1^{er} (type I) comportement quasi-linéaire est similaire à celui observé pour les fibres de verre. Le 2^{ème} comportement (type II) est non linéaire et caractérisé par deux zones distinctes avec une pente décroissante dans la deuxième zone. Le 3^{ème} comportement (type 3), plus complexe, est plus communément observé pour les fibres ligno-cellulosiques. Il est caractérisé par une zone linéaire située en pied de courbe correspondant à la mise en place de la fibre et du dispositif de traction plutôt qu'une réponse mécanique de la fibre elle-même. Aux plus fortes déformations, la courbe de comportement est quasiment linéaire.

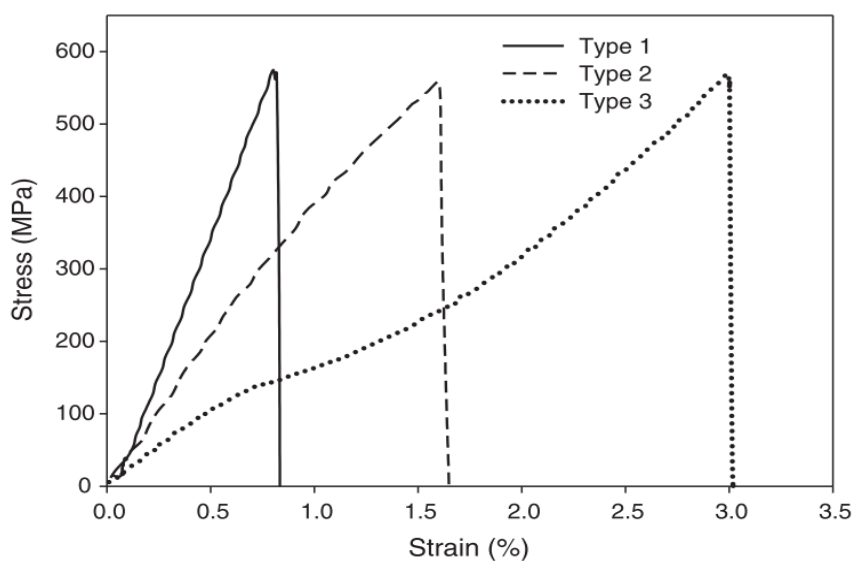


Figure I.22. Courbes typique charge-déplacement d'un essai de traction sur une fibre chanvre [80]

Une forte dispersion des propriétés mécaniques des fibres de chanvre dans la littérature est observée (tableau I.4). Cette dispersion est liée d'une part à la méthode appliquée pendant l'essai de traction (à savoir la taille de l'élément *i.e.* la fibre individuelle ou un faisceau de fibres ; la longueur de jauge utilisée, la méthode de détermination de la section *i.e.* cylindrique ou circulaire par exemple ; et la vitesse de sollicitation [81–83]) et d'autre part à la variation de la nature des fibres de chanvre testées et notamment la variété [84], le mode de la culture [85], le climat [86], la croissance [87] et les étapes de transformation comme le rouissage [29,88,89].

Tableau I.4. Propriétés mécaniques des fibres de chanvre d'après la littérature

Diamètre (μm)	Module d'Young (GPa)	Résistance à la rupture (MPa)	Vitesse de sollicitation (mm/min)	références
42	14.4	285	0.6	[90]
27.6 ± 7.5	24.7 ± 11.4	636 ± 253	0.12	[45]
31.2 ± 4.9	19.1 ± 4.3	270 ± 40	1	[91]
-	35	514	-	[20]
17.7	44.5	788	1	[92]
-	24.9	1735	0.12	[80]
-	24.8	514	0.5	[80]
17.1 ± 4.5	19.6 ± 14.8	482 ± 337	1	[93]
37.42 ± 6.62	-	529 ± 12.35	1	[80]
-	34.9 ± 4.4	954 ± 162	1	[29]
16.1 ± 6.62	33.8 ± 12.2	489 ± 233	1	[84]
240 ± 95	11.5 ± 7.1	235 ± 150	1	[89]

2.4. Propriétés physiques des fibres de chanvre

2.4.1. Densité

La densité est un des principaux atouts que possèdent les fibres végétales. Elle varie d'une espèce à l'autre mais elle est généralement de l'ordre de 1,5 avec une valeur de 1,48 pour les fibres de chanvre [94–96].

2.4.2. Dimension

Les fibres de chanvre ont une longueur généralement comprise entre 5 et 55 mm avec une moyenne d'environ 25 mm. Leur diamètre varie entre 10 et 51 μm avec une moyenne située

autour de 25 μm . Les différentes valeurs relevées dans la littérature sont présentées dans le tableau I.5.

Tableau I.5. Caractéristiques morphologiques de quelques fibres végétales (intervalles et moyennes) [96-98]

Fibres	Longueur (mm)	Diamètre (μm)	L/d
Chanvre	5 - 55	25	10 - 51
Lin	4 - 80	33	5 - 76
Jute	0.8 - 6	3	15 - 25
Ramie	40 - 250	120	16 - 126
Coton	15 - 56	18	12 - 25
Noix de coco	0.3 - 1	0.7	12 - 24

3. Composites à base de fibres de chanvre

3.1. Généralités

Les matériaux composites sont définis comme des matériaux constitués d'au moins deux types de matériau (non miscibles) ayant des propriétés différentes et qui se complètent. Leur assemblage permet de former un nouveau matériau (ex. figure I.23) qui présente de meilleures propriétés (thermiques, mécaniques, acoustiques,...) que celles de chaque matériau du composite pris séparément (matériau homogène). Les matériaux composites sont constitués d'un renfort et d'un liant appelé matrice.

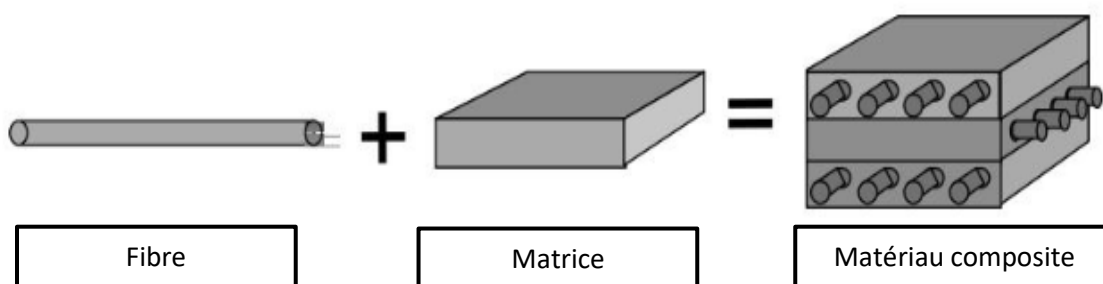


Figure I.23 : Exemple de composition d'un matériau composite

3.2. Matrice

Le rôle de la matrice dans un composite est de transmettre les efforts mécaniques au renfort, et d'assurer la protection du renfort contre un environnement défavorable et de protéger la surface des fibres contre l'abrasion mécanique. La matrice joue un rôle majeur

de cohésion de la structure et de transmission des efforts vers le renfort. De plus, elle permet de donner la forme voulue au matériau composite réalisé.

Quatre grands types de matrices existent : polymère, métal, céramique et carbone. La plupart des composites utilisés aujourd'hui dans l'industrie sont basés sur des matrices polymères. On y retrouve deux grandes catégories: les thermodurcissables (ex. époxy) et les thermoplastiques (ex. le polypropylène PP). Le choix de la matrice est limité par la température de dégradation de fibres végétales, environ 200 °C, qui est la température de mise en œuvre des biocomposites.

Dans notre étude, le PP a été sélectionné comme matrice des biocomposites. Ce polymère dont la formule chimique est C_nH_{2n} (figure I.24) est la deuxième matière plastique la plus largement produite après le polyéthylène. Son comportement mécanique est lié à sa morphologie microstructurale.

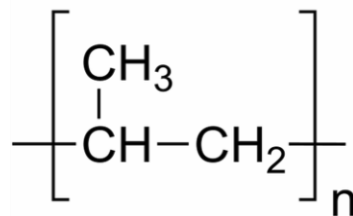


Figure I.24. Structure de PP

3.3. Renfort

Le renfort assure la tenue mécanique du matériau composite comme la rigidité et la résistance mécanique, supporte la charge de la structure et réduit les contraintes thermiques. Il existe différents types de renforts dans un matériau composite qui peuvent être classés selon leur composition (verre, carbone, chanvre, lin...), leur forme (fibres longues ou courtes, charges), leur disposition. Généralement, dans les matériaux composites, le renfort est constitué de fibres.

Les fibres les plus utilisées pour l'élaboration des matériaux composites sont les fibres de verre en raison de leurs bonnes propriétés mécaniques, leurs excellentes propriétés isolantes, leurs résistance chimique et thermique. Cependant, ces fibres présentent des inconvénients. Elles ne sont pas renouvelables et posent des problèmes d'élimination en fin de vie, car elles ne peuvent pas être recyclées thermiquement par incinération et de plus constituent des résidus susceptibles d'endommager le four. Elles sont également très abrasives, ce qui entraîne une usure accrue des équipements de traitement tels que les

extrudeuses et les moules. Outre ces inconvénients écologiques, les fibres de verre peuvent engendrer des problèmes sanitaires et de sécurité. Elles provoquent notamment des irritations cutanées lors de la manipulation de produits à base de fibres, du traitement et du découpage de pièces renforcées par des fibres de verre.

En raison de contraintes environnementales et économiques et leur impact sur la santé et la sécurité [99,100], les fibres végétales ont suscité un regain d'intérêt et différents secteurs industriels remplacent les fibres de verre par des fibres végétales (cf. §1.4.2.). En effet, les fibres végétales présentent de nombreux avantages par rapport aux fibres de verre, en terme de disponibilité, de propriétés intrinsèques comme la densité [101], la biodégradabilité [86,102], les propriétés mécaniques [29,80,103], et indirectement, en termes de coût de traitement (tableau I.6).

Tableau I.6. Comparaison entre les fibres végétales et les fibres de verre

	Fibres végétales	Fibres de verre
Densité	Faible	élevée
Renouvelable	Oui	Non
Recyclable	Oui	Non
consommation d'énergie	Faible	Elevé
Commercialisation	Vaste	Vaste
Emissions de CO2	Neutre	Non-Neutre
Abrasion	Non	Oui
Risque chimique	Non	Oui
Déchets	Biodégradable	Non-Biodégradable

3.4. Propriétés mécaniques des composites à base de fibres végétales

Les matériaux composites renforcés de fibres végétales disposent de propriétés mécaniques comparables aux composites traditionnels (renforcés par des fibres de verre ou carbone,...), en termes de valeurs spécifiques (caractéristique/densité). Le tableau I.7 regroupe quelques propriétés mécaniques des composites à matrice polypropylène, renforcée par des fibres végétales. Les fibres de chanvre donne un composite avec de bonnes propriétés mécaniques par rapport aux autres fibres.

Tableau I.7. Caractéristiques mécaniques des composites polypropylène/fibres végétales. Méthode de fabrication par compression à 180°C (5 bars), à 40% en masse de fibres aléatoirement dispersées [35]

Caractéristique	Kenaf	Coir	Sisal	Chanvre	Jute
Densité des fibres		1.25	1.3	1.48	1.46
Module d'Young en traction (MPa)	6890	1250	5360	6850	3620
Résistance en traction (MPa)	27.5	10	33.3	52.1	26.4
Module d'Young en flexion (MPa)	2210	640	1670	4950	2720
Résistance en flexion (MPa)	27.8	26.7	24.7	53.9	34.3
Choc Charpy (kJ/m ²)	14.1	21.7	26.9	25.9	15.3

3.5. Verrous scientifiques et techniques freinant le développement des composites à base de fibres végétales

Le développement des matériaux composites renforcés de fibres végétales est freiné par divers facteurs parmi lesquels la tenue thermique des fibres végétales et la qualité de l'adhésion interfaciale avec les matrices d'incorporation.

3.5.1. Stabilité thermique

La stabilité thermique des fibres végétales est un problème important lors de la mise en œuvre des composites (réticulation, extrusion ou moulage par injection). En effet, les fibres végétales commencent généralement à se dégrader à une température d'environ 240°C. Les constituants structurels de la fibre (cellulose, hémicelluloses, pectines, lignine, etc.) sont sensibles à différentes plages de températures. Les pectines et les hémicelluloses commencent à se dégrader à une température d'environ 200°C et les constituants cellulose se dégradent à des températures plus élevées [104]. Par conséquent, une exposition des fibres à une température de plus de 200°C, même pendant quelques minutes seulement, conduit à des endommagements de la structure des fibres.

La stabilité thermique de la fibre peut être améliorée en diminuant la teneur de certains constituants de la fibre tels que la pectine, les hémicelluloses et la lignine. Cela peut être réalisé par différents traitements chimiques ou le traitement de rouissage [88,89,105,106]. A titre exemple, Kabir et al. [106] ont montré après différents traitements chimiques (alcalin, acétylé et silane) que la stabilité thermique des fibres de chanvre est améliorée par rapport aux fibres non-traitées.

3.5.2. Qualité de l'adhésion interfaciale entre les fibres et la matrice

L'une des caractéristiques des fibres végétales est leur nature hydrophile et polaire. Elles possèdent des constituants (cellulose, hémicelluloses) qui sont des sites d'absorption d'eau [106]. En revanche, les polymères qui peuvent être utilisés comme matrices pour fabriquer des composites sont souvent hydrophobes, apolaires et imprègnent mal les fibres. La mauvaise imprégnation des fibres avec la matrice entraîne une mauvaise adhérence entre les fibres et la matrice, ce qui conduit à une chute des propriétés mécaniques du composite. En outre, les pectines, les hémicelluloses et la lignine constituent une zone faible entre la fibre et la matrice, ce qui entraîne une réduction de la capacité de transmission des contraintes mécaniques lorsque le composite subit des sollicitations. En conséquence, pour améliorer l'adhérence entre la fibre et la matrice polymère, des modifications de la surface de fibre sont réalisées en faisant des modifications chimiques / physiques ou par des prétraitements (traitement biologique par exemple) pendant le défibrage.

Les modifications chimiques de la surface des fibres sont réalisées en utilisant des silanes, de la soude (NaOH), des traitements d'acétylation [69,107-109]. Un autre traitement souvent utilisé, appelé couplage, consiste à incorporer dans la matrice un agent chimique bifonctionnel qui réagit à la fois avec les groupements hydrophiles de la fibre et les groupements hydrophobes de la matrice. A titre exemple, l'ajout de l'agent couplant polypropylène greffé anhydride maléique (PPgMA) à la matrice polypropylène (PP) permet d'améliorer les performances mécaniques des composites PP/fibres végétales [108,110-112].

En ce qui concerne les modifications physiques, elles sont réalisées en utilisant des traitements Corona, ultraviolet (UV), plasma ou gamma qui permettent de modifier les propriétés structurelle et surfacique des fibres. Par exemple, le traitement des fibres de chanvre par l'effet de couronne permet d'augmenter la liaison interfaciale entre les fibres de chanvre et le polypropylène ce qui conduit à une augmentation de la résistance à la rupture et du module d'Young des composites, de 29 MPa à 38 MPa et 1079 MPa à 1215 MPa respectivement [113].

Par ailleurs, les fibres de chanvre qui sont assemblées sous forme de faisceaux dans la plante doivent être séparées en fibres élémentaires pour favoriser la surface de contact fibre/matrice et permettre un transfert de charge efficace. En effet, les faisceaux de fibres présentent des zones faibles entre les fibres (ex. la lamelle mitoyenne), et leur présence

provoque des ruptures précoces des fibres au sein des composites [114]. Il existe des prétraitements qui permettent de séparer à la fois i) les fibres de la partie ligneuse de tiges et ii) les fibres entre elles, comme le défibrage physique et le rouissage.

Le défibrage physique permet de séparer les faisceaux de fibres d'autres constituants de la tige (xylème) en mettant en œuvre différents procédés tels que le procédé d'explosion à la vapeur (STEX) [115,116], les traitements ultrasons, et les traitements micro-ondes [115,117]. Néanmoins, ces traitements introduisent généralement des dommages au sein de la structure des fibres, et ne sont pas utilisés au niveau industriel.

Le rouissage permet d'éliminer les ciments naturels présents dans les lamelles mitoyennes, ainsi que les composés hydrophiles non cellulosiques. Ce traitement améliore l'interface entre les fibres et la matrice, ce qui conduit à une augmentation des performances mécaniques du composite final [88,118–120].

4. Rouissage

Le rouissage est le premier processus appliqué aux plantes à fibres corticales pour faciliter l'extraction des fibres lignocellulosiques [121]. La dégradation des ciments naturels (ex. pectines, cires) permet la séparation des faisceaux de fibres de la tige ainsi que des fibres élémentaires au sein des faisceaux [29,88,122]. Traditionnellement, ce processus requiert différentes populations de micro-organismes qui utilisent des enzymes pour dégrader les ciments naturels qui relient les faisceaux de fibres à la tige, bien qu'il existe actuellement des techniques plus modernes pour extraire les fibres sans utiliser de micro-organismes [47,122]. Dans ce paragraphe, les principales méthodes de rouissage seront détaillées avant d'examiner l'impact de ce procédé sur les caractéristiques des fibres végétales.

4.1. Les différentes techniques de rouissage

Il existe différents types de rouissage tel que le rouissage à l'eau, le rouissage enzymatique, chimique et le rouissage en champ ainsi que des techniques de rouissage plus modernes telles que le rouissage assisté par micro-ondes [122,123].

4.1.1. Rouissage à l'eau

Le rouissage à l'eau consiste à immerger les tiges dans l'eau (soit dans les rivières, ou dans les étangs) pendant une durée allant d'une à trois semaines. Cette immersion permet aux bactéries anaérobies pectinolytiques de se développer sur les tiges. Au cours des 40

premières heures de traitement, les populations de *Bacillus sp.* sont dominantes, mais lorsque les réservoirs d'eau commencent à manquer d'oxygène, les populations de *Clostridium sp.* prennent le relais et deviennent dominantes. Ce groupe bactérien a été identifié comme un producteur d'exoenzymes dégradant les ciments pectiques [121,124,125]. Une fois le rouissage terminé, les tiges sont séchées à l'air libre, ce qui nécessite un espace important. Ce type de rouissage a été utilisé au temps de l'Égypte ancienne et en Europe depuis le moyen Âge jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle. Il est désormais interdit en Europe pour deux principales raisons : la pollution de l'eau utilisée pour le rouissage et l'émission d'odeurs nauséabondes produites lors du rouissage. Cette méthode ancestrale a l'avantage d'être relativement rapide et homogène et permettait de produire des fibres de haute qualité. Néanmoins, en prenant en considération l'impact environnemental de ce procédé (pollution des eaux par la matière organique libérée lors du rouissage et émission d'effluents malodorants) ainsi que le coût élevé du séchage, ce procédé a été remplacé par d'autres techniques de rouissage [126].



Figure I.25. Rouissage à l'eau au sein (a) d'une rivière [127] (b) d'un réservoir [128]

4.1.2. Rouissage chimique et enzymatique

L'interdiction du rouissage à l'eau a contraint les producteurs de fibres à développer d'autres techniques de rouissage. Ces techniques sont le rouissage enzymatique et le rouissage chimique. Elles sont généralement réalisées avec un mélange d'enzymes ou de produits chimiques respectivement [122,129,130]. Pour le rouissage enzymatique, les tiges sont immergées dans une solution d'enzymes tels que des hemicellulases,

l'endopolygalacturonase ou des pectinases pour dégrader les ciments pectiques et séparer les fibres élémentaires entre elles. Concernant le rouissage chimique, les produits utilisés dans les travaux de la littérature sont variés. Des chélateurs des ions calcium présents dans la composition des pectines comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) sont surtout utilisés [120].

L'application de ces deux traitements aux fibres a pour but de «nettoyer» leur surface, c'est-à-dire d'éliminer les matériaux non cellulosiques, obtenir la surface de fibre la plus homogène possible (cellulose) et optimiser l'interface entre les fibres et la matrice (polymère) dans la fabrication de composites [120]. En outre, l'élimination de la pectine des lamelles mitoyennes permet la séparation des faisceaux de fibres, augmentant la surface disponible pour la liaison chimique [7].

Ces deux types de rouissage enzymatique et chimique produisent des fibres de haute qualité avec des propriétés optimales en termes de finesse, de résistance à la traction et d'adhérence à la matrice composite, mais n'ont pas été développés à l'échelle industrielle en raison de leur coûts de production élevés [121].

4.1.3. Rouissage au champ

Pour répondre aux exigences environnementales, l'ancienne méthode de rouissage en champ a connu un regain de popularité auprès des agriculteurs en Europe [131]. Le rouissage en champ consiste à mettre en contact les tiges avec le sol au moment de la récolte afin que les microorganismes (les bactéries et les champignons ou micromycètes) colonisent les tiges sous les actions conjuguées de la rosée, de la pluie, du vent et du soleil permettant de dégrader les ciments pectiques qui assurent le lien entre les fibres et les tiges, et entre les fibres élémentaires. La période de rouissage dépend des conditions météorologiques, elle peut s'étaler sur 1 à 11 semaines pendant lesquelles l'alternance de phases humides et chaudes permet le développement de ces microorganismes. Plusieurs types de microorganismes se développent à la surface des tiges et produisent des exoenzymes responsables de la dégradation des polysaccharides [132,133]. La microflore impliquée lors du rouissage en champ est diverse, dynamique mais est affectée par le type de sol, la période de la récolte et la durée de rouissage [133]. Les enzymes produites pendant ce type de rouissage peuvent être des polygalacturonases, pectine lyases, xylanases, mannanase et cellulases [121,132].

Le rouissage en champ n'est pas seulement un procédé écologique, mais aussi une méthode moins coûteuse que le rouissage à l'eau ou les autres techniques plus récentes [118,121].

Cependant, ce traitement est réalisé à l'heure actuelle de manière empirique à cause de sa dépendance au climat (température et humidité) et conduit à une variabilité des caractéristiques des fibres en termes de couleur, de microstructure, de composition biochimique et de propriétés thermiques et mécaniques. Pour cela, ce traitement de rouissage doit donc être contrôlé et maîtrisé afin de déterminer le temps optimal de rouissage et le moment de la récolte des tiges.



Figure I.26. Rouissage en champ de fibres de lin [134]

4.2. Changements liés au traitement de rouissage

4.2.1. Couleur

Le rouissage entraîne un changement de la couleur de la plante (figure I.27) et des fibres. Différents travaux ont montré la variation de la couleur pendant le rouissage pour les fibres de chanvre ou de lin [88,89,135,136]. En général, la couleur de la fibre de chanvre pendant le rouissage varie de vert pâle pour les fibres non rouies, jaune pour les fibres légèrement rouies, et gris foncé pour les fibres fortement rouies. Ces changements de couleur sont liés à la dégradation des pigments végétaux due à des mécanismes abiotiques et biotiques tels que la photodégradation, la biodégradation et la colonisation microbienne. En effet, pendant le rouissage, des points noirs apparaissent à la surface de la tige (figure I.27). ces points noirs sont attribués à la colonisation microbienne (hyphes fongiques et bactéries) [135–137]. Les

communautés microbiennes colonisent la surface de la tige progressivement jusqu'à la recouvrir entièrement. La variation de la couleur peut être suivie de manière qualitative (à l'œil nu), ou par des techniques adaptées (ex. la spectrocologie [136]).

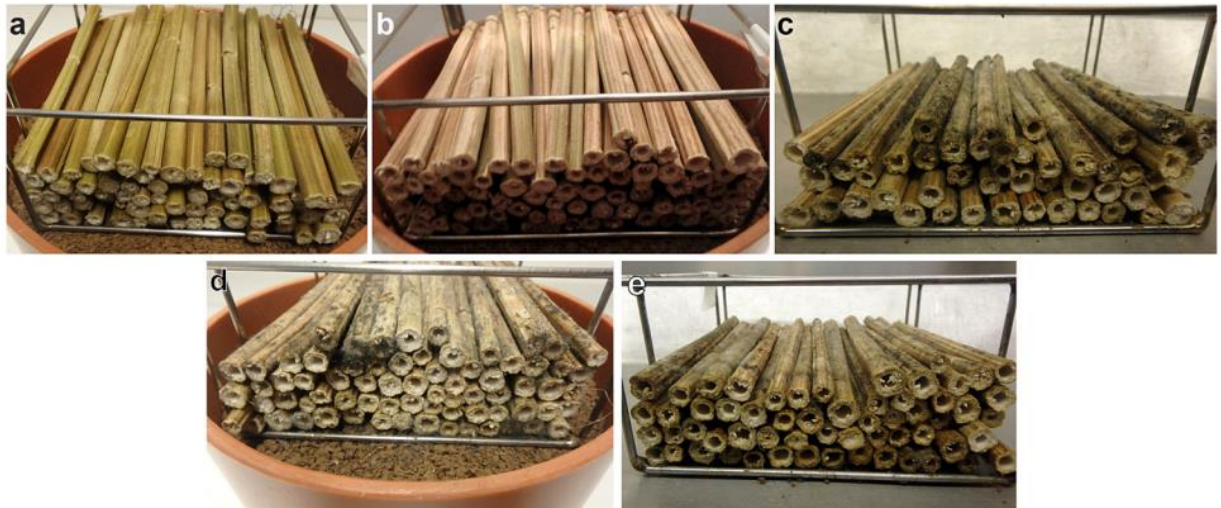


Figure I.27. Changement de la couleur des tiges de chanvre pendant le rouissage [136]

4.2.2. Composition biochimique des fibres

Comme décrit précédemment, les parois cellulaires de fibres végétales sont principalement constituées de cellulose, de polysaccharides non cellulosiques (pectines et hémicelluloses), d'eau, de lignine, de protéines, de lipides et de cires. Différents auteurs ont étudié l'évolution de la composition chimique pendant le rouissage. Dans le cadre du rouissage enzymatique, par la méthode d'extraction chimique par solvant, Nykter et al. [138] ont constaté une augmentation de la fraction de cellulose, tandis que les fractions de pectines et d'hémicelluloses diminuent. La dégradation des pectines pendant le rouissage est également en accord avec les données rapportées par Meijer et al. [74] et Musialak et al. [139]. Liu et al. [29] ont étudié en détail la composition chimique de fibres en utilisant une méthode d'analyse des sucres contenus dans les fibres par chromatographie. La teneur en glucose a augmenté au début du traitement du rouissage en champ avec une diminution des proportions d'acide uronique, de rhamnose, d'arabinose et de xylose. Ces auteurs ont rapporté qu'un rouissage prolongé en champ conduit à une dégradation de la cellulose. Le même phénomène a été observé par Bleuze et al. [136] avec une augmentation de la teneur en cellulose (glucose) au début du rouissage suivie d'une diminution en fin du traitement.

Concernant la variation de la teneur en lignine pendant le rouissage, Liu et al. [29] et Placet et al. [89] ont observé une augmentation de l'abondance relative de la lignine pendant le

rouissage. Ces auteurs ont relié cet accroissement à la vitesse de dégradation de la lignine qui est plus lente que celle des autres composants (extraits lipophiles et carbohydrates) qui sont éliminés de manière concomitante à la lignine. Placet et al. [89] ont suggéré une autre hypothèse en relation avec la méthode de Klason utilisée pour déterminer la teneur en lignine. En effet, par cette méthode, d'autres composants phénoliques ou protéiques qui évoluent pendant le rouissage sont probablement co-analysés avec la lignine.

4.2.3. Cristallinité des fibres

En raison de l'importance de la cristallinité de la cellulose sur les propriétés mécaniques des fibres, l'effet du rouissage sur la cristallinité de la cellulose des fibres végétales a été étudié par de nombreux auteurs en utilisant la diffractométrie de rayons X (DRX). Il existe différentes méthodes pour mesurer l'indice de cristallinité. Une méthode « empirique » [140] permet d'estimer le taux de cristallinité des échantillons. D'autres méthodes basées sur la déconvolution du signal [141,142] sont également utilisées.

La cristallinité des fibres de chanvre dépend du degré de rouissage. Li et al. [143] ont comparé des fibres de chanvre vertes (non-rouies) et des fibres rouies dans une atmosphère humide après 2 semaines dans des sacs hermétiques. Ils ont observé que l'indice de cristallinité a évolué de 66% à 85%. Une évolution identique a été également observée par Marrot [117], qui révèle une augmentation de l'indice de cristallinité des fibres de chanvre ayant subi un traitement de rouissage, de 45,8% pour les fibres de chanvre non-rouies à 71,3%, 71,2% et 74,5% après 14, 31 et 45 jours de rouissage en champ, respectivement. Cette augmentation de l'indice de cristallinité durant le rouissage est observée aussi pour d'autres types de fibres, par exemple les fibres de lin. Zafeiropoulos et al. [144] ont mis en évidence une évolution de l'indice de cristallinité de 64,6 % à 71,6 % pour du lin non roui et du lin roui au champ, respectivement.

Ces auteurs ont lié l'augmentation de la cristallinité de la cellulose à la dégradation de composés non cellulosiques. En effet, la présence d'une grande quantité de composants amorphes dans les fibres de chanvre non rouies, tels que les hémicelluloses, la lignine et les pectines entre les microfibrilles de cellulose provoquent des zones désorientées qui peuvent influencer la structure de la cellulose.

En revanche, dans le cas d'un sur-rouissage, l'indice de cristallinité diminue due à la dégradation de la cellulose. Placet et al. [89], ont comparé 2 temps de rouissage entre des fibres non-rouies et sur-rouies, et ont mis en évidence qu'un sur-rouissage conduit à une diminution du taux de cristallinité.

Ces différents travaux mettent en évidence l'influence du processus de rouissage sur la cristallinité des fibres. Le choix de la durée de traitement du rouissage est donc extrêmement important pour produire des fibres avec un taux de cristallinité adéquat.

4.2.4. Propriétés thermiques des fibres

Puisque le traitement de rouissage a un effet sur la composition biochimique des fibres, cela conduit à une modification de la stabilité thermique des fibres. Placet et al. [89], ont comparé deux temps de rouissage et ont constaté que lorsque la matière non-cellulosique (pectines et hémicelluloses) est éliminée pendant le rouissage, le pic correspondant aux composés non-cellulosiques disparaît et la température de dégradation de la cellulose augmente, ce qui contribue à une amélioration de la stabilité thermiques des fibres. Il existe peu de travaux étudiant l'évolution de la stabilité thermique des fibres de chanvre en fonction du rouissage et de la période de croissance de la plante. Par conséquent, la compréhension du comportement thermique des fibres en fonction de la durée de rouissage est nécessaire pour améliorer la stabilité thermique du composite renforcé par les fibres de chanvre.

4.2.5. Morphologie

Lors du rouissage, la dégradation biologique de composés chimiques et des constituants de la tige [126,145,146] conduit à un changement de la morphologie des tiges (cf. §2.1.1.). Il existe peu d'études dans la littérature traitant l'évolution de la morphologie de la tige chanvre avec la durée du rouissage en champ. Néanmoins, quelques travaux se sont focalisés à l'échelle du faisceau de fibres et de la fibre élémentaire. Placet et al. [89] ont mis en évidence la division de faisceaux de fibres de chanvre en fibres élémentaires après rouissage en champ à l'aide d'observations en microscopie optique, en microscopie électronique à balayage (MEB) et grâce à des analyses d'images. Ces auteurs ont constaté que 75% de fibres non-rouies ont un diamètre de 20 à 85 μm , alors que le diamètre de fibres rouies varie entre 5 et 70 μm (75% de fibres rouies). Une augmentation significative de la quantité de fibres de petit diamètre (entre 5 et 40 μm) a été mesurée pour des fibres rouies (Figure I.28). Une évolution identique de la morphologie des fibres de lin après rouissage enzymatique a été observée par Akin el al. [146] (Figure I.29).

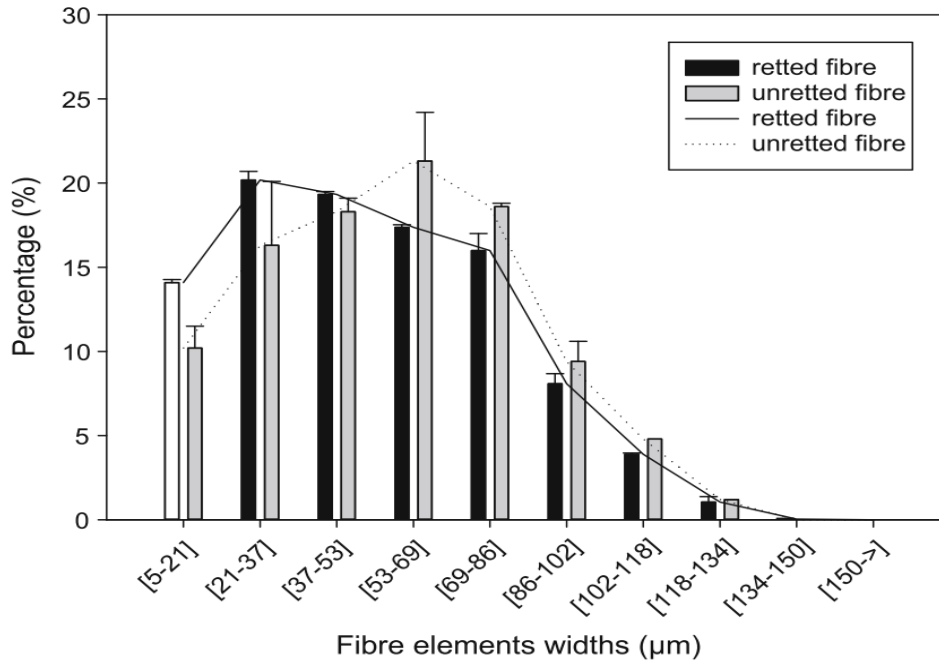


Figure I.28. Distribution dans des classe de largeur des fibres de chanvre rouies et non rouies [89]

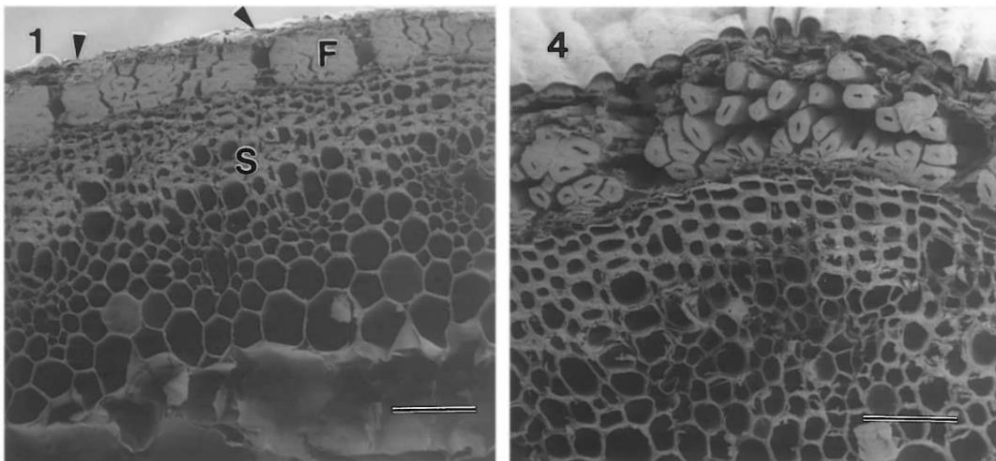


Figure I.29. Observation au MEB de section de tige de lin (a) non-rouie (b) après rouissage enzymatique ; F : Fibres [146].

4.2.6. Propriétés mécaniques des fibres

Les propriétés mécaniques des fibres de chanvre dépendent des caractéristiques intrinsèques de ces fibres telles que la composition chimique (teneur en cellulose, hémicelluloses, pectines et lignine), le taux de cristallinité,... etc [45,46,84,147,148]. Comme décrit dans cette partie bibliographique, la modification des caractéristiques intrinsèques des fibres pendant le rouissage a un impact sur les propriétés mécaniques de celles-ci.

De nombreux travaux ont été publiés sur l'impact du rouissage sur les propriétés mécaniques, soit pour des faisceaux de fibres, soit pour des fibres élémentaires. Cependant, les conditions opératoires du rouissage ne sont pas identiques. En conséquence, ces résultats ne font pas consensus. Néanmoins, ces travaux permettent de dégager les éléments suivants. Placet et al. [89] ont constaté que les propriétés mécaniques des fibres de chanvre diminuent fortement après un rouissage prolongé pendant une période très pluvieuse. En revanche, plus récemment, Placet et al. [149] ont comparé trois temps de rouissage (10, 39 et 75 jours) et ont constaté que la résistance à la rupture et le module d'Young des fibres de chanvre augmentent respectivement au début du processus de 480MPa et 15.7GPa, à 660MPa et 17.5GPa et ensuite diminuent à 340MPa et 16.6GPa avec un rouissage au champ prolongé. Liu et al. [29] ont également observé qu'un sur-rouissage au champ a un effet négatif sur les propriétés mécaniques des fibres. Ces auteurs ont lié la diminution des propriétés mécaniques après sur-rouissage à la dégradation avancée de la cellulose par les micro-organismes. Li et al. [119] ont étudié l'effet du rouissage en sacs hermétiques et constaté que la contrainte à rupture en traction de fibres élémentaires diminuent respectivement de 666 MPa, 402 MPa et 342 MPa pour des fibres brutes et rouies après 1 et 2 semaines. Les auteurs expliquent cette forte diminution (quasiment un facteur 2 par rapport aux fibres non rouies) par la dégradation de la matière non-cellulosique qui joue un rôle de matrice dans la structure de fibres. Martin et al. [88] ont observé une augmentation importante des propriétés mécaniques en traction de fibres élémentaires de lin après un rouissage en champ. Elles (contrainte à rupture / module) sont de 792 MPa / 38.6 GPa, 935 MPa / 48.6 GPa et 1036 MPa / 55.6 GPa pour des fibres non-rouies et rouies après 9 jours et 19 jours de traitement respectivement.

Les propriétés mécaniques des fibres lors du rouissage ont été étudiées par différents auteurs et semblent être liées aux conditions expérimentales permettant de déterminer ces propriétés et à la durée du rouissage. Par conséquent, pour obtenir des propriétés mécaniques homogènes et stables dans le cadre d'une application visée, la maîtrise et le contrôle de ce traitement sont nécessaires.

4.2.7. Communauté microbienne

Au cours du processus de rouissage en champ, des microorganismes sont impliqués dans le changement de la structure des tiges et dans la dégradation de certains composés comme les pectines qui assurent le lien entre les fibres et la partie ligneuse de la tige [132,150]. La diversité microbienne associée à ces modifications peut varier en fonction de la structure de

la paroi cellulaire de la plante et de la durée du rouissage [145,151–153]. La variation de la communauté microbienne lors du rouissage pourrait expliquer l'avancement du degré de ce traitement [154,155].

Différentes études ont été réalisées pour identifier les bactéries et les champignons impliqués lors de ce traitement. Sharma. [156]; Henriksson et al. [129] ont utilisé les méthodes d'isolation et de culture. Ces auteurs ont identifié différents champignons impliqués lors du rouissage de lin, tels que *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Phoma sp.*, *Mucor spp.*, *Rhizomucor pusillus* et *Rhizopus sp.* Ces méthodes d'isolation et de culture ne sont pas suffisamment puissantes pour obtenir un inventaire complet des micro-organismes présents lors du rouissage. Par conséquent, d'autres approches liées à la caractérisation moléculaire telles que l'amplification génique de l'ARNr16S et l'ARNr18S suivie du clonage des amplicons obtenues ont été utilisés pour avoir une vision plus complète des communautés bactériennes et fongiques lors du rouissage de bambou, du chanvre et du lin [145,157,158]. Par cette approche, Ribeiro et al. [145] ont rapporté que lors du rouissage en champ une grande diversité bactérienne a été observée contrairement à la communauté fongique. Ces auteurs ont constaté également que lors du rouissage les séquences bactériennes les plus fréquentes appartiennent aux espèces *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Rhodobacter sp.*, *Pseudomonas fulva*, *Rhizobium huautlense* et *Massilia timonae*, alors que les séquences fongiques appartiennent principalement au genre *Cladosporium* et *Cryptococcus*.

De nouvelles méthodes basées sur l'utilisation de la technologie du séquençage haut débit permettent de réaliser un inventaire plus exhaustif du microbiome du rouissage. Cette technologie a été utilisée par Visi et al. [155] lors du rouissage du kéraf à l'eau, et par Zhao et al. [5] lors du rouissage du lin à l'eau. Ces deux auteurs ont seulement étudié la communauté bactérienne. En outre, plus récemment par cette méthode, Djemiel et al. [154] ont étudié les deux communautés (fongique et bactérienne) impliquées lors de rouissage du lin en champ. Ces auteurs ont identifié vingt-trois phyla bactériens et six phyla fongiques dans des échantillons de sol où les tiges ont été étalées et onze phylas bactériens et quatre phyla fongiques dans des échantillons de plantes. Les phyla dominants sont les protéobactéries, les bactéroïdes, les actinobactéries et les Firmicutes (bactéries), ainsi que les *Ascomycota*, les *Basidiomycota* et les *Zygomycota* (champignons). Lors de rouissage, l'abondance relative du phylum des Bacteroidetes augmente tandis que celle des Protobactéries diminue. De même pour les champignons, il a été constaté que l'abondance

relative des *Ascomycota* augmente aux dépens des *Basidiomycota*. Ces auteurs ont également remarqué que *Sphingomonas sp* est présente tout au long de rouissage. De plus, *Sphingomonas* et *Pseudomonas* deviennent plus abondants vers la fin de la période du rouissage, ce qui peut indiquer un sur rouissage et l'altération de l'intégrité structurale de la fibre.

Cette approche microbiologique est primordiale pour relier l'émergence de certaines populations fonctionnelles à la dégradation de certains composés dont les ciments pectiques et la cellulose.

4.2.8. Emission de Composés Organiques Volatils (COV)

Une autre voie pour caractériser le comportement des tiges pendant le rouissage pourrait être l'évolution des émissions de Composés Organiques Volatils (COV) et de l'odeur. Afin de réduire le stress biotique et abiotique, il a été révélé que les plantes libèrent des odeurs et des COV pour lutter contre les agressions environnementales.

Les COV sont un groupe de molécules organiques qui ont une pression de vapeur élevée à température ambiante et qui peuvent facilement se trouver sous forme gazeuse dans l'atmosphère. La directive européenne du 11 mars 1999 définit les COV comme des composés organiques ayant une pression de vapeur saturante supérieure à 0,01 KPa à une température de 293,15 °K ou ayant une volatilité équivalente dans les conditions particulières de leur utilisation. Deux grandes catégories de COV ont été répertoriées : ceux qui sont liés à l'activité humaine (COV anthropiques) et ceux qui sont liés aux sources naturelles (COV biogéniques). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux COV biogéniques émis par les plantes. Cette source est la plus importante par rapport aux autres sources naturelles et représente 98% de la totalité des émissions naturelles.

Les plantes produisent et émettent différents composés organiques dont des terpènes, alcools, alcènes, aldéhydes, éthers, cétones.... Ces composés sont essentiels lors du développement de la plante, et jouent un rôle de protection, de défense et de communication. Les terpénoïdes ou les terpènes sont les principaux composés émis par les plantes. Les terpènes regroupent les terpènes oxygénés et les terpènes non-oxygénés. Selon le nombre d'atomes de carbone, les terpénoïdes sont appelés hémiterpène (C5), monoterpène (C10), ou sesquiterpène (C15). La figure I.30 illustre quelques exemples de terpénoïdes. Parmi les composés terpéniques les plus répandus, on retrouve les composés

tels que l'isoprène, le α -pinène, le β -pinène, le camphène, le limonène, le myrcène, le 3-carène...

Les plantes émettent fréquemment des alcools (méthanol,...) et des aldéhydes (éthanal,...).

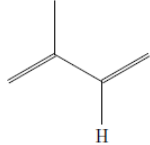

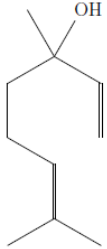
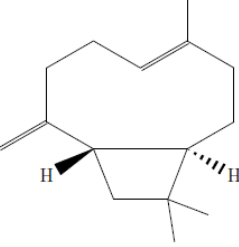
C5	isoprène	
C10	α -pinène	 
C15	Caryophyllène	

Figure I.30. Quelques exemples de terpénoïdes

Chaque composé a un rôle particulier. Par exemple selon Singaas et al. [159], l'émission de composés comme l'isoprène a pour but de protéger la plante de la déshydratation à des températures élevées. D'autres composés comme les monoterpènes permettent aux plantes de communiquer entre elles aux niveaux trophiques [160-162], d'attirer les pollinisateurs et les animaux qui dispersent les graines [162-164], de se protéger contre le stress biotique et abiotique [163] et de se défendre de manière directe ou indirecte contre un herbivore ou un pathogène [165]. La figure I.31 présente les principaux rôles des COV dans les interactions des plantes avec leur environnement.

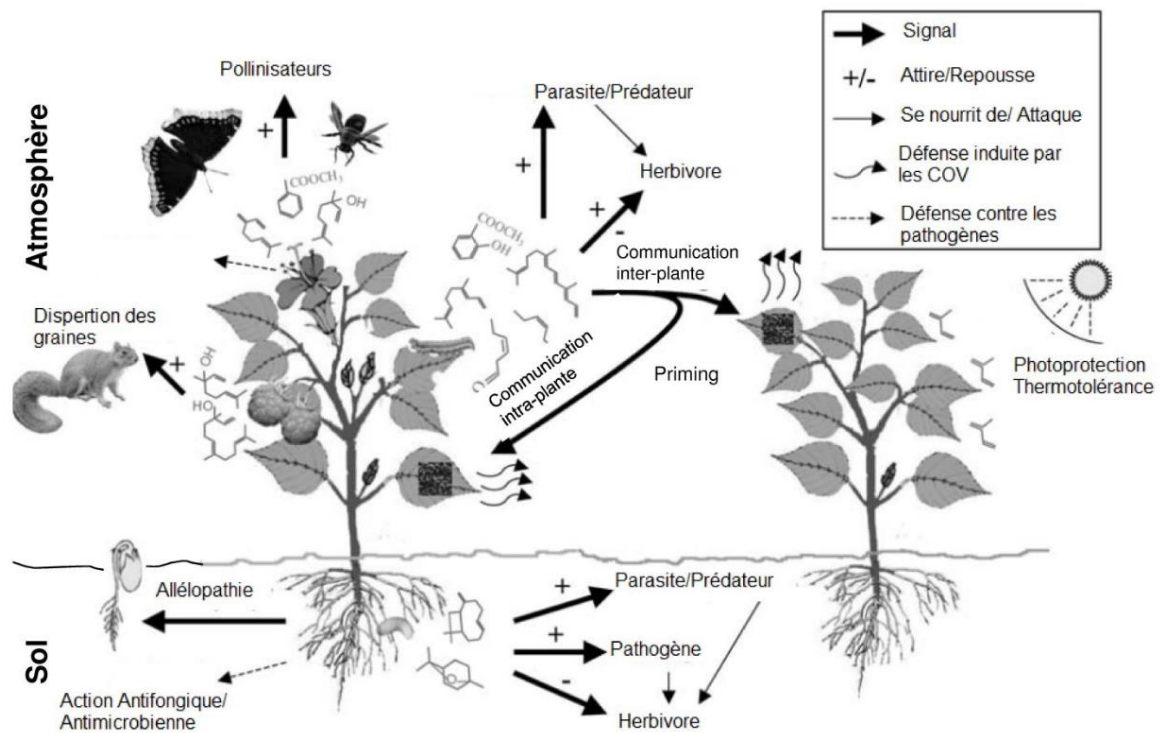


Figure I.31. Schéma des interactions des plantes avec leur environnement via les COV (modifié d'après Dudareva, Negre et al.2006)

Il convient de souligner que, lors des interactions entre la plante et l'environnement, les plantes n'émettent pas à elles-seules des COV, le métabolisme d'autres organismes/microorganismes générant également des émissions de composés volatils. Concernant les plantes uniquement, les émissions de composés organiques par les plantes ont été localisées au niveau des stomates [117], de l'épiderme ou de la cuticule [7,166] et lors d'une blessure [166].

Les facteurs environnementaux affectant les émissions de COV des plantes peuvent être classés en deux catégories :

- Les facteurs abiotiques tels que la température [159,167], la sécheresse [168], la pollution atmosphérique [169], les précipitations [170] et les rayonnements UV [171] créent des conditions affectant le taux de métabolisme primaire qui à son tour influence la synthèse et l'émission de COV végétaux.
- Les facteurs biotiques : Les plantes sont constamment attaquées par des insectes herbivores, des herbivores et des agents pathogènes des mammifères, qui peuvent influencer le métabolisme primaire et secondaire. Les insectes herbivores affectent profondément les émissions de COV de diverses espèces végétales, car ils exercent un contrôle génétique et physiologique sur les émissions de COV. Les dommages

causés par les herbivores entraînent une libération importante de COVs [172]. Les COVs émis après les dommages causés par les herbivores sont impliqués dans la défense des plantes [172] en réduisant l'aptitude des insectes à se nourrir de la plante en raison de leur toxicité directe [161]. Certains de ces composés jouent un rôle important dans la communication multi-trophique entre organismes. Ils permettent aux insectes spécialisés défoliateurs de localiser la plante hôte et aux prédateurs naturels de ces insectes défoliateurs de localiser leur proie [173]. L'émission des COV après l'attaque des insectes herbivores varie en fonction des espèces végétales, de l'âge et du stade de développement des plantes, du type et de l'intensité des dommages, du type de tissu attaqué, des espèces d'insectes et du mode d'alimentation [174,175].

Aucune étude sur l'émission des composés organiques volatils émis par les tiges pendant le rouissage n'a été recensé à ce jour. Pourtant, lors du rouissage, les facteurs abiotiques et biotiques affectent la structure des plantes et fort probablement, les émissions de COV. Par conséquent, le suivi de l'évolution des COVs lors du traitement de rouissage serait intéressant car pourrait permettre de caractériser plus finement encore ce procédé.

5. Conclusions

La récente prise en compte des facteurs environnementaux et économiques dans l'élaboration des matériaux contraint les industriels à développer de nouveaux matériaux ayant un impact négatif moindre sur l'environnement et pour lesquels les coûts des matières premières et de fabrication sont modérés. L'utilisation de ressources renouvelables, comme les fibres végétales (chanvre) en tant que renforts dans des matrices polymères (biocomposites) permettrait de pallier ces contraintes environnementales et économiques. En plus de leur disponibilité, ces fibres présentent également des atouts liés directement à leurs propriétés intrinsèques comme la densité, la biodégradabilité, les propriétés mécaniques, et indirectement, au coût de fabrication des matériaux biocomposites. Néanmoins, la variabilité des propriétés physico-chimiques et de stabilité thermique des fibres végétales a été observée dans différentes applications. De plus, le niveau d'adhérence entre la fibre végétale et la matrice ainsi qu'une durée de vie limitée dans certaines conditions d'utilisation constituent des freins majeurs à une utilisation plus large de ces fibres. Une des voies pour lever ces verrous est d'être en mesure de mieux contrôler

l'ensemble des étapes de transformation des fibres végétales depuis le champ (rouissage) jusqu'à l'obtention de la fibre technique.

La fibre de chanvre a fait l'objet de nombreux travaux de recherche et possède des propriétés compatibles avec une utilisation dans le cadre de la fabrication des biocomposites. Cette fibre subit un traitement préliminaire de rouissage (première étape de transformation dans les champs) qui consiste à couper et mettre les tiges de chanvre en contact avec le sol, où elles sont colonisées par des microorganismes (champignons et bactéries) produisant notamment des enzymes pectinolytiques. Ce développement microbien entraîne l'élimination de certains ciments naturels qui assurent le lien entre les faisceaux de fibres. Ce traitement de rouissage est réalisé à l'heure actuelle de manière empirique et conduit à une variabilité des caractéristiques des fibres de chanvre en termes de couleur, de microstructure, de composition biochimique et de propriétés thermiques et mécaniques. Ainsi, la maîtrise de cette étape de rouissage est primordiale.

Actuellement, les agriculteurs cultivant le chanvre déterminent le degré de rouissage d'une façon très empirique en se basant sur des critères comme la couleur, la ténacité des pailles et des tests mécaniques manuels. Ces paramètres ne reflètent que très partiellement la qualité des fibres. Ainsi, il est très difficile pour les agriculteurs de chanvre de fournir des tiges répondant aux spécifications des industriels pour une application visée. Par conséquent, il est essentiel de mettre des outils d'aide à la décision permettant de mesurer de manière plus précise le degré du rouissage afin d'obtenir des fibres végétales répondant aux exigences des secteurs d'application visés.

Ce travail de thèse a un double objectif :

- Améliorer la compréhension de ce procédé de rouissage en champ.
- Proposer des recommandations dans le but d'identifier, à terme, des indicateurs de la maturité des fibres fiables et faciles à mettre en œuvre par les agriculteurs

Dans ce cadre, l'étude de cette étape de rouissage s'articule donc autour de différents items :

- La connaissance des caractéristiques intrinsèques des fibres de chanvre (couleur, morphologie, composition biochimique, microstructure, propriétés mécaniques, propriétés thermiques,) (**chapitre II**). Quel est l'impact de la période de récolte (début ou fin de floraison, période de semence) et des conditions climatiques sur les caractéristiques intrinsèques de fibres de chanvre pendant le rouissage.

- La caractérisation des émissions gazeuses associées au procédé de rouissage de fibres de chanvre. Comment évolue certaines caractéristiques de l'odeur associée à ces émissions gazeuses pendant le rouissage ? (**chapitre III**)
- La compréhension du (des) mécanisme(s) biologique(s) du rouissage des fibres de chanvre (**chapitre IV**). Quelle est la dynamique temporelle des densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques au cours du processus de rouissage ? Dans quel compartiment (sol, tige, système racinaire) se trouve localisée la microflore pectinolytique ?
- L'évaluation de l'impact du rouissage sur les propriétés d'un matériau composite renforcé par les fibres de chanvre à différents degrés de rouissage. Les propriétés mécaniques d'un polypropylène renforcé par des fibres de chanvre rouies à différents stades évoluent-elles dans le même sens que les fibres seules ? (**chapitre V**)

Références

- [1] Cronquist. Système de classification d'Arthur Cronquist Tracheobionta (Végétaux vasculaires) 1981.
- [2] Chase MW, Fay MF, Reveal JL, Soltis DE, Soltis PS, Peter F, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III 2009:105–21.
- [3] Bouloc P (Collectif). Le Chanvre Industriel : Production et Utilisations. Editions France Agricole. ISBN 2-8557-130-8. 2006.
- [4] Abot A. Caractérisation des fibres phloémiennes de Chanvre (*Cannabis sativa*) en vue de leur utilisation dans des matériaux composites 2010; PhD.
- [5] Zhao D, Liu P, Pan C, Du R, Ping W, Ge J. Bacterial succession and metabolite changes during flax (*Linum usitatissimum* L.) retting with *Bacillus cereus* HDYM-02. *Sci Rep* 2016;6:31812.
- [6] <https://www.hermione.com/en/the-hermione-project/the-history/>
- [7] Hartikainen K, Nerg A -m, Kivimaenpaa M, Kontunen-soppela S, Maenpaa M, Oksanen E, et al. Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiol* 2009;29:1163–73.
- [8] [http://www.valbiom.be/files/library/Docs/Chanvre/fiche-chanvre-2013-\(leger\).pdf](http://www.valbiom.be/files/library/Docs/Chanvre/fiche-chanvre-2013-(leger).pdf)
- [9] <http://www.terresinovia.fr>.
- [10] V. Mediavilla , M. Leupin AK. Influence of the growth stage of industrial hemp on the yield formation in relation to certain fibre quality traits. *Ind Crops Prod* 2001;13:49–56.
- [11] Keller A, Leupin M, Mediavilla V, Wintermantel E. Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. *Ind Crops Prod* 2001;13:35–48.
- [12] Johnson R. Hemp as an Agricultural Commodity, Congressional Research Service report 2018.:1–44.
- [13] Mussatto I.S. E. Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery 2016.
- [14] Kraenzel, D. G, T. Petry, B. Nelson, M. J. Anderson, D. Mathern & RT. Industrial hemp as

- an alternative crop in North Dakota. Agric Econ Rep Number 402 1998:1–23.
- [15] A road map to thriving industrial biotechnology sector in Europe, 2015, European Report., Commission .
- [16] Aluko R.E. Sustainable Protein Sources, chapter 7, Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins: composition, Structure, Enzymatic Modification, and Functional or Bioactive Properties, University of Manitoba, Winnipeg, MB, 2016 Canada :121–32.
- [17] Spalding D. Industrial Hemp Production. CCD Crop Profiles 2014: <http://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/hempproducti>.
- [18] Cherrett N, Barrett J, Clemett A, Chadwick M, Chadwick M. Ecological Footprint and Water Analysis of Cotton, Hemp and Polyester. *Tockholm Environ Inst*:1–38.
- [19] Saxena M, Pappu A, Sharma A, Haque R, Wankhede S. Composite Materials from Natural Resources: Recent Trends and Future Potentials. *Adv. Compos. Mater. - Anal. Nat. Man-Made Mater., InTech*; 2011.
- [20] Saheb DN, Jog JP. Natural fiber polymer composites: A review. *Adv Polym Technol* 1999;18:351–63.
- [21] Mohammed L, Ansari MNM, Pua G, Jawaid M, Islam MS. A Review on Natural Fiber Reinforced Polymer Composite and Its Applications. *Int J Polym Sci* 2015;2015:1–15.
- [22] www.bioplastics.com n.d. doi:www.bioplastics.com.
- [23] www.guide-maison-ecologique.com/content/22-le-chanvre)
- [24] www.chanvrewallon.be n.d.
- [25] Arora R. Medicinal plant biotechnology, CAB International 2010:431–459.
- [26] El-Alfy, A.T, Ivey, K, Robinson, K., et al., 2010, Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacology Biochemical Behavior*, 95 (4), 434–442.
- [27] Rock, E.M, Bolognini, D., Limebeer, C.L., et al. Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus, *Britis* 2012.
- [28] Hazekamp A. Cannabis; extracting the medicine, Doctorale Thesis, University of Leiden. 2007.
- [29] Liu M, Fernando D, Daniel G, Madsen B, Meyer AS, Ale MT, et al. Effect of harvest time and field retting duration on the chemical composition, morphology and mechanical properties of hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;69:29–39.
- [30] Tanja Schäfer BH. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Ind Crops Prod* 2006;23:88–98.
- [31] Réquillé S, Goudenhoft C, Bourmaud A, Le Duigou A, Baley C. Exploring the link

- between flexural behaviour of hemp and flax stems and fibre stiffness. *Ind Crops Prod* 2018;113:179–86.
- [32] Amaducci S, Pelatti F, Bonatti PM. Fibre Development in Hemp (*Cannabis sativa* L.) as Affected by Agrotechnique. *J Ind Hemp* 2005;10:31–48.
- [33] Sankari HS. Comparison of bast fibre yield and mechanical fibre properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars. *Ind Crops Prod* 2000;11:73–84.
- [34] Crônier D, Monties B, Chabbert BR. structure and chemical composition of bast fibers isolated from developing hemp stem. *J Agric Food Chem* 2005;53:8279–89.
- [35] C. Baley, “Fibres naturelles de renfort pour matériaux composites,” *Techniques de l’ingénieur*, vol. AM 5 130v2, pp. 1–17, 2013.
- [36] Bourmaud A, Beaugrand J, Shah DU, Placet V, Baley C. Towards the design of high-performance plant fibre composites: How can we best define the diversity and specificities of plant cell walls? *Prog Mater Sci* 2018;97:347–408.
- [37] Lapierre I, Belmont P, Bilan écologique du lin de la graine au tissu , *Mémoire de fin d’étude de l’Ecole Nationale Supérieure des Arts et Industries Textiles de Roubaix* (1994). n.d.
- [38] Nultsch W, 1998- *Botanique générale*
- [39] Vallade J, *Structure et développement de la plante. Morphogénèse et biologie de la reproduction des angiospermes.* 1999.
- [40] Brett C, Waldron K. 1996 *Physiology and biochemistry of plant cell walls.*
- [41] Nilsson T, Gustafsson P.J, “Influence of dislocations and plasticity on the tensile behavior of flax and hemp fibres”, *Composites : Part A* (2007), 38, 1722-1728. n.d.
- [42] Preston, R. D. *The physical biology of plant cell walls* (1974)
- [43] Charlet K, Baley C, Morvan C, Jernot JP, Gomina M, Bréard J. Characteristics of Hermès flax fibres as a function of their location in the stem and properties of the derived unidirectional composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2007;38:1912–21.
- [44] Bismarck A, Mishra S, Lampke T, *Pant Fibres as Reinforcement for Green Composites, Natural fibres, Biopolymers and Biocomposites*, CRC Press, Boca Raton (FL),2005.
- [45] Placet V, Trivaudey F, Cisse O, Gucheret-Retel V, Boubakar ML. Diameter dependence of the apparent tensile modulus of hemp fibres: A morphological, structural or ultrastructural effect? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2012;43:275–87.
- [46] Bourmaud A, Morvan C, Bouali A, Placet V, Perré P, Baley C. Relationships between micro-fibrillar angle, mechanical properties and biochemical composition of flax fibers. *Ind Crops Prod* 2013;44:343–51.
- [47] Jankauskienė Z, Butkutė B, Gruzdevienė E, Cesevičienė J, Fernando AL. Chemical composition and physical properties of dew- and water-retted hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;75:206–11.

- [48] Pakarinen A, Zhang J, Brock T, Majjala P, Viikari L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. *Bioresour Technol* 2012;107:275–81.
- [49] Van der Werf HMG, Harsveld van der Veen JE, Bouma a. TM, ten Cate M. Quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) stems as a raw material for paper. *Ind Crops Prod* 1994;2:219–27.
- [50] Bonatti PM, Ferrari C, Focher B, Grippo C, Torri G, Cosentino C. Histochemical and supramolecular studies in determining quality of hemp fibres for textile applications. *Euphytica* 2004;140:55–64.
- [51] Di Candilo M, Bonatti PM, Guidetti C, Focher B, Grippo C, Tamburini E, et al. Effects of selected pectinolytic bacterial strains on water-retting of hemp and fibre properties. *J Appl Microbiol* 2010;108:194–203.
- [52] Zhang J, Zhang H, Zhang J. Evaluation of liquid ammonia treatment on surface characteristics of hemp fiber. *Cellulose* 2014;21:569–79.
- [53] Thygesen A, Madsen B, Bjerre AB, Lilholt H. Cellulosic Fibers: Effect of Processing on Fiber Bundle Strength. *J Nat Fibers* 2011;8:161–75.
- [54] Festucci-Buselli R a, Otoni WC, Joshi CP. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian J Plant Physiol* 2007;19:1–13.
- [55] Jarvis M. Chemistry: cellulose stacks up. *Nature* 2003;426:611–2.
- [56] Klemm D, Heublein B, Fink H-P, Bohn A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew Chemie Int Ed* 2005;44:3358–93.
- [57] Heinze T, Petzold-Welcke K, van Dam JEG. Polysaccharides: Molecular and Supramolecular Structures. Terminology. *Eur. Polysacch. Netw. Excell.*, Vienna: Springer Vienna; 2012, p. 23–64.
- [58] Sticklen MB. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat Rev Genet* 2008;9:433–43.
- [59] Haiping Yang, Rong Yan, Hanping Chen, Dong Ho Lee, Chuguang Zheng, 2007; Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis; *Fuel* 86, 1781-1788.
- [60] Maya Jacob John, Sabu Thomas, 2008; Biofibres and biocomposites; *Carbohydrate Polymers* 71, 343-364.
- [61] Ljungdahl LG. Cellulases and the cellulosome concept, in *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Ruminantse Utilization by Ruminants*. Elsevier, New York, NY 1990:65–273.
- [62] <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=159>
- [63] Mamman AS, Lee JM, Kim YC, Hwang IT, Park NJ, Hwang YK, et al. Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2008;2:438– 54.

- [64] Maya Jacob John, Rajesh D. Anandjiwala, 2008; Recent Developments in Chemical Modification and Characterization of Natural Fiber-Reinforced Composites; Polymer composites, 187-207.
- [65] Suganti Ramarad; Preparation and properties of kenaf bast fiber filled (plasticized) poly(lactic acid) composites; Master, 2008.
- [66] Cousins WJ. Young's modulus of hemicellulose as related to moisture content. *Wood Sci Technol* 1978;12:161-7.
- [67] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 2010;61:263-89.
- [68] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:519-46.
- [69] Yinghuai Z, Tang K, S. N. Applications of Ionic Liquids in Lignin Chemistry. *Ion. Liq. - New Asp. Futur.*, vol. 2, InTech; 2013, p. 315-46.
- [70] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:519-46.
- [71] https://fr.wikipedia.org/wiki/Lignine#/media/File:Monolignols_general.svg
- [72] Panchev IN, Slavov A, Nikolova K, Kovacheva D. On the water-sorption properties of pectin. *Food Hydrocoll* 2010;24:763-9.
- [73] Anthon GE, Barrett DM. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chem* 2008;110:239-47.
- [74] Meijer WJM, Vertregt N, Rutgers B, van de Waart M. The pectin content as a measure of the retting and rettability of flax. *Ind Crops Prod* 1995;4:273-84.
- [75] Fila G, Manici L, Caputo F. In vitro evaluation of dew retting of flax by fungi from southern Europe. *Ann Appl Biol* 2001;138:343-51.
- [76] Mussig J. Industrial Applications of Natural Fibres 'Structure, Properties and Technical Applications. 2010.
- [77] Gutiérrez A, del Río JC, González-Vila FJ, Martín F. Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. *J Chromatogr A* 1998;823:449-55.
- [78] Foulk JA, Akin DE, Dodd RB. Processing techniques for improving enzyme-retting of flax. *Ind Crops Prod* 2001;13:239-48.
- [79] Marques G, del Río JC, Gutiérrez A. Lipophilic extractives from several nonwoody lignocellulosic crops (flax, hemp, sisal, abaca) and their fate during alkaline pulping and TCF/ECF bleaching. *Bioresour Technol* 2010;101:260-7.
- [80] Duval A, Bourmaud A, Augier L, Baley C. Influence of the sampling area of the stem on the mechanical properties of hemp fibers. *Mater Lett* 2011;65:797-800.

- [81] Garat W, Corn S, Le Moigne N, Beaugrand J, Bergeret A. Analysis of the morphometric variations in natural fibres by automated laser scanning: Towards an efficient and reliable assessment of the cross-sectional area. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2018;108:114–23.
- [82] Haag K, Müssig J. Scatter in tensile properties of flax fibre bundles: influence of determination and calculation of the cross-sectional area. *J Mater Sci* 2016;51:7907–17.
- [83] Alix S, Philippe E, Bessadok a., Lebrun L, Morvan C, Marais S. Effect of chemical treatments on water sorption and mechanical properties of flax fibres. *Bioresour Technol* 2009;100:4742–9.
- [84] Marrot L, Lefeuvre A, Pontoire B, Bourmaud A, Baley C. Analysis of the hemp fiber mechanical properties and their scattering (Fedora 17). *Ind Crops Prod* 2013;51:317–27.
- [85] Van der Werf HMG, Wijlhuizen M, de Schutter JAA. Plant density and self-thinning affect yield and quality of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *F Crop Res* 1995;40:153–64.
- [86] Stamboulis, A., Baillie, C.A., Peijs, T. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. *Compos. Part A* 2001; .32.1105-1115.
- [87] Mediavilla V, Jonquera M, Schmid-slembrouck I. Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L .). *Ind Crops Prod* 1998;5:68–74.
- [88] Martin N, Mouret N, Davies P, Baley C. Influence of the degree of retting of flax fibers on the tensile properties of single fibers and short fiber/polypropylene composites. *Ind Crops Prod* 2013;49:755–67.
- [89] Placet V, Day A, Beaugrand J. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. *J Mater Sci* 2017;52:5759–77.
- [90] Placet V. Characterization of the thermo-mechanical behaviour of Hemp fibres intended for the manufacturing of high performance composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2009;40:1111–8.
- [91] Eichhorn SJ, Young RJ. Composite micromechanics of hemp fibres and epoxy resin microdroplets. *Compos Sci Technol* 2004;64:767–72.
- [92] Bourmaud A, Baley C. Rigidity analysis of polypropylene/vegetal fibre composites after recycling. *Polym Degrad Stab* 2009;94:297–305.
- [93] Fan M. Characterization and performance of elementary hemp fibers: factors influencing tensile strength. *Bioresources* 2010;5:2307–22.
- [94] Chakravarty A., *The Indian Textile Journal* (1974), 81-89.
- [95] The Textile Institute, “Identification of Textile Materials”, 7ème édition, édité par The Textile Institute, Manchester, Royaume-Uni (1975)..

- [96] Harris M., in: Harris's Handbook of textile fibers, Harris Research Laboratory, Washington D.C., USA (1954).
- [97] Rowell R.M, Han J.S, Rowell J.S, "Characterization and factors effecting fiber properties", In : Natural Polymers and Agrofibers composites, édité par E. Frollini, A.L. Leao et L.H.C. Mattoso, San Carlos, Brésil, p.115-134 (2000).
- [98] Stout H.P, Jenkins J.A, "Comparative strengths of some bast and leaf fibres", *Annales Textiles Belges* (1955), 4, 231-251.
- [99] Joshi S V, Drzal LT, Mohanty AK, Arora S. Are natural fiber composites environmentally superior to glass fiber reinforced composites? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2004;35:371-6.
- [100] Faruk O, Bledzki AK, Fink HP, Sain M. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000-2010. *Prog Polym Sci* 2012;37:1552-96.
- [101] Aziz SH, Ansell MP. The effect of alkalization and fibre alignment on the mechanical and thermal properties of kenaf and hemp bast fibre composites : Part 1 – polyester resin matrix. *Composites Science and Technology* 2004;64:1219-30.
- [102] Islam MS, Kim L P, Nic J F. Influence of Alkali Fiber Treatment and Fiber Processing on the Mechanical Properties of Hemp/Epoxy Composites Mohammad. *J Appl Polym Sci* 2010;21:449-56.
- [103] Bourmaud A, Baley C. Effects of thermo mechanical processing on the mechanical properties of biocomposite flax fibers evaluated by nanoindentation. *Polym Degrad Stab* 2010;95:1488-94.
- [104] P. Joseph, Effect of processing variables on the mechanical properties of sisal-fiber reinforced polypropylene composites, *Compos. Sci. Technol.* 59 (1999) 1625-1640.
- [105] Ouajai S, Shanks RA. Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments. *Polym Degrad Stab* 2005;89:327-35.
- [106] Kabir MM, Wang H, Lau KT, Cardona F. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. *Appl Surf Sci* 2013;276:13-23.
- [107] Baley C, Busnel F, Grohens Y, Sire O. Influence of chemical treatments on surface properties and adhesion of flax fibre-polyester resin. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2006;37:1626-37.
- [108] Cantero G, Arbelaiz A, Llano-Ponte R, Mondragon I. Effects of fibre treatment on wettability and mechanical behaviour of flax/polypropylene composites. *Compos Sci Technol* 2003;63:1247-54.
- [109] Tserki V, Zafeiropoulos NE, Simon F, Panayiotou C. A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2005;36:1110-8.
- [110] Arbelaiz A, Fernández B, Cantero G, Llano-Ponte R, Valea A, Mondragon I. Mechanical properties of flax fibre/polypropylene composites. Influence of fibre/matrix modification and glass fibre hybridization. *Compos Part A Appl Sci Manuf*

2005;36:1637–44.

- [111] Biagiotti J, Puglia D, Kenny JM. A Review on Natural Fibre-Based Composites-Part I. *J Nat Fibers* 2004;1:37–68.
- [112] Badji C, Beigbeder J, Garay H, Bergeret A, Bénézet J-C, Desauziers V. Natural weathering of hemp fibers reinforced polypropylene biocomposites: Relationships between visual and surface aspects, mechanical properties and microstructure based on statistical approach. *Compos Sci Technol* 2018;167:440–7.
- [113] Ragoubi M, George B, Molina S, Bienaimé D, Merlin A, Hiver J-M, et al. Effect of corona discharge treatment on mechanical and thermal properties of composites based on miscanthus fibres and polylactic acid or polypropylene matrix. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2012;43:675–85.
- [114] Bourmaud A, Ausias G, Lebrun G, Tachon M-L, Baley C. Observation of the structure of a composite polypropylene/flax and damage mechanisms under stress. *Ind Crops Prod* 2013;43:225–36.
- [115] Kessler RW, Becker U, Kohler R, Goth B. Steam explosion of flax — a superior technique for upgrading fibre value. *Biomass and Bioenergy* 1998;14:237–49.
- [116] Vignon, M.R., Dupeyre, D., Garcia-Jaldon, C. Morphological characterization of steam-exploded hemp fibers and their utilization in polypropylene-based composites. *Bioresource Technol.* 1997; 58, 203–215.
- [117] Harley PC. The Roles of Stomatal Conductance and Compound Volatility in Controlling the Emission of Volatile Organic Compounds from Leaves, 2013, p. 181–208.
- [118] Sisti L, Totaro G, Vannini M, Celli A. Retting Process as a Pretreatment of Natural Fibers for the Development of Polymer Composites. *Lignocellulosic Composite Materials* 2018; pp 97-135.
- [119] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Analysis of green hemp fibre reinforced composites using bag retting and white rot fungal treatments. *Ind Crops Prod* 2009;29:420–6.
- [120] Liu M, Meyer AS, Fernando D, Silva DAS, Daniel G, Thygesen A. Effect of pectin and hemicellulose removal from hemp fibres on the mechanical properties of unidirectional hemp/epoxy composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2016;90:724–35.
- [121] Md. Tahir P, Ahmed AB, SaifulAzry SO a, Ahmed Z. Retting process of some bast plant fibres and its effect on fibre quality: A review. *BioResources* 2011;6:5260–81.
- [122] Akin DE. Linen Most Useful: Perspectives on Structure, Chemistry, and Enzymes for Retting Flax. *ISRN Biotechnol* 2013;2013:1–23.
- [123] Nair G, Rho D, Raghavan G. Application of Electro-Technologies in Processing of Flax Fiber. *Fibers* 2013;1:21–35.
- [124] Nair G, Singh A, Zimniewska M, Raghavan V. Comparative Evaluation of Physical and Structural Properties of Water Retted and Non-retted Flax Fibers. *Fibers* 2013;1:59–69.

- [125] Rosemberg J a. Bacteria responsible for the retting of Brazilian flax. *Appl Microbiol* 1965;13:991-2.
- [126] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, et al. Identification and Retting Efficiencies of Fungi Isolated from Dew-Retted Flax in the United States and Europe. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:3950-6.
- [127] Frontier Culture Museum of Virginia (2012)
<http://frontierculturemuseum.blogspot.it/2012/08/retting-flax.html>.
- [128] Rouissage de lin (2014)
<https://blumenkinderheirlooms.wordpress.com/2014/08/30/retting-the-flax/>.
- [129] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, et al. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and europe. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3950-6.
- [130] Akin DE, Condon B, Sohn M, Foulk JA, Dodd RB, Rigsby LL. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase. *Ind Crops Prod* 2007;25:136-46.
- [131] Akin DE, Epps HH, Archibald DD, Sharma HSS. Color Measurement of Flax Retted by Various Means. *Text Res J* 2000;70:852-8.
- [132] Liu M, Ale MT, Kołaczkowski B, Fernando D, Daniel G, Meyer AS, et al. Comparison of traditional field retting and *Phlebia radiata* Cel 26 retting of hemp fibres for fibre-reinforced composites. *AMB Express* 2017;7.
- [133] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J-L, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015:4471-84.
- [134] Kozasowski RM, Mackiewicz-Talarczyk M, Allam AM. Bast fibres: flax. *Handb. Nat. Fibres*, Elsevier; 2012, p. 56-113.
- [135] Morrison WH, Archibald DD, Sharma HSS, Akin DE. Chemical and physical characterization of water- and dew-retted flax fibers. *Ind Crops Prod* 2000;12:39-46.
- [136] Bleuze L, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chabbert B. Tracking the dynamics of hemp dew retting under controlled environmental conditions. *Ind Crops Prod* 2018;123:55-63.
- [137] Jankauskienė Z, Gruzdevienė E. Physical parameters of dew retted and water retted hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. *Zemdirbyste-Agriculture* 2013;100:71-80.
- [138] Nykter M, Kyma H, Belinda A, Lilholt H, Thygesen A. Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) 2008;32:392-9.
- [139] Musialak M, Wróbel-Kwiatkowska M, Kulma A, Starzycka E, Szopa J. Improving retting of fibre through genetic modification of flax to express pectinases. *Transgenic Res* 2008;17:133-47.
- [140] Segal L, Creely JJ, Conrad M, Martin AE. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text Res J*

1958:786–94.

- [141] Rambo MKD, Ferreira MMC. Determination of Cellulose Crystallinity of Banana Residues Using Near Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J Braz Chem Soc* 2015;00:1–9.
- [142] Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK. Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels* 2010;3:1–10.
- [143] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Determination of interfacial shear strength of white rot fungi treated hemp fibre reinforced polypropylene. *Compos Sci Technol* 2009;69:1165–71.
- [144] Zafeiropoulos NE, Baillie CA, Matthews FL. Study of transcrystallinity and its effect on the interface in flax fibre reinforced composite materials. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2001;32:525–43.
- [145] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015:4471–84.
- [146] Akin DE, Foulk JA, Dodd RB, Mcalister DD. Enzyme-retting of flax and characterization of processed fibers 2001. *J Biotechnol* 2001;89:193–203.
- [147] Sawpan MA, Pickering KL, Fernyhough A. Effect of various chemical treatments on the fibre structure and tensile properties of industrial hemp fibres. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2011;42:888–95.
- [148] Bledzki A, Gassan J. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog Polym Sci* 1999;24:221–74.
- [149] Placet V, François C, Day A, Beaugrand J, Ouagne P. Industrial Hemp Transformation for Composite Applications: Influence of Processing Parameters on the Fibre Properties. *Adv Nat Fibre Compos* 2018:13–25.
- [150] Mazian B, Bergeret A, Benezet J-C, Malhautier L. Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering. *Ind Crops Prod* 2018;116:170–81.
- [151] Akin DE. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2008;2:288–303.
- [152] Montella S, Ventorino V, Lombard V, Henrissat B, Pepe O, Faraco V. Discovery of genes coding for carbohydrate-active enzyme by metagenomic analysis of lignocellulosic biomasses. *Sci Rep* 2017;7:42623.
- [153] Ventorino V, Aliberti A, Faraco V, Robertiello A, Giacobbe S, Ercolini D, et al. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci Rep* 2015;5:8161.
- [154] Djemiel C, Grec S, Hawkins S. Characterization of bacterial and fungal community dynamics by high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding during flax dew-

- retting. *Front Microbiol* 2017;8:1–16.
- [155] Visi DK, D'Souza N, Ayre BG, Webber III CL, Allen MS. Investigation of the bacterial retting community of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) under different conditions using next-generation semiconductor sequencing. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2013;40:465–75.
- [156] Sharma HSS. Studies on chemical and enzyme retting of flax on a semi-industrial scale and analysis of the effluents for their physico-chemical components. *Int Biodeterior* 1987;23:329–42.
- [157] Tamburini E, Leon AG, Perito B, Mastromei G. Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the water retting process. *Environ Microbiol* 2003;5:730–6.
- [158] Fu J, Mueller H, de Castro J V, Yu C, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM, et al. Changes in the bacterial community structure and diversity during bamboo retting. *Biotechnol J* 2011;6:1262–71.
- [159] Singsaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD. Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiol* 1997;115:1413–20.
- [160] Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, et al. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:16672–6.
- [161] Kessler A. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* (80-) 2001;291:2141–4.
- [162] Maffei ME. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African J Bot* 2010;76:612–31.
- [163] Pichersky E, Gershenzon J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:237–43.
- [164] Slaughter JC. The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol Rev* 2007;74:259–76.
- [165] Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* 1988;75:225–33.
- [166] Kesselmeier J, Staudt M. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J Atmos Chem* 1999;33:23–88.
- [167] Clark R, Menary R. The effect of irrigation and nitrogen on the yield and composition of peppermint oil (*Mentha piperita* L.). *Aust J Agric Res* 1980;31:489.
- [168] Capitani D, Brilli F, Mannina L, Proietti N, Loreto F. In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiol* 2009;149:1638–47.
- [169] Pinto DM, Blande JD, Nykänen R, Dong W-X, Nerg A-M, Holopainen JK. ozone degrades common herbivore-induced plant volatiles: does this affect herbivore prey location by

- predators and parasitoids? *J Chem Ecol* 2007;33:683–94.
- [170] Copolovici L, Niinemets Ü. Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance. *Plant Cell Environ* 2010: 1582-94.
- [171] Filella I, Peñuelas J. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecol* 1999;145:157–65.
- [172] Monson RK Metabolic and gene expression controls on the production of biogenic volatile organic compounds. In: Niinemets Ü, Monson RK (eds) *Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions*, vol 5, *Tree physiology* 2013. Springer, Berlin.
- [173] Holopainen J. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends Plant Sci* 2004;9:529–33.
- [174] Takabayashi J, Dicke M, Posthumus MA. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: Variation caused by biotic and abiotic factors. *J Chem Ecol* 1994;20:1329–54.
- [175] Kessler A, Halitschke R. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Curr Opin Plant Biol* 2007;10:409–14.

CHAPITRE II

**INFLUENCE DU ROUISSAGE EN CHAMP SUR LES
PROPRIETES DES FIBRES DE CHANVRE RECOLTEES A
DIFFERENTS STADES DU CYCLE DE VIE DE LA PLANTE**

Introduction du chapitre

L'utilisation de fibres de chanvre en tant que renfort dans les matériaux composites nécessite une compréhension approfondie des processus de transformation de ces fibres. Dans ce contexte, le traitement amont appelé rouissage réalisé en champ fera l'objet d'une attention particulière. Comme indiqué dans le chapitre précédent, le rouissage est un traitement biologique qui permet de séparer les fibres de la partie ligneuse de la tige par la dégradation de ciments naturels. Cette pratique est actuellement effectuée de façon empirique dans les champs, ce qui entraîne une variabilité de la qualité des fibres de chanvre (couleur, morphologie, composition biochimique, microstructure, propriétés thermiques et propriétés mécaniques).

Ce chapitre comprend deux parties :

La **première partie** s'intéresse à l'influence de différentes durées du rouissage en champ (jusqu'à 9 semaines) sur les propriétés biochimiques, microstructurales, thermiques et mécaniques des fibres de chanvre récoltées en début de floraison. Pour cela, l'évaluation qualitative de la couleur, des analyses morphologiques (microscope optique), de surface (MEB) et biochimiques (extractions par solvant successives), des analyses de la teneur en pectines (spectrocolorimétrie), des analyses thermogravimétriques et mécaniques (essai de traction) ont été réalisées. Les résultats révèlent que la durée du rouissage entraîne un changement de la couleur des fibres du vert clair au gris foncé en raison d'un développement de la communauté microbienne (champignons et bactéries) à la surface de la tige. Une séparation des faisceaux de fibres en fibres élémentaires se produit avec la dégradation des « ciments naturels » présents dans la lamelle mitoyenne. Le taux de cellulose et son degré de cristallinité augmentent, avec une diminution de la matière non-cellulosique ce qui conduit à une amélioration de la stabilité thermique des fibres rouies et des propriétés mécaniques.

Dans la **seconde partie** de ce chapitre, une étude comparative de l'impact du rouissage au champ sur les propriétés des fibres de chanvre récoltées à différents stades de croissance de la plante (début de floraison, fin de la floraison, période de semence) a été réalisée. Les résultats révèlent que, quelle que soit la période de récolte, une évolution identique des propriétés des fibres est observée lors du rouissage. La différence réside dans la cinétique de cette évolution, qui dépend des conditions météorologiques et de l'état initial des fibres au moment de la récolte.

En, effet, les fibres récoltées à la période de début de floraison et à la fin de la floraison présentent une évolution similaire du changement de couleur pendant une durée de 9 semaines: vert clair pour les fibres non-rouies, jaune pour les fibres peu rouies, jaune avec la présence de fibres grises pour les fibres moyennement rouies et gris foncé pour les fibres fortement rouies. Cependant, pour la période de semence, la transition de couleur du jaune au gris foncé a été plus rapide (3 semaines). Ce changement de couleur est lié aux différences de conditions météorologiques et au développement de microorganismes à la surface de la tige (images MEB).

Les analyses thermogravimétriques (ATG), biochimiques et microstructurale (XRD) ont mis en évidence une augmentation de la fraction de cellulose et du degré de cristallinité de la cellulose pendant le rouissage quelle que soit la période de récolte examinée. Néanmoins, les résultats obtenus montrent que la cinétique de ce phénomène dépend des conditions climatiques dont les écarts de température d'une part, la fréquence et la quantité de précipitations d'autre part. En outre, il a été observé que, la fraction de cellulose augmente avec l'élimination des matières non-cellulosiques au cours de la croissance de la plante.

L'augmentation du taux de cellulose lors du rouissage entraîne une amélioration progressive de la stabilité thermique. De plus, il a été observé que les fibres récoltées à la période de semence présentent une meilleure stabilité thermique que celle des fibres récoltées en début et fin de floraison, en raison de la proportion de cellulose plus élevée au sein des fibres de la période de semence.

Les propriétés mécaniques de fibres récoltées en début et fin de floraison augmentent lors du rouissage jusqu'à atteindre une valeur maximum (après 5 semaines) et ensuite diminuent avec un rouissage prolongé. En ce qui concerne les fibres récoltées à la période de semence, les propriétés de traction diminuent progressivement et légèrement avec le temps de rouissage. L'augmentation de la fraction de cellulose et du degré de cristallinité de la cellulose contribue fortement à améliorer les performances de traction des fibres avant d'atteindre un sur-rouissage. Lorsque les composés non-cellulosiques sont fortement dégradés, la cohérence entre les microfibrilles de cellulose et la matrice non-cellulosique devient plus faible et conduit à une diminution des propriétés de traction des propriétés.

Pour conclure, l'état initial des fibres au moment de la récolte et l'évolution des caractéristiques intrinsèques des fibres pendant le processus de rouissage apparaissent donc comme deux critères déterminants qui doivent être contrôlés afin d'éviter un traitement de sous- ou de sur-rouissage. Il est donc nécessaire de contrôler les deux critères

sachant car la cinétique de ce procédé est également étroitement liée aux conditions climatiques.

Ce chapitre fait l'objet de deux publications, la première a été publiée dans le journal *Industrial Crops and Products* (DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.062), la deuxième a été soumise dans le journal *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* .

P-1/ Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering

Brahim Mazian^{1,2}, Anne Bergeret^{1*}, Jean-Charles Benezet¹, Luc Malhautier²

¹Centre des Matériaux des Mines d'Alès, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

²Laboratoire du Génie de l'Environnement Industriel, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

Abstract

The use of hemp fibres as reinforcements in polymer composites requires a thorough understanding of the hemp fibres transformation processes to obtain a constant quality. In this context, the upstream processing termed field retting is considered. Retting allows a subsequent fibre separation from the plant stems by degradation of cementing compounds by microorganisms. This operation depends on weather conditions and is currently empirically carried out in fields, so that a large variability in the hemp fibres quality (color, morphology, biochemical composition, thermal properties and mechanical properties) is resulting. Therefore, the present study aims to investigate the influence of different retting durations (up to 9 weeks) on hemp fibres properties when harvested at the beginning of flowering growth stage to survey their temporal dynamic. Various assessments were applied on fibres: color observations, morphological (optical microscope), surface (ESEM) and biochemical (gravimetry) analyses, spectrophotometric measurements (pectins content), thermogravimetric (TGA) analysis, and mechanical in tensile mode testings. The results reveal that increasing the field retting duration leads to a change of color characteristics from light green to grey due to the development of microbial communities (most probably fungal and bacteria) at the stem surface. A separation of the fibres bundle to elementary fibres occurs with the degradation of pectins during retting. An increase of thermal stability of the fibres is also observed. Both increase of cellulose fraction and crystallinity induce an enhancement in tensile properties.

1. Introduction

Hemp (*Cannabis sativa L.*) is an annual bast fibre plant from Asia and widely cultivated in many countries in Asia and Europe. Hemp bast fibres have traditionally been used for such purpose as the fabrication of textiles, and in recent years, are increasingly used as reinforcements in polymer composites due to their challenging performances including low-density [1], low cost [2], good specific mechanical properties [3][4] and biodegradability [5][6] compared to conventional fibres such as glass fibres [7]. However, the huge variation of their biochemical, physical and mechanical properties [4][8] makes this natural fibre limited to use in structural application when high consistency and homogeneity are required [5].

The hemp fibres used for composites are primary and secondary fibres which are located between the epidermis and the xylem core and parallel to the longitudinal axis of the stem [9]. The hemp fibres are associated through their pectic middle lamella to form bundles of several dozens of fibres [10]. For high performance composites, pectic middle lamella and other cementing compounds (e.g. wax) that bind the bast fibres and fibre bundles to other tissues must be removed in order to separate the fibres and to obtain individual fibres or smaller fibres bundles. This separation of the fibres bundles leads to improve interfacial bonding between fibres and matrix which enhances the mechanical performance of final composite [11]. In the hemp industry, traditional extraction and separation processes are commonly used to facilitate the separation of the fibres from stem and reduce fibre defects during decortication. These processes play a key role on the quality heterogeneity of hemp fibres, especially field retting treatment which consists to spread out hemp stems on the ground for a duration ranging from a few days to several weeks. When the plant stems are laid in the field, the microorganisms (fungi and bacteria) attack the stems producing a range of polysaccharide-degrading enzymes, especially pectinolytic which remove the components in the middle lamella region surrounding the fibres [12][13].

Field retting is empirically carried out because of its very environmental-dependent conditions (temperature, humidity and duration) which results many problems of the inconsistency of the hemp fibres quality. For this reason, many efforts are nowadays directed for offering alternative methods of extraction of the fibres such as thermal and enzymatic treatment [14], steam explosion [15] and chemical treatment [16]. These methods are well-controlled, but economic viability for industrial upscaling still remains difficult because they are expensive and need more energy or specific enzymes, contrary to

the field retting that is cheaper and easier to be applied. Therefore, field retting remains the most widely used in Europe for industrial production of bast fibres and thus must be understood in order to avoid the insufficient advancement of field retting which makes separation of the fibres difficult, or over retting that leads to a partial degradation of fibres by cellulose destructuring [17].

Field retting is usually carried out at the maturity growth stage since the farmers could be retrieved the seed. However, this growth stage occurs in autumn when climatic conditions are not favorable for a better master of field retting progress. A recent study of Liu et al. [18] highlights that the field retting of the hemp fibres harvested at seed maturity during a colder and rainy season lead to a rapid change of the properties of the fibres. Indeed, the hemp fibres quality increases at the early stage (1 week) of the field retting and then rapidly decreases by extending the retting process, due to the accelerated degradation of cellulose by microorganisms. Placet et al. [19] compared unretted and 5 weeks-retted fibres during a very rainy retting period, and found that the prolongation of retting under these climatic conditions has caused over-retted fibres. Therefore, full understanding of the evolution of the quality of hemp fibre during field retting process requires a study for a long period with a gradual development and activity of microorganisms. For this reason, the field retting of hemp fibres harvested at the beginning of flowering growth stage which coincides with summer conditions is investigated in this study.

The purpose of the present work was then to evaluate the effect of different field retting durations on the properties of the hemp fibres when harvested at the beginning of flowering growth stage i.e. to survey the temporal dynamic of hemp fibres composition, microstructure, thermal and mechanical properties during retting. The color change was analyzed by visual observations. The changing biochemical composition, pectin variation, crystalline structure was determined using successive solvent extractions, spectrophotometric and X-ray diffraction measurements, respectively. Thermal stability was studied by thermogravimetry analyses (TGA). Scanning electron and optical microscopy observations were carried out to examine the stem surface change and morphology of fibres. Finally, tensile tests were performed on manually extracted fibre bundles. In addition, this work will also contribute to the missing data on fibre harvested at beginning of flowering and retted for a long period under dry weather conditions.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

2.1.1. Cultivation

The hemp (*Cannabis sativa L.*, Cultivars Santhica 27) was grown at a rate of 30kg/ha on May 6th, 2016 in the south of France around the Mas La Valus (GPS: N 44.130673°, E 4.315895°) by CIVAM Chanvre Gardois association (Bouquet, France). The hemp plants were manually pulled using a shear at the beginning of flowering (July 25th, 2016) and dew-retted in the field. Following the definition of the different hemp growth stages described by Mediavilla et al. [20], the beginning of flowering period selected is corresponding to code 2101 (first opened staminate flowers). Plants harvested were turned regularly (once a week) on the ground to homogenize the retting of the stems.

2.1.2. Sampling and weather conditions

After harvesting period, a weekly manual collection of the samples during retting was carried out. Table II.1 gives the retting times and corresponding collected samples, from unretted fibres (R0) to 9 weeks-retted fibres (R9). Stems collected were dried and stored in a cold (4 °C) room before being further processed.

Table II.1. Name of samples collected during different retting times

Retting time (day)	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Samples name	R0	R1	R2	R3	R4	R5	-	-	-	R9

Temperature and relative humidity have been constantly recorded in the field using three hygro-bouton sensors (Progesplus, Carquefou, France) that were put in contact with the soil. Daily average rainfall was obtained from Meteo France (weather station located at Méjannes-le-Clap (GPS: N 44.221944°, E 4.344722°) in the vicinity of the Mas de la Valus). Daily weather conditions are exposed on figure II.1. The weather was warm during retting period, except the last three weeks in September 2016. The maximum and minimum temperatures between the 1st week and the 6th week of retting period ranged from 38-55°C and 15-20°C, respectively, whereas during the last two weeks of the retting period, it decreased to 27-34°C and 10°C-20°C, respectively. The average of rainfall and relative humidity of total retting period are 1.8 mm and 61.5%, respectively. Rainfall and humidity

were not homogeneously distributed during the retting period. There was little rainfall (11 mm) during the 1st and 4th weeks of retting period, while between the 7th week and the last sample collection, it was higher (50 mm). Rainfall generally increases the relative humidity from 55% to 90%.

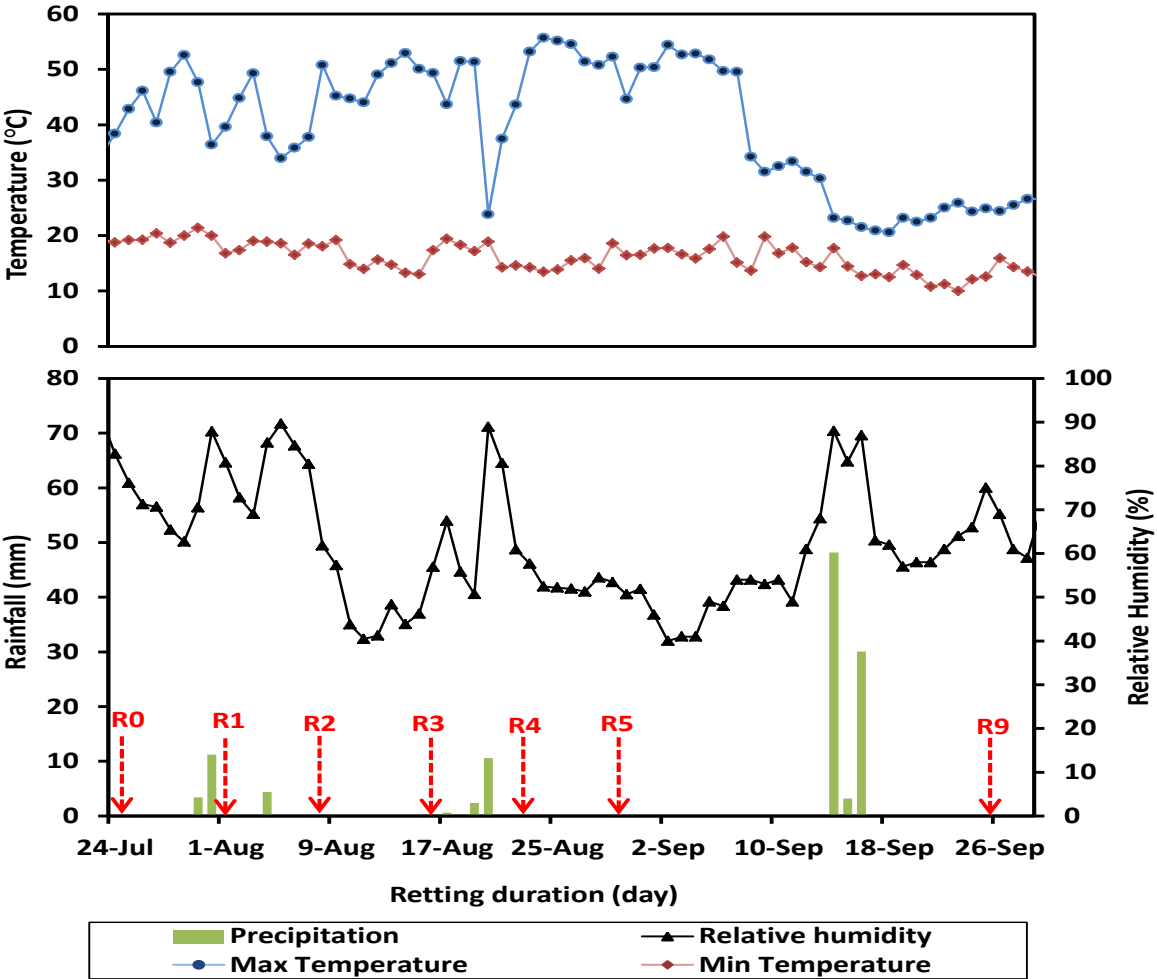


Figure II.1. Daily weather conditions (Minimum and maximum temperature, relative humidity and precipitation) during different retting durations in July to September 2016

The average length of the stems harvested at the beginning of flowering is 1.7 ± 0.1 m. In this present study, only the middle part of the stems with a length of 1 m was considered (figure II.2) in order to limit the scatter of the results. Indeed other authors Liu et al. [21] and Duval et al. [4] revealed that the location of the fibres on the stems (bottom, middle and top) influences the quality of fibres and the fibres issued from the middle part of the stems provide higher mechanical properties.

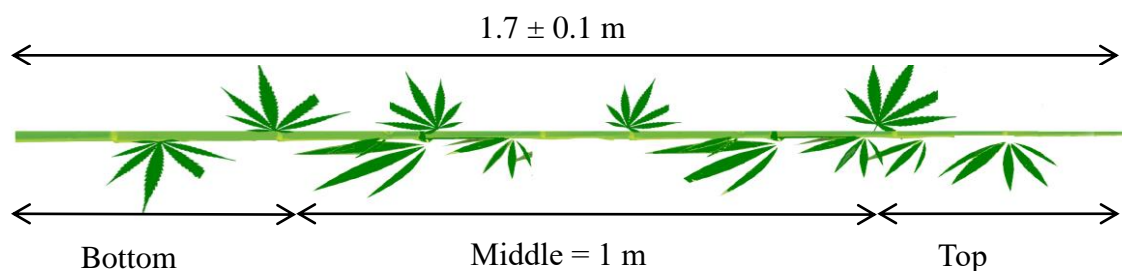


Figure II.2. Locations of the fibres on the stem (bottom, middle and top)

2.2. Experimental methods

2.2.1. Visual aspect

The color evaluation of the middle-stems and fibres along retting process was visually observed. The fibres were extracted using a razor blade and flat files.

2.2.2. Microscopy observations

The middle part of unretted (R0) and retted stems (R3, R5 and R9) was observed through scanning electron microscopy (ESEM) using an environmental scanning electron microscope Quanta FEG 200 (FEI, Merignac, France) with a magnification of x500 and x1000.

The influence of field retting durations on the morphology of fibres was also investigated using optical microscopy (Leica Laborlux 11 POL S). Prior to optical microscopy observation, the cross sections of the unretted (R0) and retted stems (R3, R5 and R9) were cut manually, commonly coated in an epoxy resin, and then subsequently polished to obtain smooth samples. Images were recorded using Archimed® software in order to analyze qualitatively the evolution of bast fibres during field retting.

2.2.3. Biochemical analysis

Two methods were used, one based on solvent extractions to quantify cellulose, lignin and lipophilic extractives contents, the other based on spectrophotometry to evaluate the pectin content.

2.2.3.1. Solvent extractions method

The biochemical composition of the fibres from unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9) was determined using successive solvent extractions based on different ASTM test methods as described on the Figure II.3.

Prior to analyzing the chemical composition, fibres on stems were peeled and cut manually to obtain 10 g (weight of moisture free). Lipophilic extractives (waxes, fats, resins and some gums) were extracted with a solution of toluene/ethanol (2:1 w/w) for 8h, the residue was filtered and dried in a desiccator at 105°C before being weighted using an infrared balance (Precisa XM66, Precisa, Dietikon, Switzerland) at 105°C according to ASTM D1107-56 method. A fraction of the fibres retrieved after this first extraction was treated with sulfuric acid in order to hydrolyze carbohydrates by leaving an insoluble residue which is determined as lignin according to ASTM D 1106-56 method. For this purpose, 1 g of fibres was mixed with 72% of sulfuric acid (H₂SO₄) by shaking constantly for 2 h at room temperature. The mixture was then diluted by adding distilled water to obtain a H₂SO₄ solution with a 3% concentration and boil for 4 h. The insoluble materials were filtered and dried at 105°C. Another fraction of fibres retrieved after the first extraction was used for the determination of holocellulose and α-cellulose contents according to ASTM D 1104-56 and ASTM D 1103-60 methods respectively. For this purpose, fibres were introduced in a solution made of 150 ml of distilled water, 0.2 ml of acetic acid and 1 g of sodium chlorite (NaClO₂). The mixture was heated at 75°C and stirred constantly for 5 h, during which 0.2 ml of acetic acid and 1 g of sodium chlorite were added each hour. After 5 h, the mixture was placed in an ice-water bath until the temperature of the solution reached 10°C. Distilled water was used to wash the residue until the color changed into yellow. The residue is the holocellulose fraction and was dried in an oven at 105°C, then weighted using an infrared balance at 105°C. Holocellulose was finally solubilized in sodium hydroxide solution (NaOH) and acetic acid to obtain α-cellulose. Ash content was determined after a dry oxidation of the fibres at 600°C for 8 h according to ASTM D 1102-84 method.

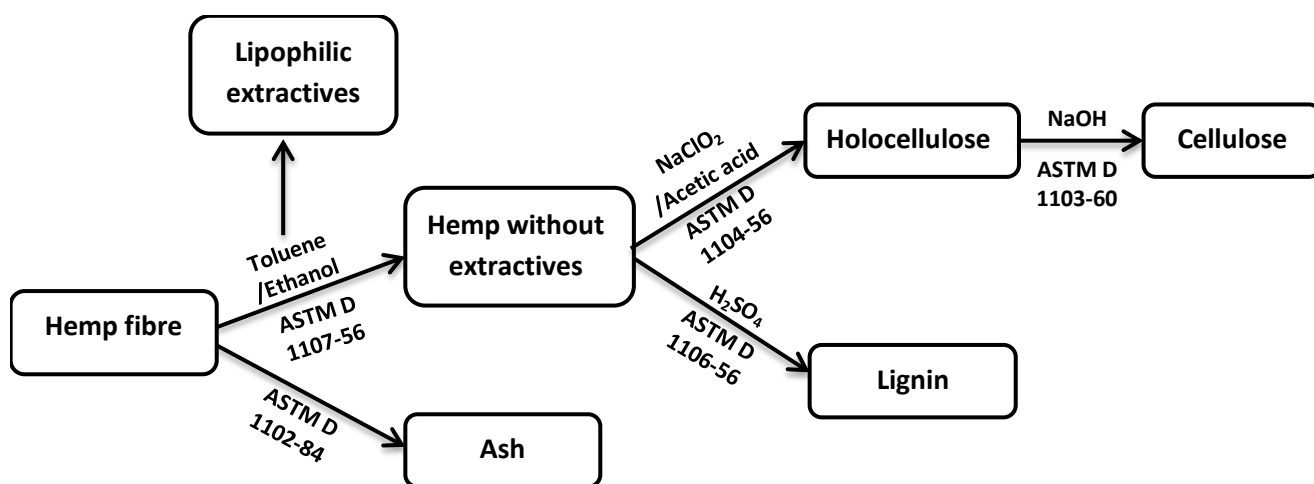


Figure II.3. Schema of successive solvent extractions used to analyze the biochemical composition of unretted and retted hemp fibres

2.2.3.2. Pectins analysis by spectrophotometer

Pectin content was determined using a colorimetric method developed by Blumenkrantz and Asboe-Hansen. [22] and adapted to a 96 wells microtiter plates by [23]. This method consists of hydrolyzing pectics substances to galacturonic acid which is the main compound within pectins followed by a coloring step with a m-hydroxydiphenyl reagent at room temperature (figure II.4).

Firstly, a standard assay was carried out using different quantities of commercial pectin (Coprane, Ales, France) between 0 and 8 μg (volume of 40 μl). 200 μl of concentrated sulfuric acid H_2SO_4 (96%) were added to each well of microtiter containing 40 μl of pectin, and then the plate was incubated at 80 ° C for 1 h. After cooling at room temperature, the absorbance of the background samples was measured with a spectrophotometer (Thermo scientific Multiskan® spectrum, Waltham, MA USA) at 540 nm. Then, 40 μl of m-hydroxydiphenyl reagent (100 μl of 100 mg of m-hydroxydiphenyl in 1 ml of dimethylsulfoxide mixed with 4.9 ml of 80% sulfuric acid) was added to each sample. A pink color appears and the highest absorbance of the samples is then measured at 540 nm. The content of galacturonic acid is obtained after subtraction of the background absorbance. A calibration curve is obtained between 0 to 8 μg of galacturonic acid.

Subsequently, to determine the galacturonic acid amount of samples, an extraction of the pectins from fibres was performed as described by Fila et al. [24]. Fibres were peeled and cut manually on stems to obtain 200 mg (weight of moisture free). Then lipid components were removed using a chloroform/methanol (1:1) solution by stirring constantly for 24 h at

room temperature. After drying at 105°C, pectins were then extracted with 200 ml of 5 gl⁻¹ Na₂EDTA for 2 h at 100°C. The extraction product was then analyzed using the spectrophotometer calibration described above. The absorbance for unknown sample content is measured at 540 nm, and the calibration curve is used to find the concentration of the galacturonic acid.

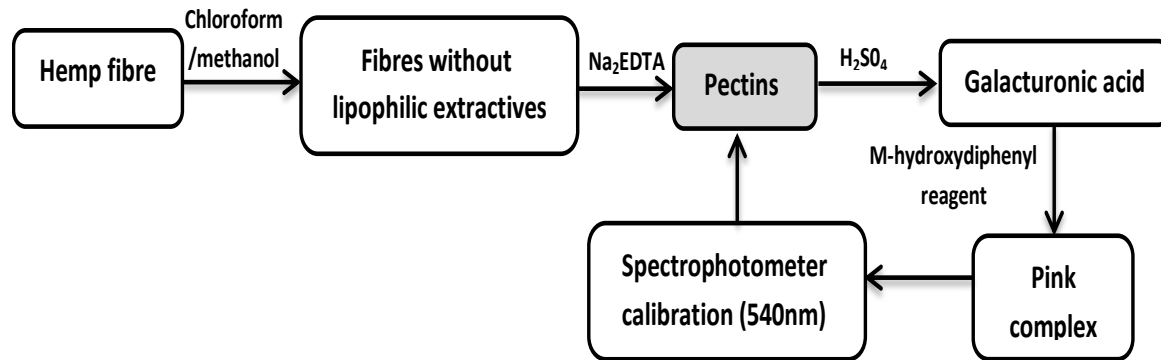


Figure II.4. Method used to analyze pectins content of unretted and retted fibres

2.2.4. X-Ray diffraction

Microstructure of unretted (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9) was analyzed using X-ray (XRD, AXS D8 Advance Bruker) diffractometer equipped with Cu-K α radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Measurements were performed on cut and compressed fibres (disks of 25 mm in diameter and 2 mm in thickness). X-ray diffractograms were recorded from 5 to 70° (2 θ , degrees) with a scanning speed of 0.01°/s.

The crystalline order index (CI) was determined from X-ray diffractograms using a deconvolution method. Individual crystalline peaks were fitted using Origin® software assuming Gaussian functions. Iterations were repeated until the maximum R2 value is superior than 0.98. (101), (10 $\bar{1}$) and (002) crystalline peak areas (I_c) and amorphous broad peak area (I_{am}) were used to calculate the crystallinity order index according to equation 1.

$$CI = \frac{I_c}{I_c + I_{am}} \times 100 \quad Eq.(1)$$

2.2.5. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analyses of the unretted (R0) and retted hemp fibre (R3, R5 and R9) were carried out using a Perkin-Elmer Pyris-1 thermal analysis system. Samples of about 8 mg manually extracted fibres (§2.2.3.) were heated in nitrogen from 30°C to 700°C at the

rate of 10°C/min. At least two samples from each retting time were performed. The mass change was recorded as a function of temperature. A differential thermogravimetric analysis (DTGA) curve was collected from the TGA analysis.

2.2.6. Tensile test of fibre bundle

Prior to tensile testing, the fibre bundles of the different retting durations (R0, R3, R5 and R9) were manually extracted from the stems after removing the epidermis using a razor blade. Fibre bundles were first positioned in one-part plastic tab with an UV-curing glue (DYMAX ultra-light weld, DYMAX Europe GmbH, Wiesbaden, Germany). Then fibre bundles diameters are determined using an automated laser scanning device FDAS 765 (Diastron Ltd., Hampshire, UK). Fibres horizontally rotated within the laser beam at 21 slices along the fibre axis. The mean, the minimum and the maximum diameters for each slice are recorded in a dimensional report exported by UvWin® 3.60 software. Thus, the mean diameters of 21 slices are averaged for each fibre bundle. The effective cross sectional area was calculated using the mean diameter of the fibre bundle assuming that the fibre had a circular shape. Fibre bundles were then mechanically tested under tensile mode at controlled temperature (23°C) and relative humidity (48%) using Diastron LEX810 system (Diastron Ltd., Hampshire, UK). The samples are loaded at a constant crosshead displacement speed of 1.2 mm/min-1 and with 12 mm gauge length. A curve of force (Gram-Force) as function of displacement is obtained, and then the tensile strength, the Young's modulus and the failure strain were determined. Approximately 30 fibres were tested for each retting time (R0, R3, R5 and R9). The results were analyzed statistically using Analysis of variance ANOVA and Tukey multiple comparison test at significant level of 5%.

3. Results and discussion

3.1. Influence of field retting duration on the color of the hemp fibres

A visual assessment of the samples collected after harvesting growth stage and during different retting times was carried out. Figure II.5 shows the photographs of the stems and of the processed fibres issued from different retting durations. A significant change of the color was observed. The color varies between light green for unretted samples (R0), yellow for low retted samples (R1 to R3), yellow with the presence of grey fibres for medium retted samples (R4 and R5) and grey for highly retted samples (R9). As it can be seen on the stems surface, grey spots start to appear after 3 weeks and then invade the surface stems at 9th

week of the field retting period. The fibres have the same color than the stems from which they have been extracted. A similar color change was previously reported by Martin et al. [25] and Pallesen. [26] after the field retting of flax fibres. ESEM images (figure II. 6) reveal that these grey spots are attributed to the development of microbial communities (fungal and bacteria [27]) at the stem surface during field retting. The link between the increase of the grey and black color of the fibres during field retting and the activity of microorganisms especially fungi activity was also previously reported [28]. The microbial communities would start to colonize the stems surface after 3 weeks of retting (R3) and gradually cover the entire stems at the end of retting (R9). The large stem covering by microorganisms after 9 weeks of retting is probably due to more favorable conditions (higher rainfall (50 mm) after 7th of field retting period) which enhanced the development of the microbial biofilm.

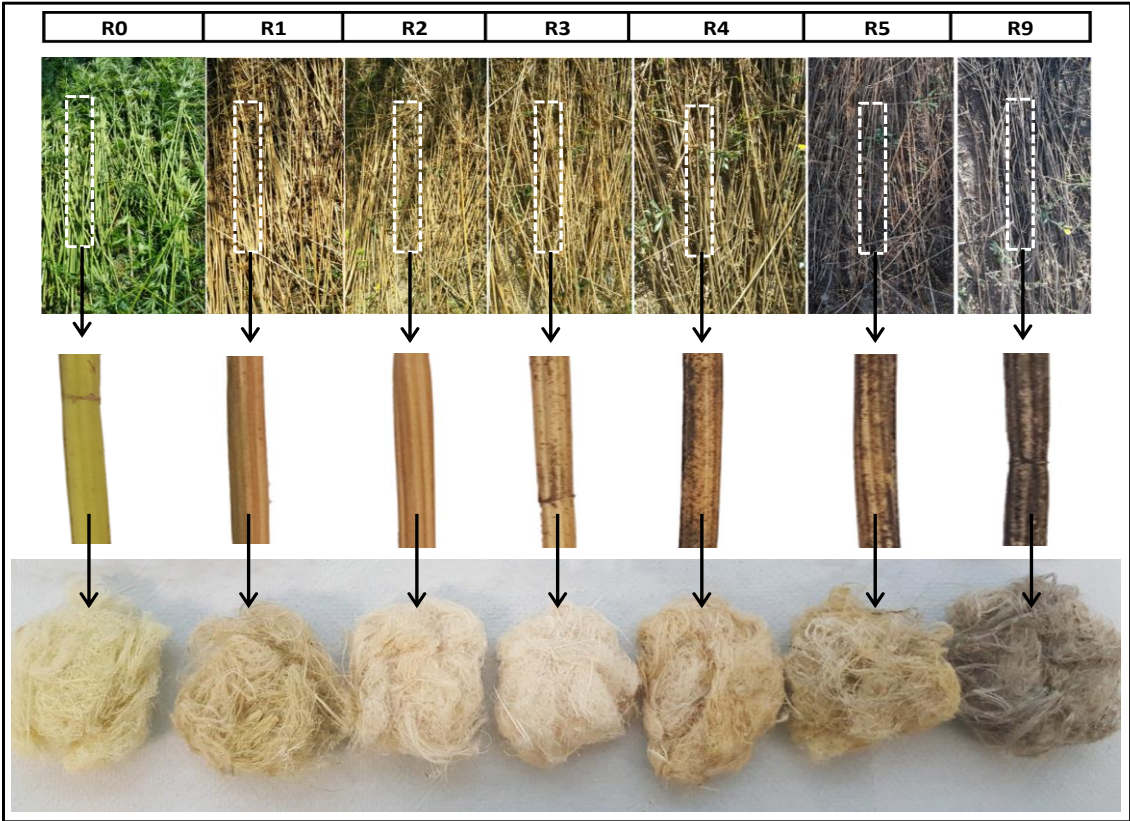


Figure II.5. Photographs of color change of the stems and fibre bundles after different retting durations

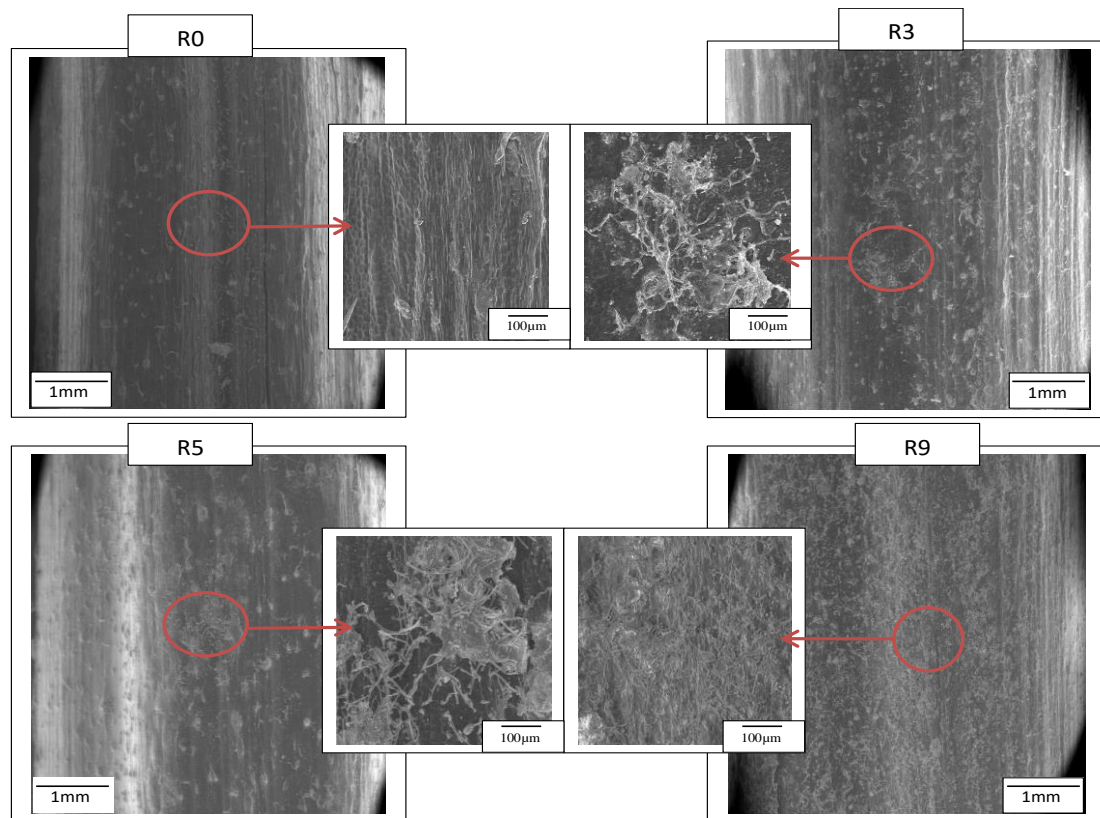


Figure II.6. ESEM images of unretted stem surface (R0), 3 weeks-retted stem surface (R3), 5 weeks retted stem surface (R5) and 9 weeks retted surface (R9)

3.2. Influence of field retting duration on the biochemical composition of hemp fibres

The biochemical composition of the hemp fibres was determined for unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9). The main components of the hemp fibres are cellulose, hemicelluloses, lignin and pectins. As it can be seen in figure II.7 the field retting treatment affects biochemical composition of the hemp fibres. A gradual and significant increase of the cellulose fraction from 63% to 77% after 9 weeks of the field retting was observed. Pectins are degraded at the early stage (7.8% to 4.9%) and thereafter remained stable. Hemicelluloses are slightly degraded from 14.1% to 11.6% after nine week of retting. These variations during retting were found by different authors. Indeed, Thygesen et al. [29] and Nykter et al. [14] used the same extraction method as those of this study and found similar relative abundances for cellulose, and hemicelluloses for unretted hemp fibres. As concerns Liu et al. [18], these authors highlight an increase of cellulose content at early stage of field retting of hemp fibres with a decrease of the pectins and hemicelluloses. Figure II.7 shows also that minerals (ash) and lipophilic extractives were removed during retting. In contrast,

the lignin content increases surprisingly during retting. Some authors [18][19] assumed that this apparent increase in lignin content is due to a lower degradation of lignin, which becomes concentrated when the other components (lipophilic extract, ash and carbohydrates) are removed at the same time. We have to be aware that the quantification of the mean components is relative and then could explain the increase of lignin quantity with retting. Placet et al. [19] suggested another assumption in relation with the Klason method used for lignin content determination. Indeed through this method, other phenolic or protein components that evolve during retting are probably also determined. The fibres extraction from the stems may also contribute in increasing of the lignin. The different structures of the stems (e.g. epidermis, xylem) become weaker with retting. Therefore, when bast fibres extracted from the retted stems, micro-residuals xylem (shives) bound to the fibres and could bias the real evolution of lignin during retting.

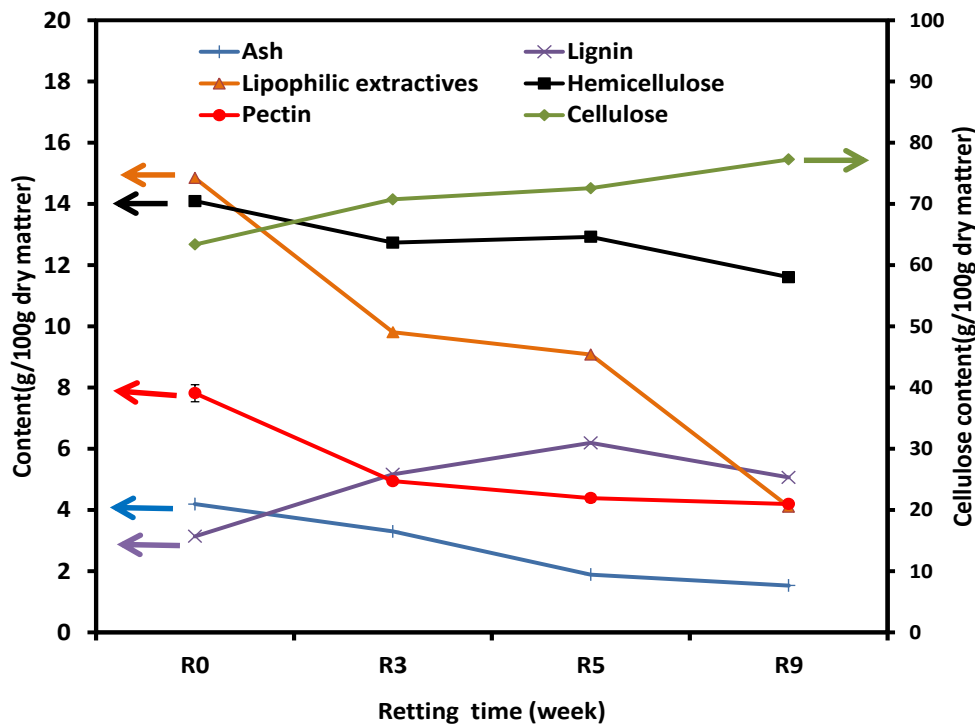


Figure II.7. Ash, lignin, hemicellulose, lipophilic extractives, hemicelluloses, cellulose (solvent extractions) and lignin (spectrophotometer) contents as a function of field retting times

In addition to biochemical analyses, the cellulose organization of unretted and retted hemp fibres was characterized using X-ray diffraction. Figure II.8A shows X-ray diffractograms of hemp fibres collected at different retting times. The observed major crystalline peaks are located at 2θ diffraction angles of 14.8° , 16.2° and 22.6° , which correspond to diffraction

planes of cellulose type I: (101), (10 $\bar{1}$) and (002) respectively. It can be observed that the intensity of crystalline peaks is significantly increased with increasing of retting duration. In order to quantify these differences, the crystalline order index (CI) was determined as described in §II.2.2.3 (figure II. 8A).

The X-ray crystalline order index (CI) results are present in Table II.2. CI increased with the field retting duration from 53% for unretted fibres (R0) to 58%, 68% and 73% for R3, R5 and R9 retted fibres respectively. This result could be related to the degradation of non-cellulosic compounds during retting as shown previously in biochemical analysis. For unretted hemp fibre, the presence of a great amount of amorphous components such as hemicelluloses, lignin, and pectins between the cellulose micro-fibrils cause disoriented areas, which could undesirably influence the crystallinity of the cellulose micro-fibrils. On the other hand, the removal of amorphous materials during retting treatment leads to a better packing of the cellulose chains. An increase of cellulose fraction and cellulose crystallinity during field retting could impact positively the fibre mechanical properties [30][8][31].

The change in biochemical composition and crystallinity of cellulose of the fibres during field retting is most probably related to the microorganisms activities [27]. Both biofilm growth (ESEM investigations) and metabolic activity of microorganisms would lead to the removal of non-cellulosic materials which indirectly increase the percentage of cellulose in fibres (relative abundances).

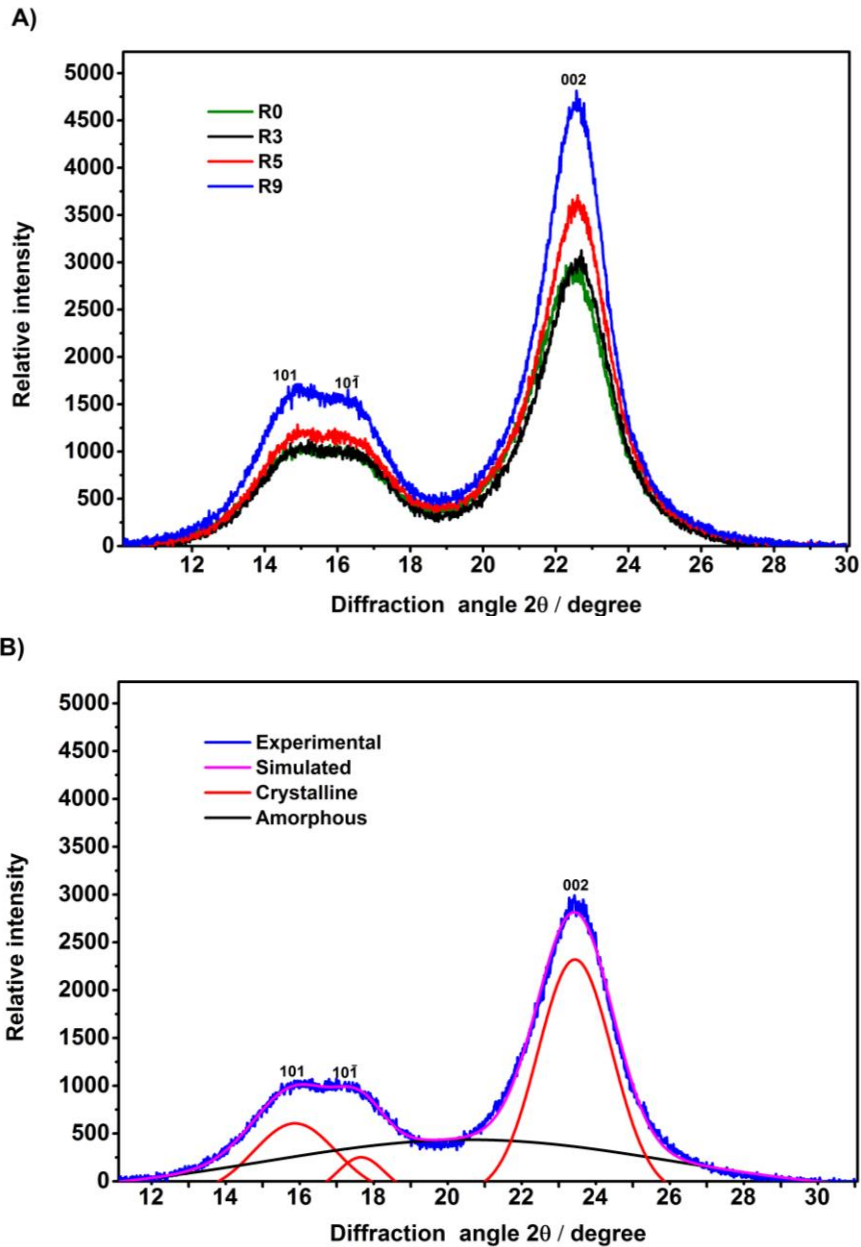


Figure II.8. A) Diffractograms for unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9) B) Example of curves of deconvolution method used for determining the crystalline order index (CI)

Table II. 2. Crystallinity order index of unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9)

Retting time	Crystallinity order index (%)
R0	53
R3	58
R5	68
R9	73

3.3. Influence of field retting duration on the morphology of the hemp fibres

The optical microscope micrographs of cross-sections of unretted (R0) and retted hemp stem (R3, R5 and R9) is shown in figure II.9 Images reveal the impact of the field retting duration on the morphology of the hemp fibres. The main parts of the hemp stem are central woody core and surrounding cortex which contains fibres bundle, epidermis, and cortical parenchyma. These two parts are linked by the cambium. Figure II.9A presents a cross section of the unretted hemp stem (R0) where the different parts of the stem are intact and well organized. The hemp fibres are combined in form of bundles as in living plants. In contrast, when the stems are field retted, their structure changed as can be seen in figure II.9B, C and D. After 3 weeks of retting (figure II.9B), the parenchyma cells interspersed among bast fibres and fibre bundles started to be removed resulting in a few open spaces between fibre bundles. Consequently, the fibre bundles began to be separated as well into smaller fibres bundles. As the field retting progressed, more separation of the fibre bundles into smaller fibre bundles and elementary fibres can be seen for 5 weeks retted hemp stems (R5) (figure II.9C). In addition, void spaces are evident around the elementary fibres and the lumen of the elementary fibres can be also distinctly observed. For 9 weeks retted stem (R9) (figure II.9D), the different parts of the stem were affected by the field retting. The epidermis layer and cambium are completely removed, the structure of central woody core is weaker and the bundles of fibres were considerably separated.

These significant changes on the morphology of the hemp fibres during field retting process are due to the action of microorganisms that gradually cover entire of the stems surface (ESEM observations). The microbial activity during field retting would permit the removal of intercellular substance and of material which is in agreement with the biochemical analyses and mainly with pectins and waxes degradation that leads to a separation i) of the bast fibre bundles from the central woody core and epidermis and ii) into smaller bundles and individual fibres. Further investigation into the temporal dynamics of the structure of microbial communities is then required to better understand biological mechanisms occurring during field retting. As expected, this result confirms the positive impact of field retting on the separation of the fibre bundles from the cortex tissues.

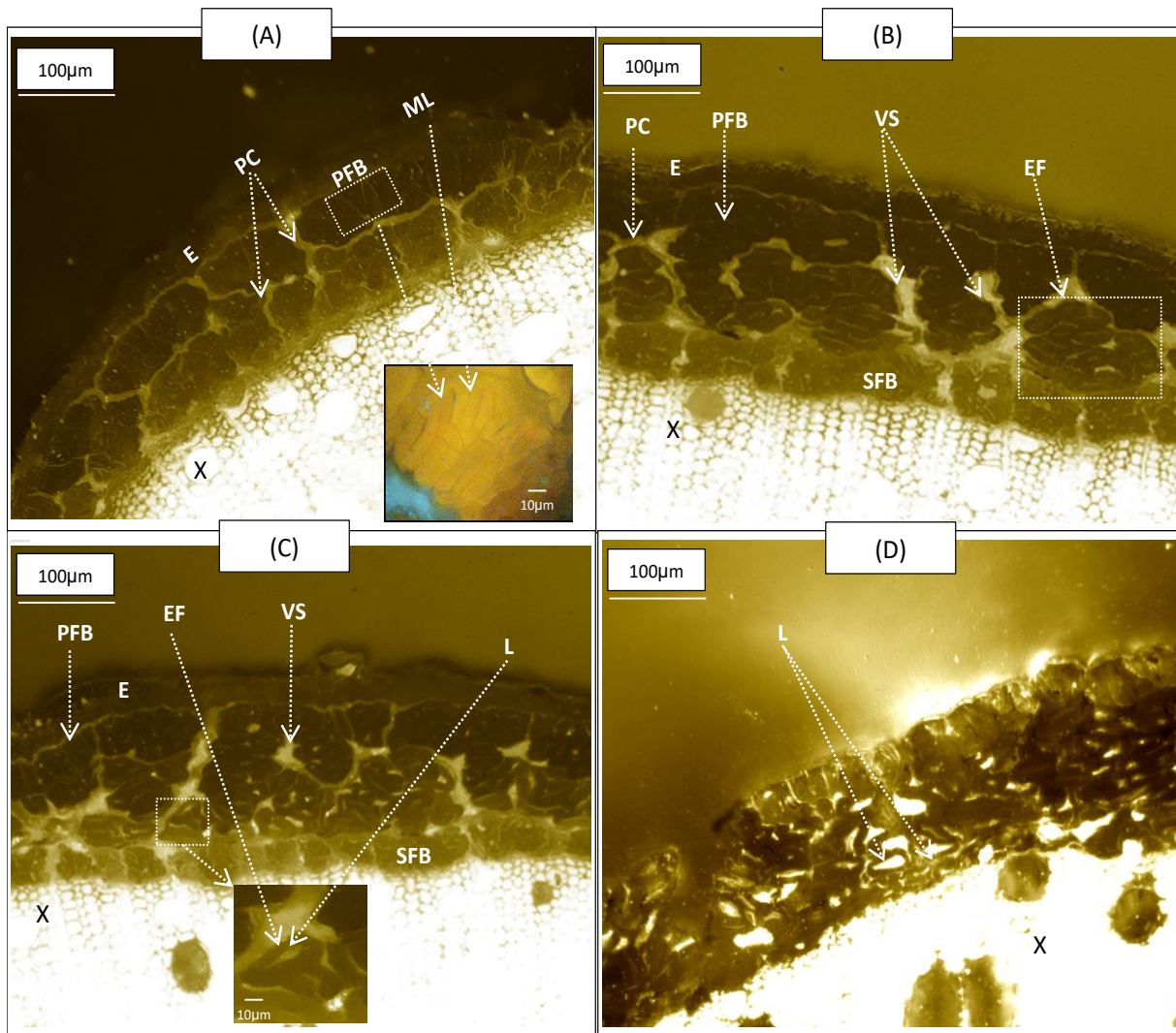


Figure II.9. Optical microscope micrographs showing cross sections of unretted hemp stem R0 (A), 3 weeks retted hemp stem R3 (B); 5 weeks retted hemp stems R5 (C) ; 9 weeks retted hemp stem R9 (D) E: epidermis; PC: parenchyma cell; PFB: primary fibre bundles; SFB: secondary fibre bundles; ML: middle lamella; L: lumen; EF: elementary fibres; VS: void space ; X: xylem

3.4. Influence of field retting duration on thermal stability of the hemp fibres

The thermal stability of the hemp fibres as a function of retting times was assessed on through TGA experiments. Separate constituents of plant fibres (cellulose and pectins) were first analyzed and compared to unretted hemp fibres (figure II.10).

Thermographs of pectins and cellulose reveal a major peak at about 240°C and 395°C, respectively. The degradation temperature of cellulose is higher than the pectins due to the crystalline structure of cellulose. The cellulose structure contains strong intramolecular and intermolecular hydrogen bonding that requires high energies to be broken down [32]. The

unretted fibres mass loss curve highlights three mass losses, the first one at about 30-100°C related to moisture removal, the second at about 260°C attributed to decomposition of non-cellulosic components (pectins and hemicelluloses) and the third one at about 335°C due to cellulose degradation. The peaks are partly superimposed on temperature scale, but can be clearly observed on DTGA curve. Similar range of degradation temperature of hemp fibres constituents was found in several previous studies [19][32][33][34].

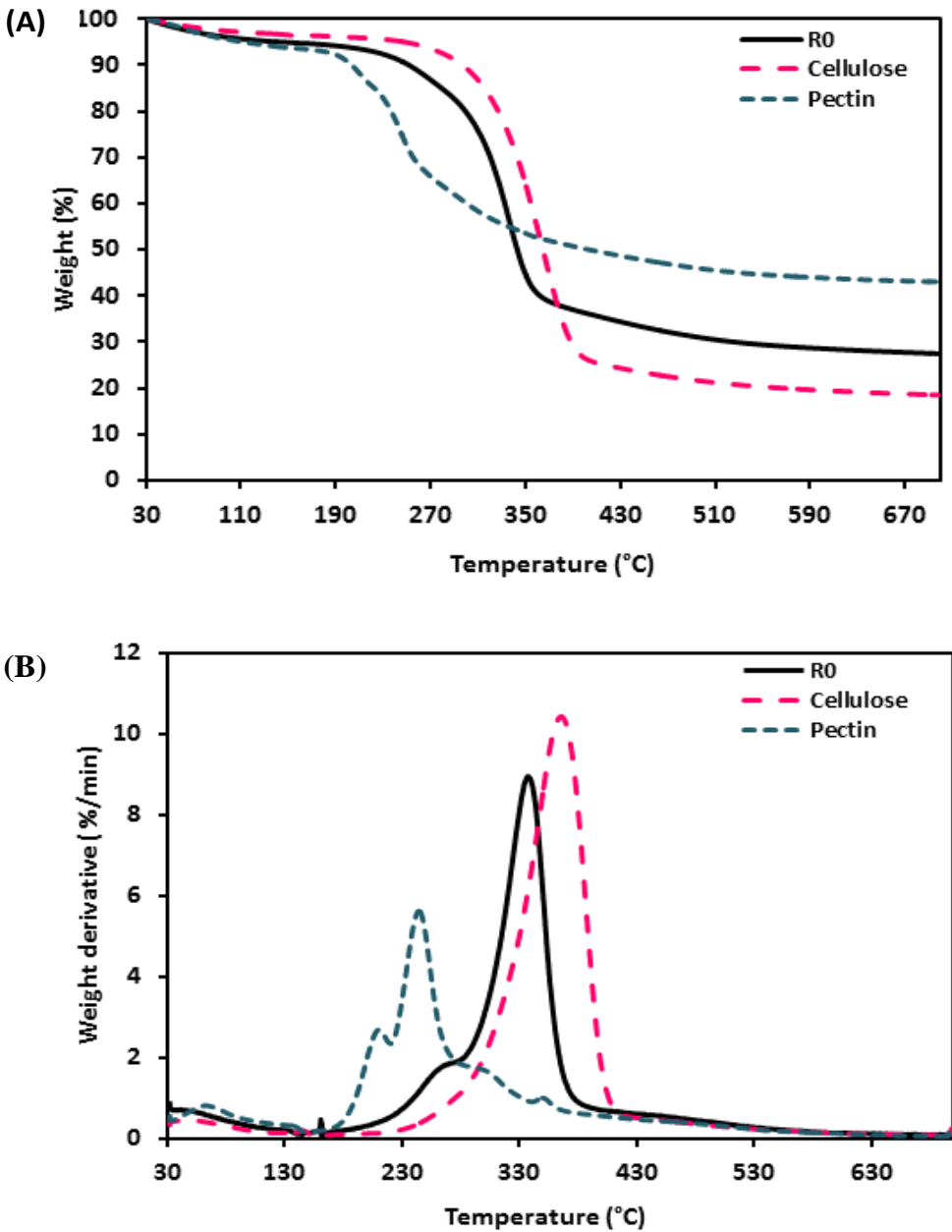
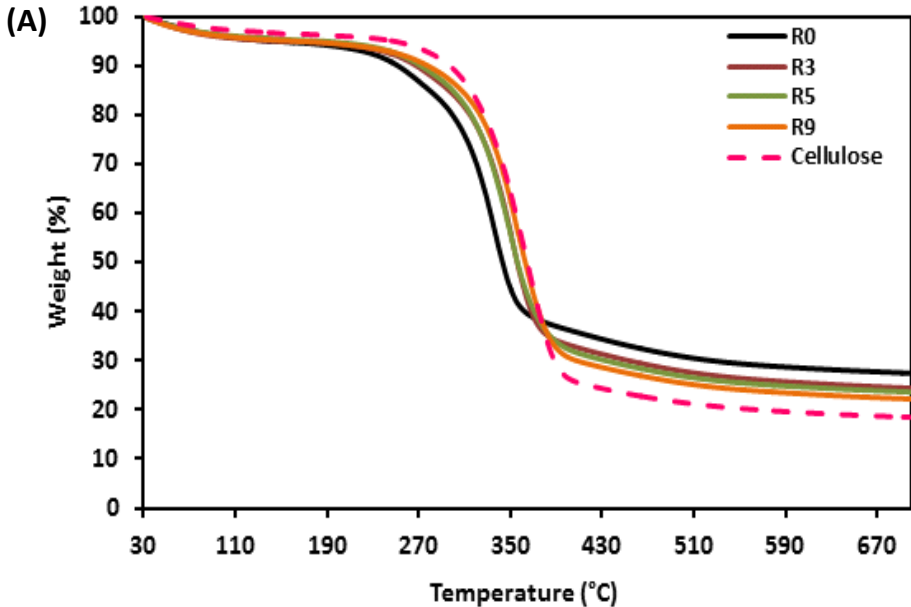


Figure II.10. TGA (A) and DTGA (B) curves of unretted fibres (R0) compared to element constituents (commercial pectin and cellulose)

The effect of field retting duration on the hemp fibre thermal stability is presented in figure II.11. It can be observed that the thermal stability changed during field retting treatment. The increase of retting duration led to a gradual increase of the fibres thermal stability in the 200-400°C temperature range corresponding to both pectins and hemicelluloses (shoulder peak) and to cellulose (main peak) decompositions. On one hand it can be observed that the intensity of the pectins and hemicelluloses peak decreases as a function of retting duration (figure II.11B). This could be explained by the removal of portion of these non-cellulosic components during retting. However, this peak is not clearly visible or disappeared for the high-retted hemp fibres, indicating that non-cellulosic components were quasi totally removed. On the other hand an increase of field retting duration leads to a gradual increase of decomposition temperature of cellulose. It is due to the removal of non-cellulosic components which induces a higher structural order of cellulose that requires a higher degradation temperature. This result is well correlated to biochemical and X-Ray diffraction analyses as shown in figure II.12. This figure reveals that the degradation temperature of cellulose increases proportionally with the increment of crystallinity and cellulose fraction during retting. This indicates that thermal stability of the fibres can be enhanced with a long field retting duration.



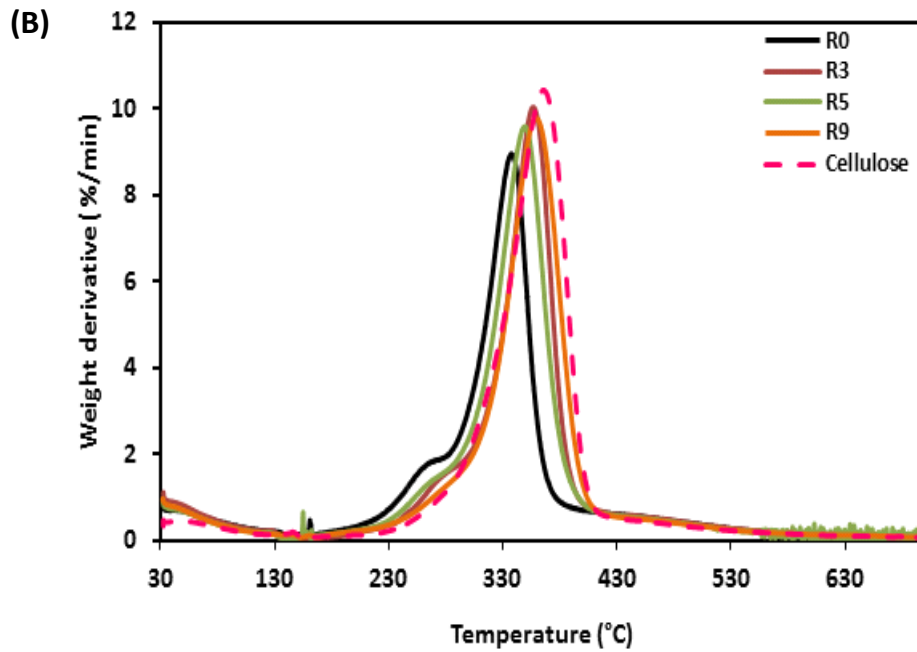


Figure II.11. TGA (A) and DTGA (B) curves of unretted fibres (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9)

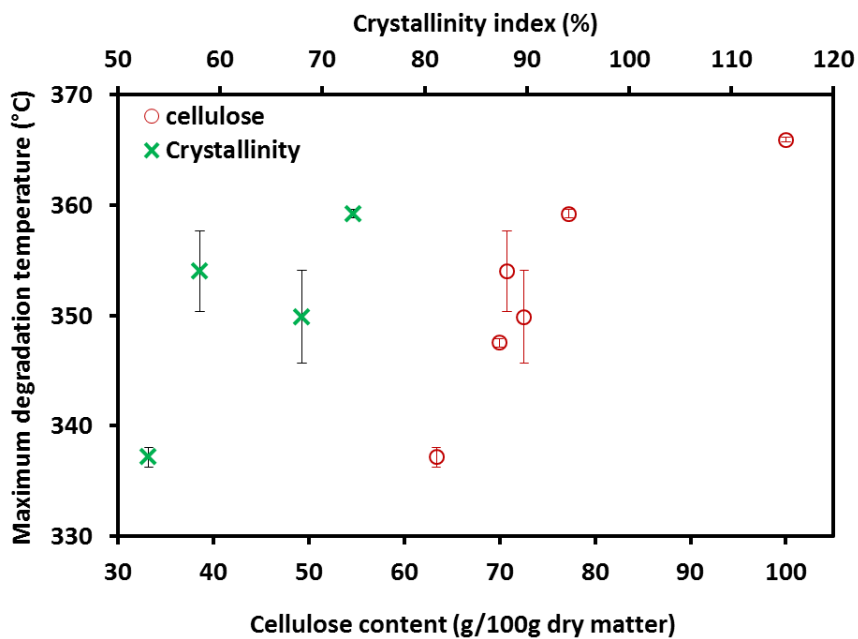


Figure II.12. Correlation between degradation temperature of cellulose (TGA), cellulose fraction (biochemical analysis) and cellulose crystallinity (DRX experiments)

3.5. Influence of field retting duration on the tensile properties of the fibre bundles

Figure II.13 shows the results of the fibre bundle tensile test for unretted (R0) and retted hemp fibers (R3, R5 and R9). Since both failure stress and Young's modulus depend on the fibre diameter [8][4][35], the average diameter of fibre bundles for each retting time is also reported for comparison. The diameters of fibres selected for tensile test are between 100 to 230 μm (figure II.14). The obtained results indicate that the retting duration influences the mechanical properties of hemp fibres. The tensile strength differs significantly ($p < 0.01$) between unretted fibres (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9), and no significant difference ($p > 0.05$) is noticed between values of the fibres collected at different retting times (R3, R5 and R9). Indeed, the tensile strength of fibres increases gradually from 174 MPa for unretted fibres to 342 MPa for 5-weeks retted fibres, and then decrease slightly to 324 MPa after a prolonged field retting of 9 weeks (median values) (figure II.13A). The Young's modulus of retted fibres (R3, R5 and R9) increases significantly ($p < 0.05$) to 12 GPa compared to that of unretted fibres (8 GPa) (figure II.13B), however, no significant difference is observed ($p > 0.05$) between the Young's modulus of the fibres collected at different retting times (R3, R5 and R9). The strain at failure increases significantly ($p < 0.01$) from 2.4 % for unretted fibres (R0) to 2.8 %, 3.4 %, 3.3 % (median values), for retted hemp fibres R3, R5 and R9, respectively (figure II.13C).

The change in tensile properties during field retting treatment can be explained by the results described in previous sections. A noticeable increase in both cellulose crystallinity and cellulose fraction during field retting could cause an increase of mechanical properties. This result is not surprising as it has been reported that both crystallinity and higher fraction of cellulose bring a better tensile performance [30][8][31][36].

Furthermore, the lower mechanical properties of unretted hemp fibres could be due to the presence of weak areas and a large amount of non-cellulosic substances such as pectins and hemicelluloses. This induces interfacial decohesion within fibres bundle. Another explication could be related to the manual extraction of the fibres that is not an easy step because of the presence of the cementing compounds (e.g. pectins) that bind the different parts of the stem. Therefore, hand extraction of fibres after removing epidermis using razor blade, may cause some micro-defects in the unretted hemp fibres. In contrast, when the stems are retted, as the cementing compounds are degraded, the generation of micro-defects in the fibres is limited and the manual fibres extraction is easier.

Mechanical properties of the fibres are governed by the retting duration which depends also on the weather conditions. In the present work, the field retting treatment of fibres harvested at the beginning of flowering was performed under summer weather conditions in the south of France. Therefore, in these conditions, results reveal that a long period of retting (5 weeks) is required for obtaining the highest mechanical properties. In contrast, Liu et al. [18] show that mechanical properties increase at the early stage of retting when the field retting period is carried out under a colder and homogeneous rainy weather condition, and then decrease rapidly due to the accelerated degradation of cellulose by microorganisms. Placet et al. [19] as well observed that a prolonged field retting until 5 weeks under rainy weather may lead to over-retted fibres. Hence, an extended of field retting duration under wet weather conditions must be avoided.

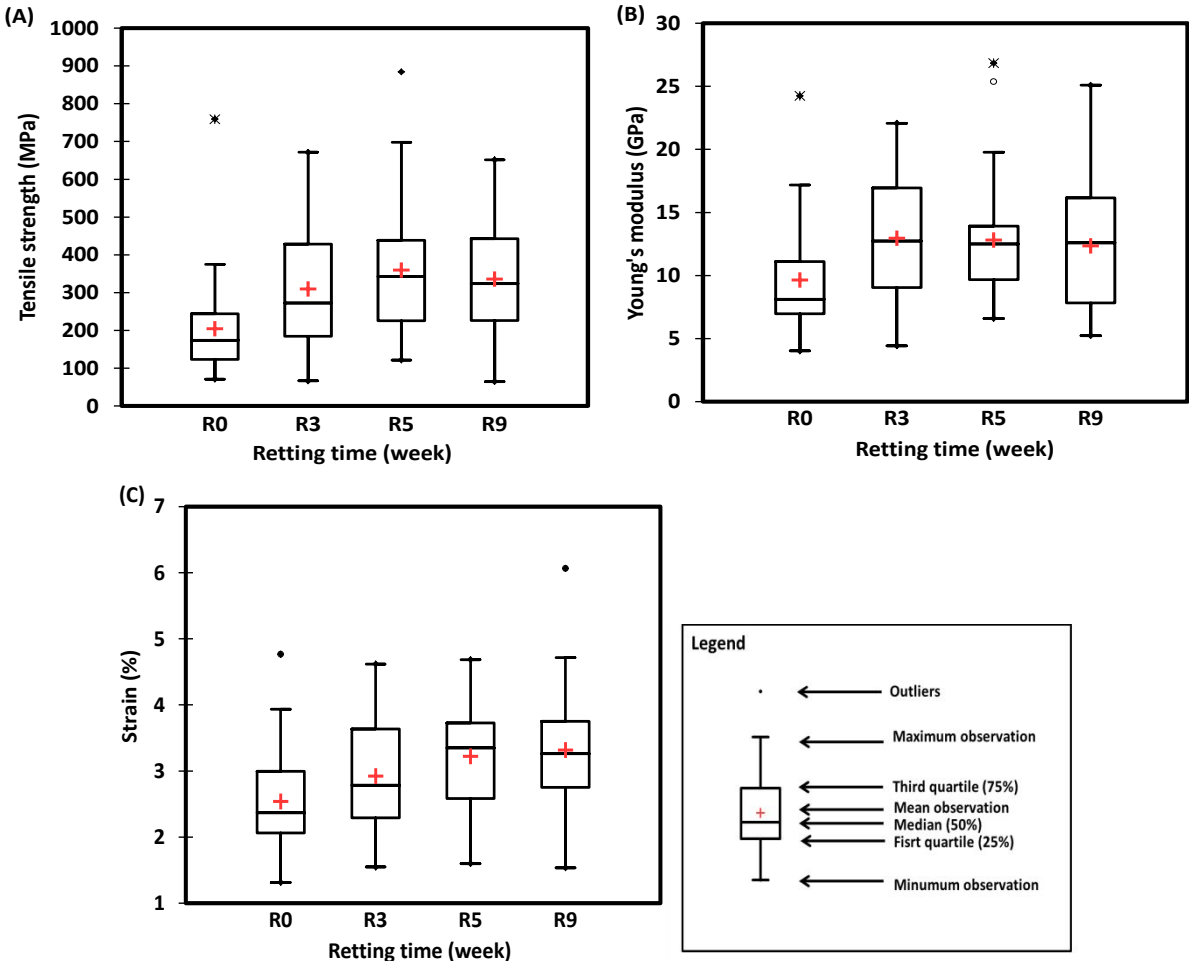


Figure II.13 : Box plots of tensile strength (A), Young’s modulus (B), and ultimate strain (C) of unretted and retted fibres (R3, R5 and R9)

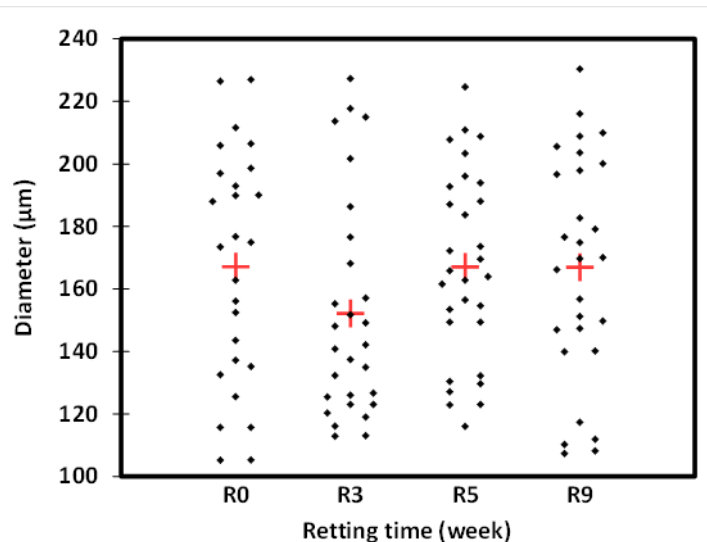


Figure II.14 : Scattergrams of measured diameters of unretted (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9). The red crosses correspond to the means)

4. Conclusion

In this study, the influence of field retting duration on biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering was investigated. The retting period of fibres occurs under summer weather conditions.

A color change of fibres from light green (R0) to grey (R9) was observed either on stems or on fibre bundles extracted from stems. A colonization of microorganisms on stems surface has been highlighted from 3-weeks retting fibres by using ESEM. Removal of the cortical parenchyma, pectic middle lamella and other cementing compounds was given in evidence by both optical microscope (qualitative analysis) and biochemical measurements (quantitative analysis). The cellulose fraction increase (from 63% for R0 to 77% for R9) with a decrease of non-cellulosic component (from 7.81% to 4.19% for pectins for example) during retting. The increase of cellulose organization from 53% for R0 to 73% for R9 was characterized using X-ray diffraction. This increase of cellulose organization is related to degradation of non-cellulosic components during retting. TGA measurements, showed a gradual increase in thermal stability of fibres during field retting and a lower mass loss related to non-cellulosic components decomposition in relation with the removal of these constituents along retting. The tensile properties of fibre bundles increase during retting due to the increase of both cellulose crystallinity and the cellulose fraction.

All these results highlight that field retting can induce a significant change on hemp fibres properties, as well mechanical and thermal properties than fibre microstructure and

microbiological medium. A 5 weeks field retting duration should be the best duration for higher mechanical properties of hemp fibres when harvested at beginning of flowering and retted in summer weather conditions. This approach also highlights that weather conditions are crucial for the implementation of the field retting process.

Further investigations will concern the evaluation of the field retting effect when fibres are harvested at different growth stages (beginning of flowering, end of flowering, and seed maturity) and with different weather conditions. In addition, the characterization of the structure of microbial communities should provide deep insights for understanding of biological mechanisms during retting. These future results should greatly determine easy and common indicators for improving the control of field retting process.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the “CIVAM Chanvre Gardois association (Bouquet, France)” for making available for us a plot of land to conduct this study. The authors wish also to express sincere appreciation to Prof. Jean-Louis Fanlo, Dr. Mathilde Chaignaud, Dr. Stephane Cariou, and Dr. Sandrine Bayle for their assistance in this work.

References

- [1] Aziz, S.H., Ansell, M.P., 2004. The effect of alkalization and fibre alignment on the mechanical and thermal properties of kenaf and hemp bast fibre composites : Part 1 – polyester resin matrix. *Compos. Sci. Technol.* 64, 1219–1230.
- [2] Dittenber, D.B., Gangarao, H.V.S., 2012. Composites : Part A Critical review of recent publications on use of natural composites in infrastructure. *Compos. Part A* 43, 1419–1429.
- [3] Bourmaud, A., Baley, C., 2010. Effects of thermo mechanical processing on the mechanical properties of biocomposite flax fibers evaluated by nanoindentation. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 1488–1494.
- [4] Duval, A., Bourmaud, A., Augier, L., Baley, C., 2011. Influence of the sampling area of the stem on the mechanical properties of hemp fibers. *Mater Lett.* 65, 797–800..
- [5] Stamboulis, A., Baillie, C.A., Peijs, T., 2001. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. *Compos. Part A* .32.1105-1115
- [6] Joshi, S. V., Drzal, L.T., Mohanty, A.K., Arora, S., 2004. Are natural fiber composites environmentally superior to glass fiber reinforced composites? *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 35, 371–376.
- [7] Wambua, P., Ivens, J., Verpoest, I., 2003. Natural fibres: Can they replace glass in fibre

- reinforced plastics ? *Compos. Sci. Technol.* 63, 1259–1264.
- [8] Placet, V., Trivaudey, F., Cisse, O., Gucheret-Retel, V., Boubakar, M.L., 2012. Diameter dependence of the apparent tensile modulus of hemp fibres: A morphological, structural or ultrastructural effect ? *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 43, 275–287.
- [9] Tanja Schäfer, B.H., 2006. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (*Cannabis sativa L.*). *Ind. Crops Prod.* 23, 88–98.
- [10] Crônier D, Monties B, Chabbert B. Structure and chemical composition of bast fibers isolated from developing hemp stem. *J Agric Food Chem* 2005;53:8279–89.
- [11] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Determination of interfacial shear strength of white rot fungi treated hemp fibre reinforced polypropylene. *Compos Sci Technol* 2009;69:1165–71.
- [12] Akin DE, Condon B, Sohn M, Foulk JA, Dodd RB, Rigsby LL. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase 2007;25:136–46.
- [13] Henriksson, G., Akin, D.E., Hanlin, R.T., Rodriguez, C., Archibald, D.D., Rigsby, L.L., Eriksson, K.L., Russell, R.B., Carolina, S. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the united states and europe. *American Chemical Society* 1997; 63, 3950–3956..
- [14] Nykter, M., Kyma, H., Belinda, A., Lilholt, H., Thygesen, A. Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa L.*). *Biomass Bioenergy* 2008; 32 (5), 392–399.
- [15] Vignon, M.R., Dupeyre, D., Garcia-Jaldon, C. Morphological characterization of steam-exploded hemp fibers and their utilization in polypropylene-based composites. *Bioresource Techno.* 1997; 58, 203–215.
- [16] Obendorf, S.K., Kyung, H.S. Chemical and Biological Retting of Kenaf Fibers. *Text. Res. J.* 2006; 76, 751–756..
- [17] Sharma, H., Brown, B.Y.A.E. Production of polysaccharide-degrading enzymes by saprophytic fungi from glyphosate-treated flax and their involvement in retting. *Ann Appl Biol.*1984; 105: 65-74
- [18] Liu M, Fernando D, Daniel G, Madsen B, Meyer AS, Ale MT, et al. Effect of harvest time and field retting duration on the chemical composition, morphology and mechanical properties of hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;69:29–39.
- [19] Placet V, Day A, Beaugrand J. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. *J Mater Sci* 2017;52:5759–77.
- [20] Mediavilla, V., Jonquera, M., Schmid-slembrouck, I. Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa L.*) *J. Int Hemp Ass* 1998; 5 (2), 68–74.
- [21] Liu M, Fernando D, Meyer AS, Madsen B, Daniel G, Thygesen A. Characterization and biological depectinization of hemp fibers originating from different stem sections. *Ind*

- Crop Prod 2015;76:880–91.
- [22] Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 1973; 54, 484–489.
- [23] Hoogen, B.M. Van Den, Rene, P., Golde, L.M.G. Van, Barneveld, A., Lest, C.H.A. Van De. A microtiter plate assay for the determination of uronic Acids. *Analytical Biochemistry* 1998; 257, 107–111.
- [24] Fila G, Manici L, Caputo F. In vitro evaluation of dew retting of flax by fungi from southern Europe. *Ann Appl Biol* 2001;138:343–51.
- [25] Martin N, Mouret N, Davies P, Baley C. Influence of the degree of retting of flax fibers on the tensile properties of single fibers and short fiber/polypropylene composites. *Ind Crops Prod* 2013;49:755–67.
- [26] Pallesen BE. The quality of combine-harvested fibre flax for industrials purposes depends on the degree of retting. *Ind Crops Prod* 1996;5:65–78.
- [27] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J-L, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015:4471–84.
- [28] Akin DE, Epps HH, Archibald DD, Sharma HSS. Color Measurement of Flax Retted by Various Means. *Text Res J* 2000;70:852–8.
- [29] Thygesen A;, Liu M, Meyer AS;, Daniel G, Thygesen A, Liu M, et al. Hemp fibres: Enzymatic effect of microbial processing on fibre bundle structure 2013;34:373–80.
- [30] Marrot L, Lefeuvre A, Pontoire B, Bourmaud A, Baley C. Analysis of the hemp fiber mechanical properties and their scattering (Fedora 17). *Ind Crops Prod* 2013;51:317–27.
- [31] Alemdar A, Sain M. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Compos Sci Technol* 2008;68:557–65.
- [32] Kabir MM, Wang H, Lau KT, Cardona F. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. *Appl Surf Sci* 2013;276:13–23.
- [33] Ouajai S, Shanks RA. Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments. *Polym Degrad Stab* 2005;89:327–35.
- [34] Ghetti P, Ricca L, Angelini L. Thermal analysis of biomass and corresponding pyrolysis products. *Fuel* 1996;75:565–73.
- [35] Charlet K, Baley C, Morvan C, Jernot JP, Gomina M, Bréard J. Characteristics of Hermès flax fibres as a function of their location in the stem and properties of the derived unidirectional composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2007;38:1912–21.
- [36] Reddy N, Yang Y. Structure and properties of high quality natural cellulose fibers from cornstalks. *Polymer (Guildf)* 2005;46:5494–500.

P-2/ A comparative study of the effect of field retting time on the properties of hemp fibres harvested at different growth stages

Brahim Mazian^{1,2}, Anne Bergeret^{1*}, Jean-Charles Benezet¹, Luc Malhautier²

¹Centre des Matériaux des Mines d'Alès, IMT Mines Alès, Université de Montpellier ,6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

²Laboratoire du Génie de l'Environnement Industriel, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

Abstract

The impact of field retting on the properties of hemp fibres harvested at different growth stages (beginning and end of flowering, seed maturity) was studied. Regardless the harvest period, identical evolution of fibres properties was observed during retting. The main difference is the kinetics of this transformation, which depends on weather conditions and initial state of the fibres after harvesting. Retting leads to a change in color of stems and fibres, an increase of the cellulose fraction and a gradual improvement of the fibres thermal stability, in relation with a decrease in the non-cellulosic materials. This process induces fibre bundle separation into elementary fibres. Tensile properties reach a maximum, regardless of the harvest period. If the fibres are over-retted, their quality decreases in terms of structure and mechanical properties. Reliable tools for farmers to improve the manage retting and to enhance hemp fibres reinforced polymer composites potential were therefore proposed.

1. Introduction

Based on environmental concern, the interest of using the cellulosic fibres was increased in high grade composites over the last few years. Plant fibres issued from hemp (*cannabis sativa* L) are part of these cellulosic fibres which could be used as an alternative of conventional fibres (e.g. glass and synthetic fibres) for manufacturing industry of low cost, low weight composite materials. This attraction of hemp fibres as reinforcement agents in composite is related to their high specific mechanical properties [1,2], their biodegradability [3,4], as well as their low-density [5]. However, there are a number of problems associated with the variation of the quality of these fibres in term of the morphology, chemical composition and physical properties which results in large variation in the mechanical

properties of the fibres. Many parameters can lead to this variation, including the variety [6], the growth conditions (ground, weather) [7], the plant growth stage [8–10], and the traditional extraction and separation processes, e.g. retting [11–13].

Hemp fibre can be considered as complex natural composite of cellulose microfibrils and matrix of amorphous polysaccharide, mainly composed of pectins and hemicelluloses. Indeed, the microfibrils of cellulose are embedded in a matrix of pectins and hemicelluloses forming the different cell wall layers of an elementary fibre [2,14]. The elementary fibres are assembled together through their pectic middle lamella to form bundles of fibres [15]. For using these fibres in material composite, a separation of bundle of fibres to individual fibres or smaller fibres bundles is necessary for improving interfacial bonding between fibres and matrix, as well as for enhancing the mechanical properties of final composite [11,16,17]. For that purpose, a traditional treatment called retting process is commonly used to facilitate the separation of the fibres. In Europe, the most widely used treatment is field retting (also known as dew-retting) because is inexpensive and easy to be applied [18,19]. This treatment consists to cut and leave the hemp stems on the field, where they are attacked by microorganisms (fungi and bacteria) producing a range of polysaccharide-degrading enzymes, especially pectinolytic which remove the components in the middle lamella (pectic substance) and allows the cortex fibres to be progressively separated [20–22]. Therefore, the field retting is a crucial step for the production of hemp fibres, but it is empirically realized in the field due to its dependence on the weather conditions (temperature, humidity) which could cause problems of the inconsistency of the hemp fibres quality. However, if this process is well controlled, much higher quality with more uniform fibres could be produced.

The exploitation of seeds hemp pushes the farmers to harvest the hemp stems at seed maturity. Consequently, the field retting is usually performed at this step of plant development which coincides with autumn period. During this period (mainly with heavy rainfall), the control of the fibres quality is sometimes not easy and an over retting can be rapidly reached. Placet et al. [12] reported that when the weather conditions did not allow for collecting the stems in time during retting, the stems undergo an unwanted and uncontrolled retting. In addition, they found after the comparison between unretted and 5 weeks-retted fibres that the prolongation of field retting under a very rainy retting period has caused over-retted fibres with lower quality in term of mechanical properties. In contrast, when the stems are retted in summer weather conditions, a long period of retting is required [13,22].

The aim of this study is then to reveal the impact of different growth stages (beginning of flowering, end of flowering, and seed maturity) and weather conditions on the properties of hemp fibres during field retting. Therefore, both qualitative and quantitative experimental techniques were used to survey the temporal dynamic of hemp fibres composition, microstructure, thermal and mechanical properties during retting of fibres harvested at the different growth stages mentioned above. The color change was analyzed by visual observations. The changing biochemical composition, pectin variation, crystalline structure was determined using successive solvent extractions, spectrophotometric and X-ray diffraction measurements, respectively. Thermal stability was surveyed using thermogravimetry analyses (TGA). Scanning electron and optical microscopy observations were carried out to examine the stem surface change and morphology of fibres. Finally, tensile testing realized on fibre bundles.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

2.1.1. Cultivation and sampling

Hemp (*Cannabis sativa* L., Cultivar 'Santhica 27') was sown at rate of 35kg/ha on May 6th, 2016 in the south of France (N 44.130673°, E 4.315895°) by CIVAM Chanvre Gardois [22]. The hemp plants were harvested manually using a shear at three growth stages (beginning of flowering (BF), end of flowering (EF), seed maturity (SM)) (figure II.15). The stems length during BF, EF and SM are 1.71 ± 0.09 m, 1.83 ± 0.10 m and 1.84 ± 0.09 m, respectively. After each harvest period, the plants were spread out in the field for retting, and then a weekly collection of retted stems was performed. Table II.3 gives the retting times and corresponding collected samples for each selected growth stage. Since morphological feature, chemical composition and mechanical properties depend on hemp stem sections [1,23,24], only the middle part of the stem was considered [22] in order to limit the scatter of the results.

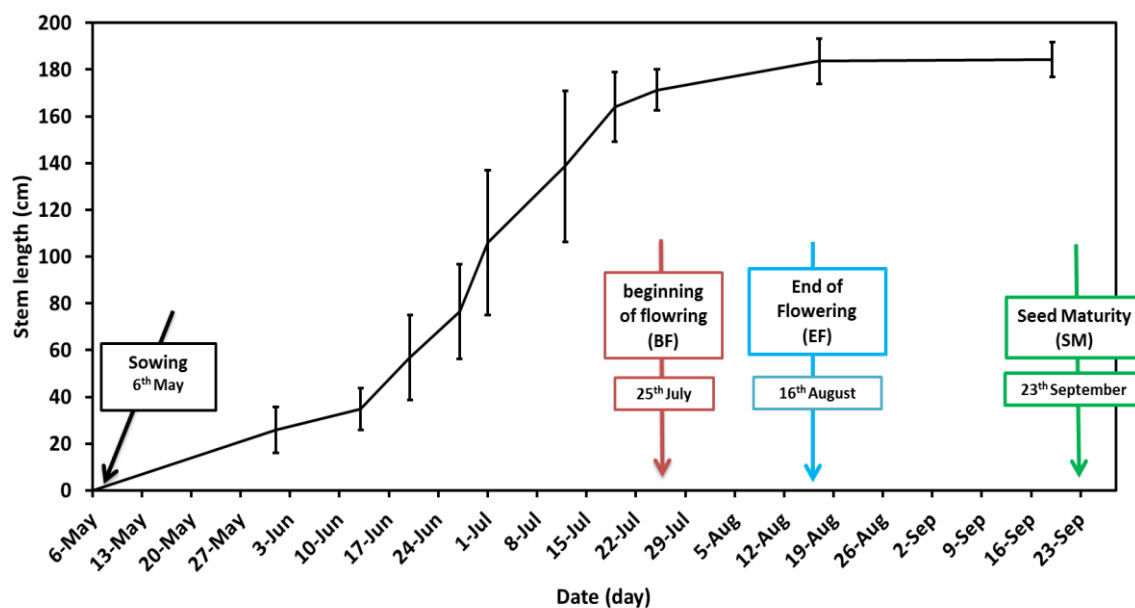


Figure II.15. Hemp plant growth from May 6th, 2016 to September 23th, 2016

Table II.3. Name of samples collected during different retting times for different harvest periods

Retting time (day)	0	7	14	21	28	35	42	49	63
Retting time(week)	0	1	2	3	4	5	6	7	9
Samples name	R0BF	R1BF	R2BF	R3BF	R4BF	R5BF	-	-	R9BF
	R0EF	R1EF	R2EF	R3EF	-	R5EF	-	R7EF	R9EF
	R0SM	R1SM	R2SM	R3SM	R4SM	R5SM	R6SM	-	-

2.1.2. Weather conditions

A monitoring of temperature and relative humidity during retting of the stems harvested at different growth stages was carried out in the field using three hygro-bouton sensors (Progesplus, Carquefou, France) that were directly put in contact with the soil. In addition, daily average rainfall data was acquired from Météo France (weather station located at Méjannes-le-Clap, France (GPS: N44.221944°, E4.344722°)). As can be seen on the figure II.16, the weather conditions were not similar during retting for each harvest period. The retting of the stems harvested at BF was mainly carried out during summer (25th July to 26th September 2016), whereas, the stems harvested at EF were retted in two seasons (summer and autumn (16th August to 17th October 2016)). The retting of the stems harvested at SM was performed during autumn (23th September to 7th November 2016). The weather was hot during retting for the stems harvested at BF. Indeed, the average

maximum and minimum temperature between the 1st and the 6th week are 47°C and 17°C, respectively, while during two last weeks of this period, they decreased to 26°C and 14°C, respectively. Between the 1st and the 4th week of retting of the stems harvested at EF, the weather was also hot with an average maximum temperature of 49°C and an average minimum temperature of 16°C. From 4th week to the end of retting period of EF, the temperature decreased with an average maximum and minimum of 23°C and 13°C, respectively. Regarding the stems harvested at SM, the retting of this period was performed in cool weather, with an average maximum temperature of 17°C and an average minimum temperature of 10°C. Rainfall and humidity were not homogeneously distributed during the retting period of the stems harvested at BF and EF, contrary to the retting period of stems of SM. The average relative humidity during retting of the stems harvested at BF, EF and SM was 62%, 64% and 75%, respectively. During retting of the stems harvested at BF and EF, there was little rainfall throughout 9 weeks. Indeed, between 1st and 4th week of retting, the sum of rainfall was 32mm for BF and 14mm for EF, while, after 5th weeks until last sample collection, it was higher, 82mm for BF and 244mm For EF. Concerning, the retting period of the stems harvested at SM, the rainfall was more homogeneously distributed. There was a rainfall almost each week throughout the retting period. The sum of rainfall during the 6 weeks of retting period of the stem of SM is 215mm.

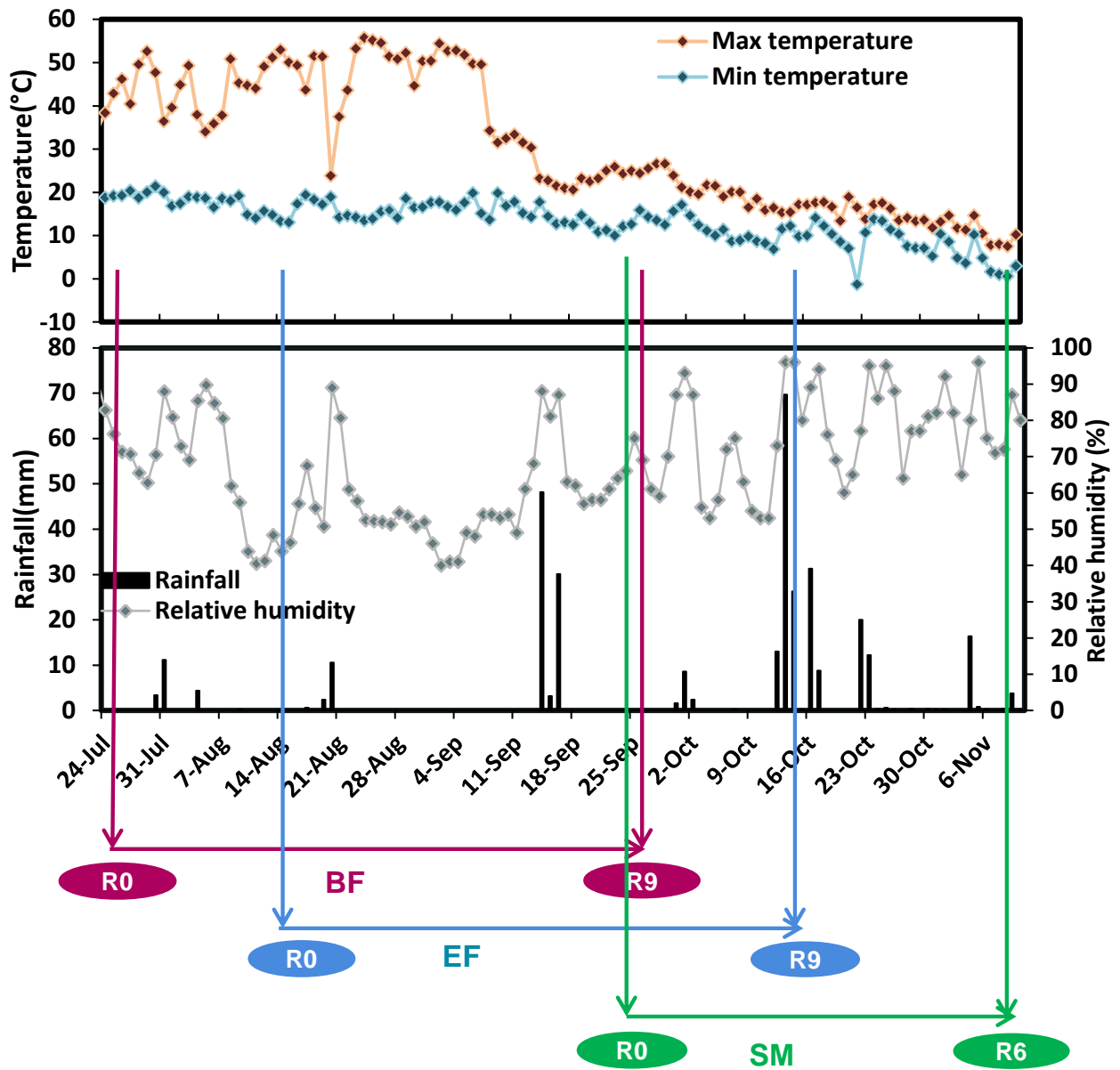


Figure II.16. Daily weather conditions (minimum and maximum temperature, relative humidity and rainfall) during retting of fibres harvested at different growth stages (BF, EF and SM)

2.2. Experimental methods

2.2.1. Visual aspect

Color change of the stems and fibres issued from different retting durations for each harvest period (BF, EF and SM) was visually evaluated. Fibres were manually extracted from stems using a razor blade and flat files.

2.2.2. Microscopic observations

The surface change of stems during retting was observed through scanning electron microscopy (ESEM) using an environmental scanning electron microscope Quanta FEG 200 (FEI, Merignac, France) with a magnification of x500 and x1000.

The effect of plant development stage (BF, EF and SM) and retting duration on the morphology of the stem was examined using the optical microscopy (Leica Laborlux 11 POL S) equipped with a 1600 × 1200 pixels mono-CDD Sony digital camera. The cross sections of the stems were cut manually, then coated in an epoxy resin (Geofix® resin (ESCIL, Chassieu, France)), and subsequently polished using different fine polishing papers (600, 2400 and 4000 grade) to obtain smooth samples. Digital images (figure II.17) were recorded using Archimed® software in order to realize qualitative and quantitative analysis. Morphological features were measured including: stem diameter, thickness of epidermis, primary fibre layer, secondary fibres layer and xylem.

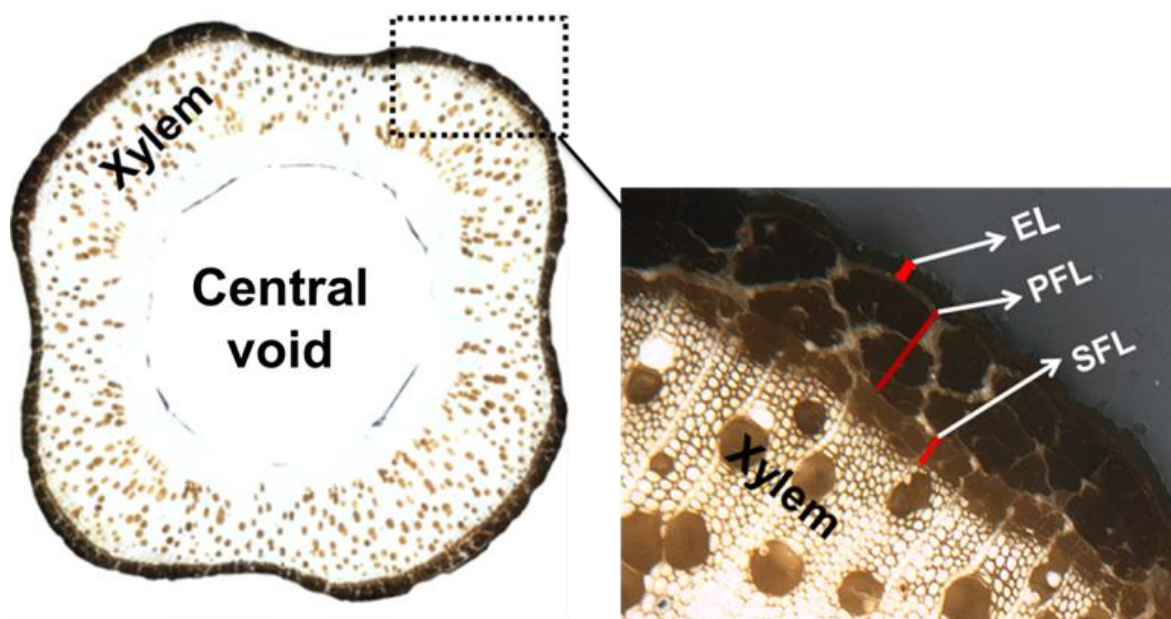


Figure II.17. Cross section of hemp stem (EL: epidermis, PFL: Primary fibres layer, SFL: secondary fibres layer)

2.2.3. Biochemical analysis

The biochemical analysis were done using two methods described in details in our recent work [22], one based on solvent extractions to quantify cellulose, lignin and lipophilic extractives contents according to several ASTM test methods (figure. II.3), the other based on spectrophotometry to determine the pectins content (figure II.4).

2.2.4. X-Ray diffraction

The X-Ray diffraction (XDR) analysis were conducted on X-ray (XRD, AXS D8 Advance Bruker) diffractometer equipped with Cu-K α radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Measurements were performed on cut and compressed fibres (disks of 25 mm in diameter and 2 mm in thickness). X-ray diffractograms were recorded within an angle range of 2θ from 5° to 70° with a scanning rate of $0.01^\circ/\text{s}$. The crystalline order index (CI) was determined from X-ray diffractograms using a deconvolution method [22]. Individual peaks were extracted by curve fitting process using Origin® software assuming Gaussian functions. Crystalline peak areas (I_c) and amorphous broad peak area (I_{am}) were used to calculate the crystallinity order index according to equation 1.

$$CI = \frac{I_c}{I_c + I_{am}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

2.2.5. Thermogravimetric analysis

Fibres collected at different harvest periods (BF, EF and SM) and retted at different times were analyzed using a Perkin-Elmer Pyris-1 thermal analysis system. Samples of about 8 mg were heated in nitrogen environment from 30°C to 700°C at the rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$. At least two samples from each retting time were performed. The mass variation was recorded as a function of temperature. A differential thermogravimetric analysis (DTGA) curve was collected from the TGA analysis.

2.2.6. Tensile test of fibre bundles

Tensile characteristics of the fibres bundles were measured using a micro-tensile testing instrument from DiaStron Ltd. (Diastron Ltd., Hampshire, UK) [22]. Prior to tensile tests, fibre bundles were manually extracted from the stems after removing the epidermis using a razor blade. The fibre bundles were first glued on one-part plastic tab using UV-curing glue (DYMAX ultra-light weld, DYMAX Europe GmbH, Wiesbaden, Germany). Then fibre bundles diameters were determined using an automated laser scanning device FDAS 765 (Diastron Ltd., Hampshire, UK). Fibres horizontally rotated within the laser beam at 21 slices along the fibre axis. The mean, the minimum and the maximum diameters for each slice were recorded in a dimensional report exported by UvWin® 3.60 software. Thus, the mean of

each slice along the fibre were averaged to calculate the effective cross sectional area assuming that the fibre bundle had a circular shape. After that, fibre bundles were automatically transported to the mini-tensile testing device (Diastron LEX810 system (Diastron Ltd., Hampshire, UK)) equipped with a 20N capacity load cell. The samples were conditioned at a constant temperature (23°C) and relative humidity (48%) and are loaded at a constant crosshead displacement speed of 1.2 mm/min⁻¹ and with 12 mm gauge length. Approximately 30 fibre bundles were tested. Force to stress conversion was based on the aforementioned effective cross sectional area. A curve of force (Gram-Force) as function of displacement is obtained, and then the tensile strength, the Young's modulus (slope of linear zone) and the failure strain were determined. The results were analyzed statistically using ANalysis Of VAriance ANOVA and Tukey multiple comparison test at significant level of 5%.

3. Results and discussion

3.1. Color change

The color change of the stems and the processed fibres issued from different retting durations for examined harvest periods (BF, EF and SM) was visually evaluated. As can be observed in the photograph (figure II.18), the color varies with plant growth and also during field retting. For BF and EF, the color of the unretted samples was light green, contrary to the stems and fibres harvested at SM that were transformed to yellow. This variation of the color from green to yellow after maturity is presumably due to the change in the light depth penetration in the photosynthetic tissues. Indeed, the chlorophyll that is responsible of green color was decomposed with the partial retention of carotenoids that emit yellow color [25–27].

During retting of samples harvested at BF and EF, the color changes between light green for unretted samples (R0), yellow for low retted samples (R1 to R3), yellow with the presence of grey fibres for medium retted samples (R4 and R5) and dark grey for highly retted samples (R9). In contrast, for the samples of SM, the color only changes from yellow (R0) to dark grey (R5). The fibres harvested at BF and EF require 9 weeks to be completely dark grey, while only 3 weeks are needed for the fibres harvested at SM. This indicates that the retting of the samples collected at SM was fast due to weather conditions (rainy retting period) and the aging of the stems at this stage. In contrast, as described in section 2.1.2, the retting of stems harvested at BF and EF was performed under dry weather conditions, allowing to observe a slow and gradual color transition during retting of these periods.

This color transition is typical during field retting, even for other natural fibres as flax fibres [11,28]. The color variation from yellow to grey for the fibres is related to the development of microbial communities (fungal and bacteria [29–31] at stem surface. In addition, during field retting, the black spots appeared and increased on the stems surface until the color of stems became black. ESEM images (figure II.19) of the stems harvested at SM (for example) reveal that the black spots are attributed to the development of microbial communities at the stem surface during field retting. The microbial communities would start to colonize the surface of stems harvested at SM after 1 week of retting (R1SM) and gradually cover the entire stems after 3 weeks (R3SM). However, for BF and EF periods, the large covering of stem surface by microorganisms was observed after 9 weeks of retting [22].

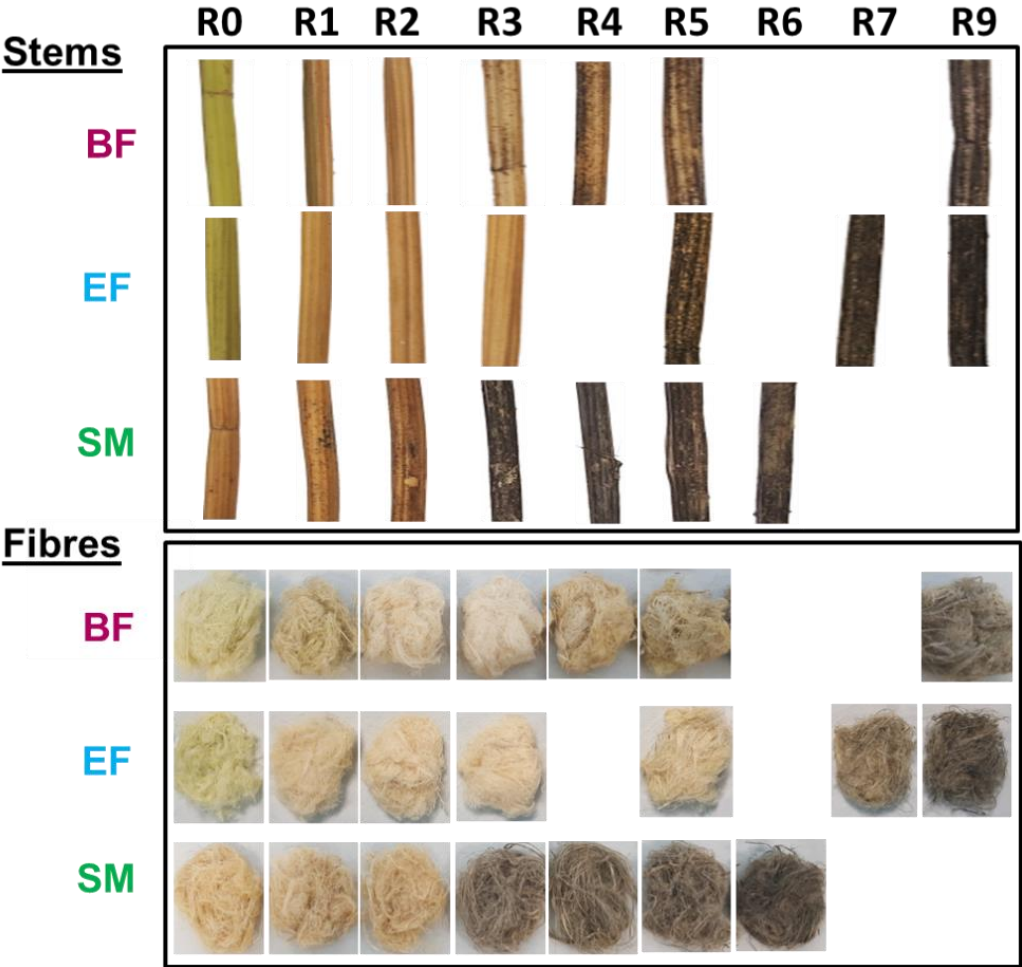


Figure II.18. Photographs of color changes during retting of hemp harvested at different periods (BF, EF and SM)

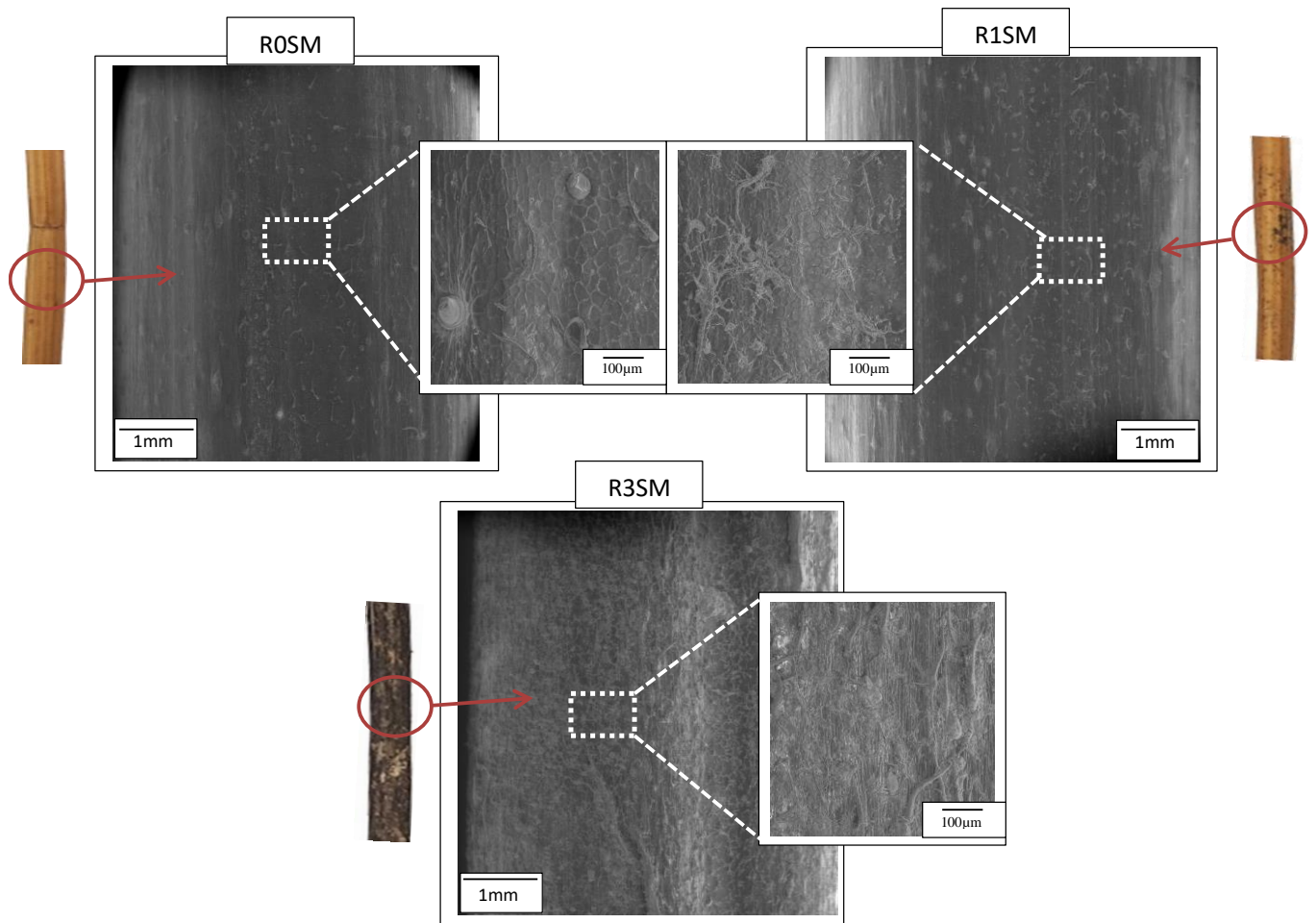


Figure II.19. ESEM images of the surface change during retting of the stems harvested at SM

3.2. Biochemical composition

The evolution of relative biochemical composition as a function of retting duration is presented in Figure II.20 for fibres harvested at EF and SM period. The evolution for fibres harvested at BF growth stage was detailed in a previous paper [22]. Results show that the biochemical variation depends on both harvest period and retting duration. For all harvest periods, a gradual increase of cellulose content could be observed during field retting. The cellulose increased from 63% to 77% after 9 retting weeks for fibres harvested at BF period [22], from 68% to 75% after 9 retting weeks for fibres harvested at EF period, whereas it increased from 70% to 74% after 5 retting weeks for fibres harvested at SM period. In addition, an increase of the cellulose content can be noted from 63% to 68% then to 70% over the growth period from BF to EF and then to SM, respectively. As the quantification of cellulose content is relative, thus its variation is related to the change of content of other components. The pectins content decreased during retting for fibres harvested at BF (from

7.8% for R0BF to 4.1% for R9BF) [22], for those harvested at EF (from 7.5% for R0EF to 4.4% for R9EF) and finally those harvested at SM period (6.2% for R0SM to 3.9% for R5SM). In addition, a decrease of the pectins content can be noted from 7.8% to 7.5%, then to 6.2% over the growth period from BF to EF then to SM respectively. A slight reduction in hemicelluloses content was given in evidence with increasing of retting duration (14.1% to 11.6% between R0BF and R9BF, 15.7% to 14.9% between R0EF and R9EF and 16.0% to 14.5 between R0SM and R5SM). Nykter et al. [32] used the same extraction method, and found an identical tendency of these components after enzymatic treatments. The gradual degradation of pectins is consistent with data reported by Meijer et al. [33] and Musialak et al. [34] during field retting. As regards Liu et al. [13], these authors pointed out an increase of cellulose content at early stage of field retting with a decrease of non-cellulosic components (pectins and hemicelluloses). Figure II.20 shows also a decrease in minerals (ash) and lipophilic extractives (waxes, fats, resins...) content during the retting of fibres harvested at BF (Mazian et al., 2018), EF and SM periods. Ash contents decreased from 4.2% for R0BF to 1.5% for R9BF, from 3.2% for R0EF to 1.5% for R9EF and from 2.3% for R0SM to 1.6% for R9SM. Lipophilic extractives contents decreased from 14.9% for R0BF to 4.1% for R9BF, from 8.6% for R0EF to 2.7% for R9EF and from 4.0% for R0SM to 2.6% for R9SM. Fibres harvested at BF and EF period have the highest content of these components compared to that of fibres harvested at SM period. This might justify the long retting period of fibres harvested at BF and EF growth stage, since the high presence of lipophilic extractives (waxes) and green fresh odor could be an obstacle to the retting process by reducing its efficiency, and thereby increases its duration. Foulk et al. [35] reported that the presence of wax on the cuticle forms a protective barrier against entry of infection agents into the plant. The lignin content increased during field retting time for fibres harvested at BF (Mazian et al., 2018), EF and SM periods (from 3.1% for R0BF to 5.1% for R9BF, from 3.9% for R0EF to 9.3% for R9EF and from 5.0% for R0SM to 8.0% for R9SM). This result is in agreement with Liu et al. [13] and Placet et al. [12] who reported that during field retting, the lignin content increased due to a lower rate degradation of lignin compared to the other components (lipophilic extractives, ash and carbohydrates) that are removed at the same time. Placet et al. [12] suggested another explication. Indeed, other phenolic or protein components evolved during retting might be also measured through the used Klason method. On another hand this increase could be related to the fibres extraction method from the stems. Indeed the different parts of the stems (e.g. epidermis, xylem) may become weaker with increasing of field retting time. Therefore when fibres are extracted from the

retted stems, micro-residuals xylem (shives) could be still bounded to fibres and overestimate the real evolution of lignin during retting. This variation on biochemical composition is due to both biofilm growth (ESEM investigations) and metabolic activity of microorganisms during hemp fibres retting [29,30].

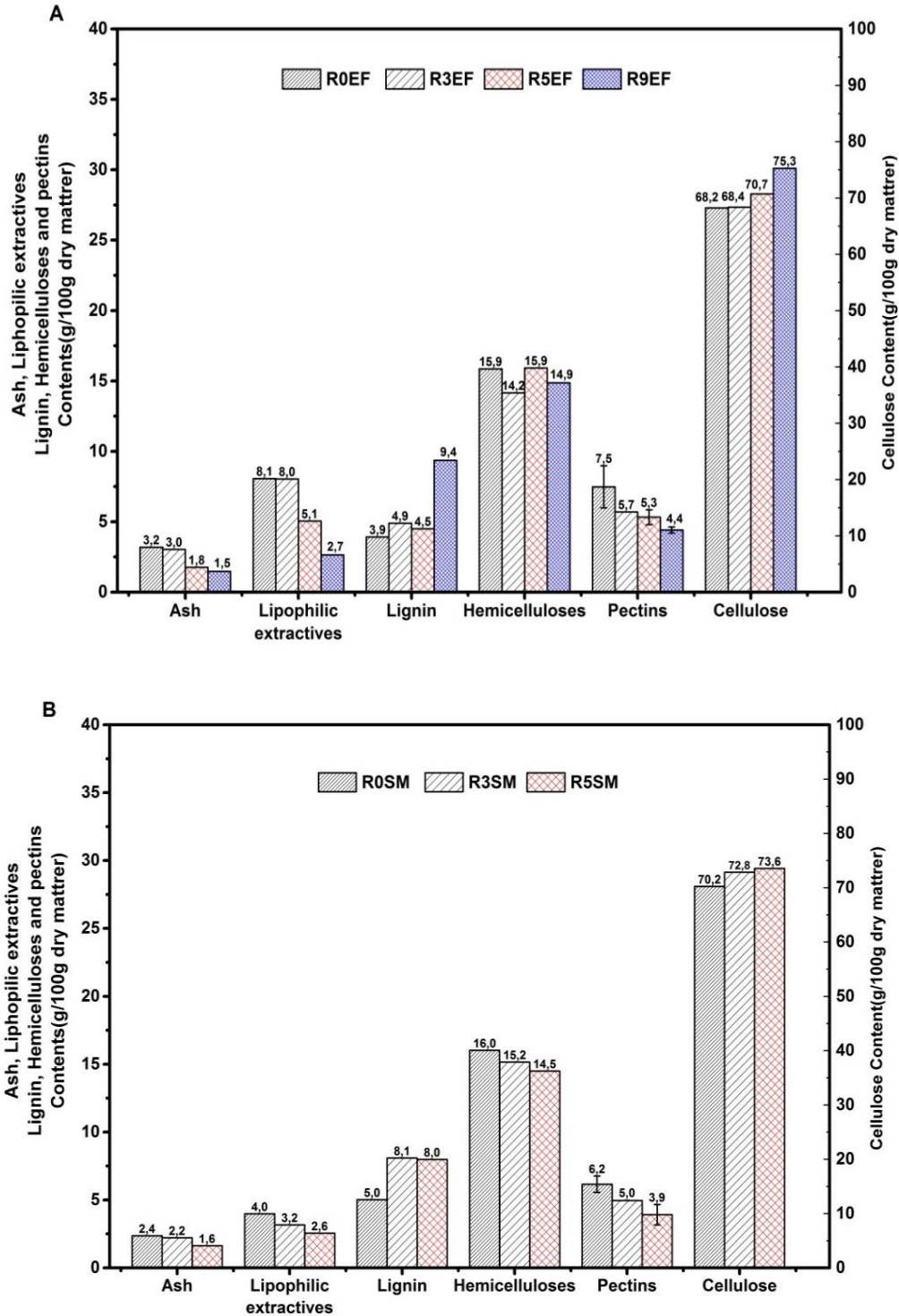


Figure II.20. Ash, lignin, hemicellulose, lipophilic extractives, hemicelluloses, cellulose and lignin, pectins contents as a function of field retting duration for fibres harvested at a) end of flowering (EF) and b) at seed maturity (SM)

3.3. Cellulose crystallinity

In addition to the biochemical analysis, the influence of field retting on the cellulose organization of fibres harvested at EF and SM period was characterized using X-ray diffraction. X-ray diffractograms of hemp fibres collected at different retting duration for EF and SM periods are obtained after XDR analysis (figure II.21). All the samples exhibit three defined peaks that are located at 2θ diffraction angles of 14.8° , 16.2° and 22.6° , and which correspond to crystallographic planes of cellulose type I: (101), $(10\bar{1})$ and (002), respectively. The XRD patterns show that the intensity of the crystalline peak rose with field retting process for both fibres harvested at EF and SM period as previously observed for fibres harvested at BF period. When the crystalline cellulose content is high, peaks at around 14° and around 16° are quite separated. But when the fibres contain a higher amount of amorphous phase (e.g. for unretted fibres), these two peaks merged and appeared as one broad peak [36]. Furthermore, in order to quantify these differences, the crystalline order index (CI) was determined from X-ray diffractograms using a deconvolution method described in materials and methods section. Table II.4 presents CI values for hemp fibres harvested at EF and SM period showing a gradual increase with the field retting duration from 58% to 69% and from 64% to 73% for fibres harvested at EF and SM period, respectively. This was also noticed during field retting of hemp fibres harvested at BF period with an increase from 53% to 73% [22]. The high value of CI of unretted fibres harvested at SM (R0SM) compared that of unretted fibres (R0EF) is not surprising, since according to the results of biochemical analysis, the cellulose content of R0SM is higher than that of R0EF. The increase in CI was also noticed by Li et al. [37], who compared green hemp fibres, 1 week retted fibres and 2 weeks retted fibres using bag retting treatment. They found that the CI evolved from 66% for hemp green fibres to 85% for retted hemp fibres, respectively. Zafeiropoulos et al. [38] reported an increase of CI from 65% to 72% after a field retting of flax fibres. This increase of CI could be explained by the degradation of non-cellulosic compounds during retting enabling packing of cellulose chains. Indeed, high amount of amorphous constituents presented between the cellulose micro-fibrils causes disoriented areas, which could undesirably influence the crystallinity of the cellulose micro-fibrils. The change in cellulose fraction, and in cellulose structure, as well as its degree of crystallization may have direct impact on the mechanical properties [6,39–41].

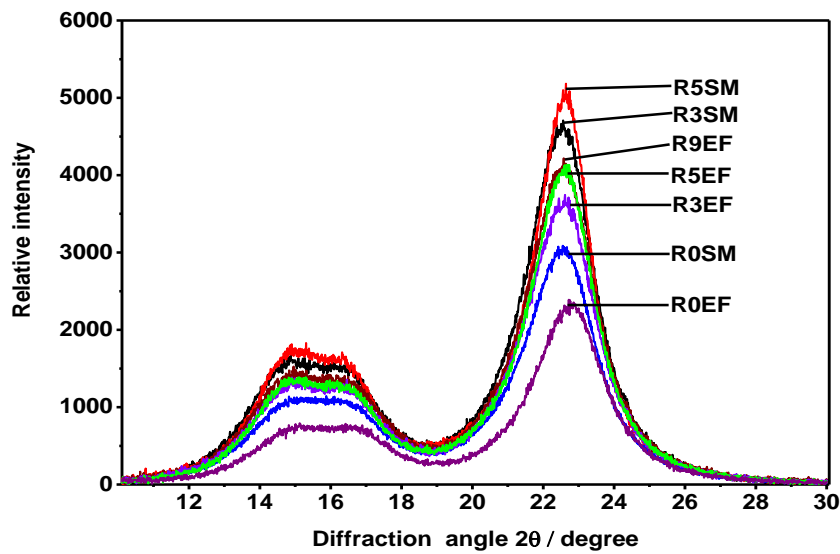


Figure II.21. Diffractograms of fibres harvested at EF and SM, and retted at different durations

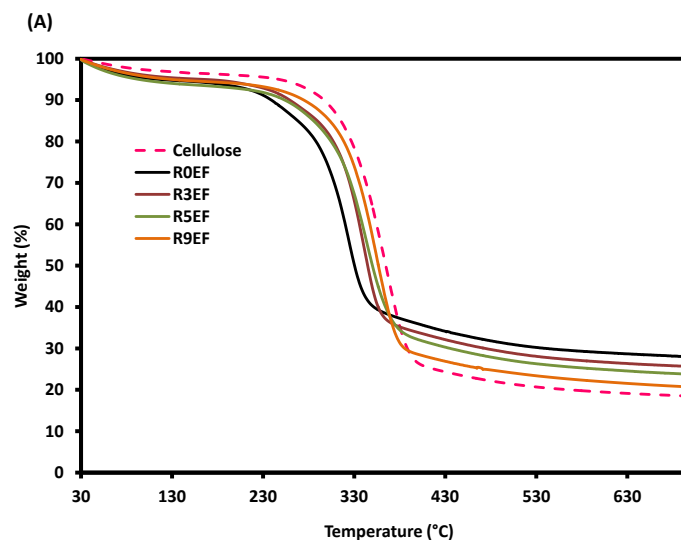
Retting time	Crystallinity order index (%)	
	EF	SM
R0	58	64
R3	67	71
R5	68	73
R9	69	-

Table II.4. Evolution of crystallinity order index during retting of fibres harvested at EF and SM

3.4. Thermal stability

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out in order to assess the influence of field retting duration on thermal performance of fibres harvested at different hemp plant growth stages. Figure II.22 shows the curves of TGA and DTGA obtained from different retting durations of fibres harvested at EF and SM period. Results for fibres harvested at BF growth stage were detailed in a previous paper [22]. In general, there are three stages of decomposition in TGA curves (figure II.22A and C). The initial weight loss at about 30-100°C is due to evaporation of the absorbed moisture. The second at about 230-260°C is related to decomposition of non-cellulosic components (pectins and hemicelluloses) and the third stage at 335°C is attributed to decomposition of major component of fibres (cellulose). This process of decomposition of the fibres is consistent with data reported in literature [12,22,42-44].

In TGA curves, peaks are superimposed on temperature scale, thus by calculating the derivative of the weight loss as a function of temperature (figure II.22B and D). The decomposition process of the fibres can be clearly observed in this case. From the peak with the highest intensity, it can be seen that the increase of retting duration led to an increase of the decomposition temperature of the fibres, from 337°C to 359°C for R0BF and R9BF, from 323°C to 357°C for R0EF and R9EF and from 350°C to 367°C for R0SM and R5SM. This emphasized a higher thermal stability for high retted fibres, as confirmed by literature [12,44,45]. As the field retting of the fibres harvested at EF was long, the increase of the decomposition temperature of the fibres was gradual and slow. In contrast, for the fibres harvested at SM, the increase of decomposition temperature of fibres was rapid and high. In addition to the retting treatment, it can be also observed that the R0SM fibres displayed higher decomposition temperature (350°C) when compared to R0EF fibres (323°C). The intensity of the pectins and hemicelluloses peak (shoulder peak) decreased as a function of retting duration. This is related to their partial degradation during field retting. However, this peak is not visible when the hemp fibres are high retted, indicating that non-cellulosic components were quasi totally removed. The previously described increase in cellulose temperature decomposition can be also related to the removal of non-cellulosic components which induces a higher structural order of cellulose that contains strong intramolecular and molecular hydrogen bonds that requires a higher degradation temperature to be broken-down [43,44].



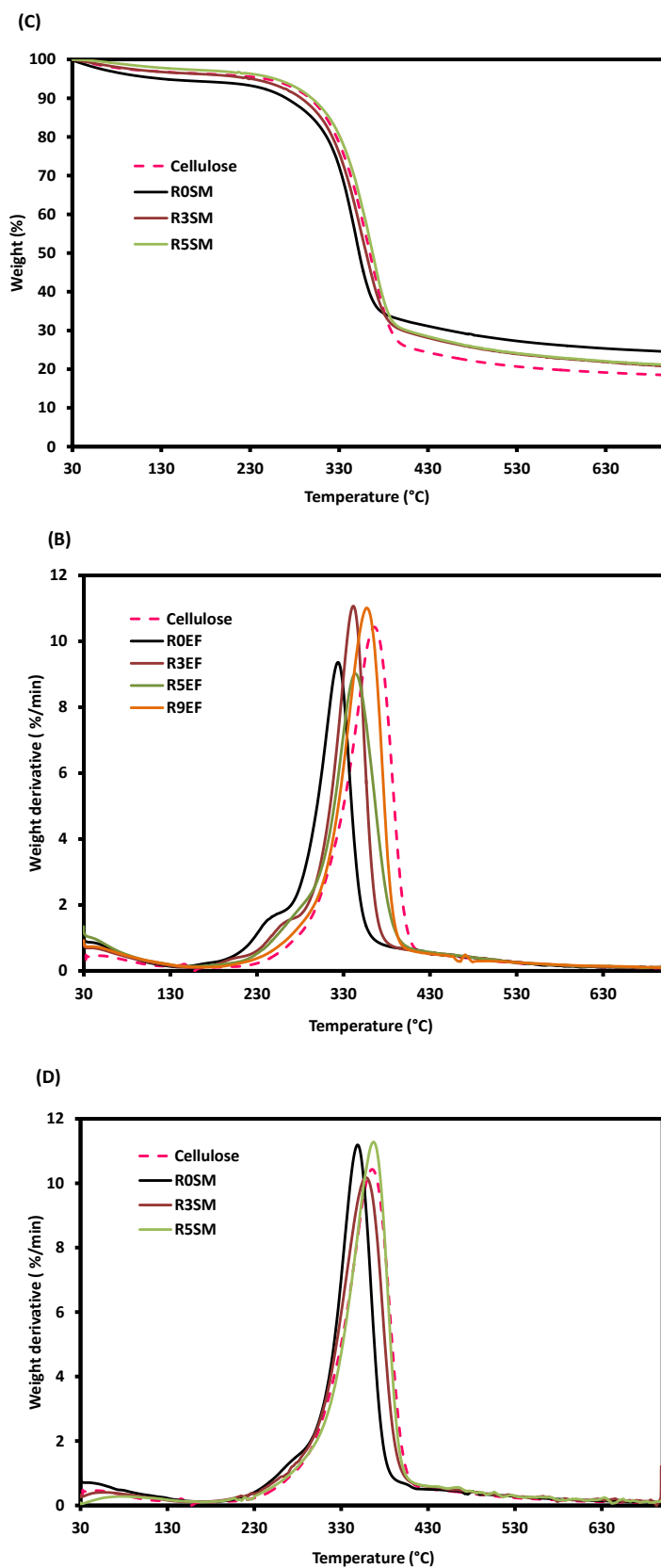


Figure II.22. TGA (A) and DTGA (B) curves of fibres harvested at EF (R0EF) and retted at different times (R3EF, R5EF and R9EF). TGA (C) and DTGA (D) of fibres harvested at SM (R0SM) and retted at different times (R3SM and R5SM)

3.5. Morphology

The evolution in plant morphology of hemp during three growth stages (BF, EF and SM) was investigated. Hemp stems contained different layers as already described by number of authors [13,46,47]. They are organized from the stem pith toward the surface by central woody core (xylem designed as X), cambium, cortex (including both primary -and secondary fibres noted PFB and SFB respectively) and epidermis (called E). During growth from beginning of flowering to the maturity of plant, a variation of these morphological characteristics of plant occurs, but the same organization of layers is always observed. The diameters of the unretted stems harvested at BF, EF and SM period, and before retting are $5.7\pm 0.7\text{mm}$, $6.1\pm 0.5\text{mm}$ and $6.5\pm 0.1\text{ mm}$, respectively. This increase is associated to the variation of the layers thickness of different parts of the stem. This study exhibited that the morphological features of hemp stem depending on the harvest period (figure II.23). During plant growth from BF to SM, the thickness of bast fibres and of xylem layers increased. This change is particularly related to the increase in secondary fibres layer (SFL) thickness from $20\mu\text{m}$ for BF to $40\mu\text{m}$ for SM, while no significant variation of the thickness of primary fibres layer (PFL) and of epidermis layer (EL) are observed with the growth period. This result was already reported by Liu et al. [13] and Mediavilla et al. [48]. Tanja Schäfer. [46] pointed out that dry weather condition results in a higher presence of secondary fibres in the hemp stem.

The impact of field retting duration on the morphology of the hemp fibres was then qualitatively analyzed. Figure II.24 shows the optical microscope micrographs of cross-sections of unretted (R0EF) and retted hemp stems (R3EF, R5EF and R9EF) collected at the end of flowering. When the hemp stem is unretted (R0EF), the structure of different layers of the stem is intact and well organized. The fibres are gathered in the form of a bundle and the lumen of the elementary fibres cannot be distinctly observed. Since that field retting period of stems harvested at EF was long and slow, no high difference could be observed after 3 weeks (R3EF) of retting at the level of bast fibre. In contrast, after 5 weeks of retting (R5EF), the structure of stem changed. The primary and secondary fibre bundles are separated into smaller fibres bundles resulting in more open spaces between fibre bundles. When the stems are highly retted (R9EF), the structure of the stem was affected by field retting. The epidermis layer is deformed and removed. The bundles of fibres were completely separated into elementary fibres (EF) and their lumen (L) is clearly visible. A similar evolution of the morphology of the hemp fibres during field retting process was observed in our recent work [22] for stems harvested at BF. Overall, whatever the growth

period, the same evolution of the morphology of the hemp fibres during field retting process is highlighted. The bast fibre bundles are separated i) from the central woody core and epidermis ii) and into smaller bundles or individual fibres.

This change in morphology during retting is due to the microorganism’s activities that would allow the removal of intercellular cementing components (pectins and lipids extractives) in agreement with the biochemical analyses. This separation of the fibres into smaller bundles or elementary fibres during field retting would have a positive effect on the mechanical properties hemp fibres as reinforcements in composites [11,16,17].

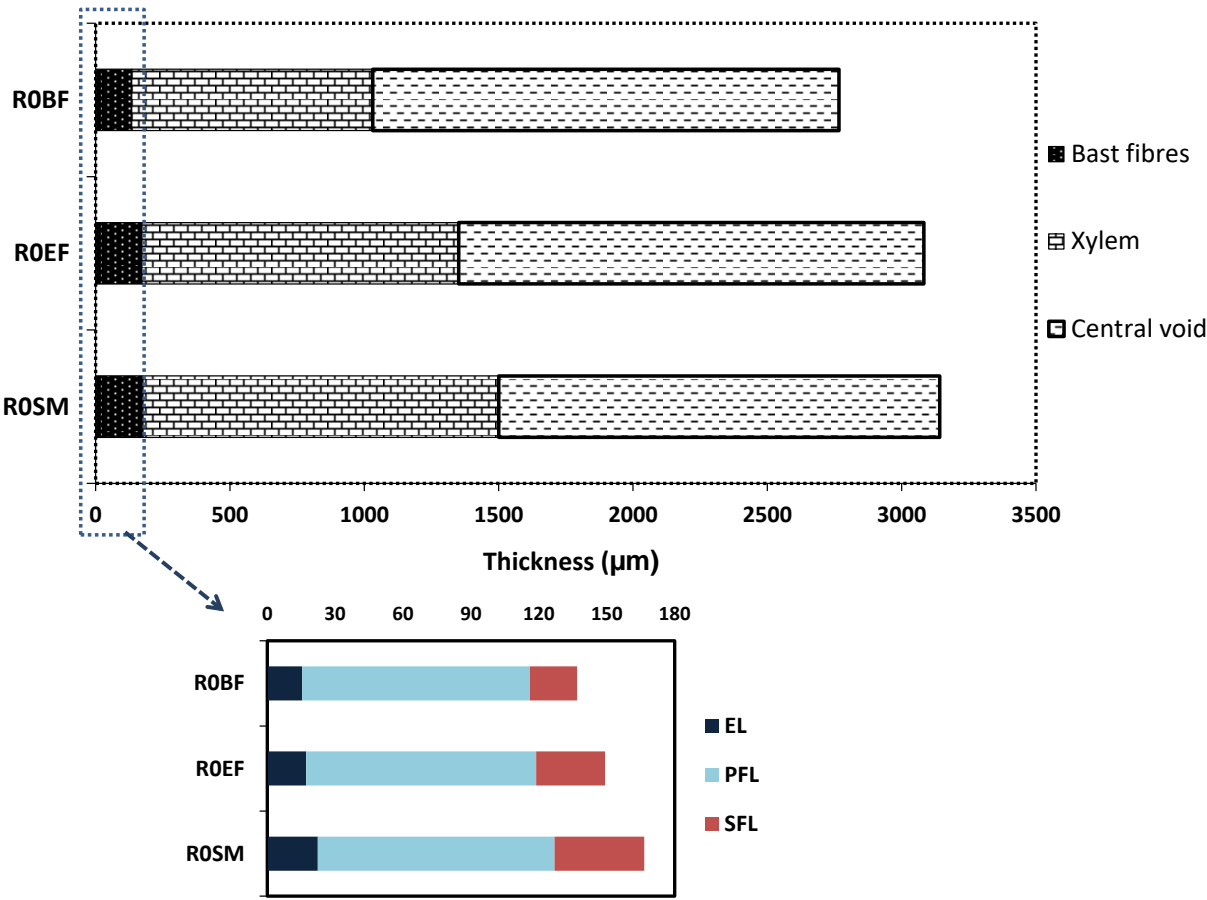


Figure II.23. Morphological features (bast fibres, xylem, and central void). EL: Epidermis layer, PFL: primary fibres layer, SFL: secondary fibres layer) of hemp stem depending on harvest period before retting

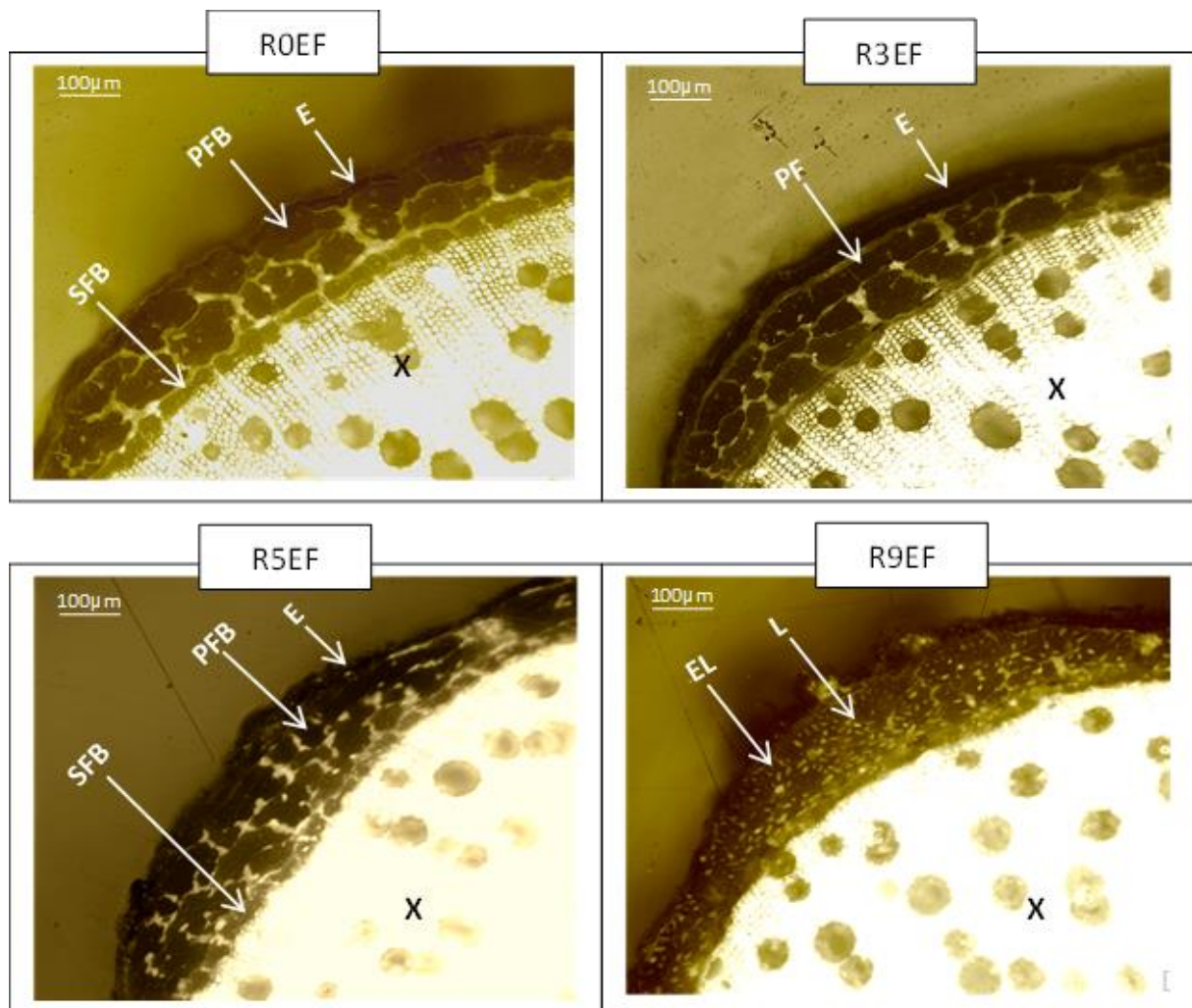


Figure II.24. Optical microscope micrographs of cross sections of R0EF, R3EF, R5EF, R9EF; E: epidermis; PFB: primary fibre bundles; SFB: secondary fibre bundles; ML: middle lamella; L: lumen; EF: elementary fibres; X: xylem

3.6. Tensile properties

In order to evaluate the influence of field retting on the hemp fibres harvested at different growth stages (BF, EF and SM), the mechanical properties of fibre bundles were characterized by micro-tensile tests. As shown on figure II. 25A, the fibre bundle diameters selected for each batch were approximately between 100-240 µm with a median value at about 160 µm so that it was possible to compare in relative the results of micro-tensile tests. Figure II. 25A, B, C and D present the tensile properties (tensile strength, Young's modulus and strain at failure) of fibre bundles extracted at the different growth stages and retted at different times.

As concerns the influence of the growth stage, it can be observed an increase of all mechanical characteristics (considering median values) with the plant growth. Indeed the tensile strength increased from 174MPa for the R0BF to 331 MPa for ROEF, and then gained up 352 MPa for R0SM. Fibres harvested at BF (R0BF) have a lower tensile strength than that of the fibres harvested at EF and SM period, while no significant difference ($p>0.05$) is observed between ROEF and R0SM. The Young's modulus increased significantly from 8 GPa for R0BF to 13 GPa for ROEF and R0SM. Similar trend is observed for strain at break. It increased significantly from 2.4% to 3.2% and 3.4% for fibres harvested at BF, EF and SM period, respectively. According to these results, it can be concluded that the main improvement of tensile properties occurs between the fibres extracted at the end of flowering (ROEF) and the beginning of flowering (ROEF), as just a slight increase was observed for fibres collected at the seed maturity period (R0SM). This change in tensile properties during plant growth might be due to the variation in biochemical composition, fibres morphology and fibres extraction. Indeed, the increase of cellulose fraction with growth stage could be played a key role in increasing of mechanical performance [6,23]. Moreover, Goudenhoft et al. [10] highlighted that the morphology of the fibres could also impact the mechanical performance. They reported an increase of mechanical properties of flax fibres during plant development. Another explication could be attributed to the fibres damage by the manual decortication of the fibres from the stems. It was visually noticed that the hand extraction of the fibres after removing of the epidermis was easier for fibres collected at EF and SM period compared to BF. This means that there was less generation of micro-defects during extraction of the fibres harvested at EF and SM. Keller et al. [9] reported that a harvest at seed maturity lead to easier decortication and high tensile strength of hemp fibres.

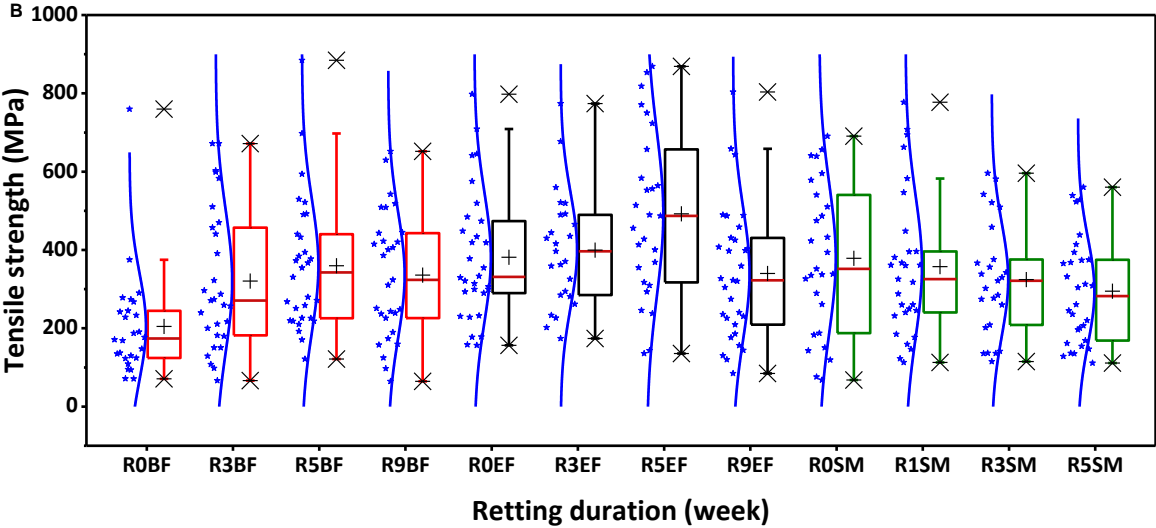
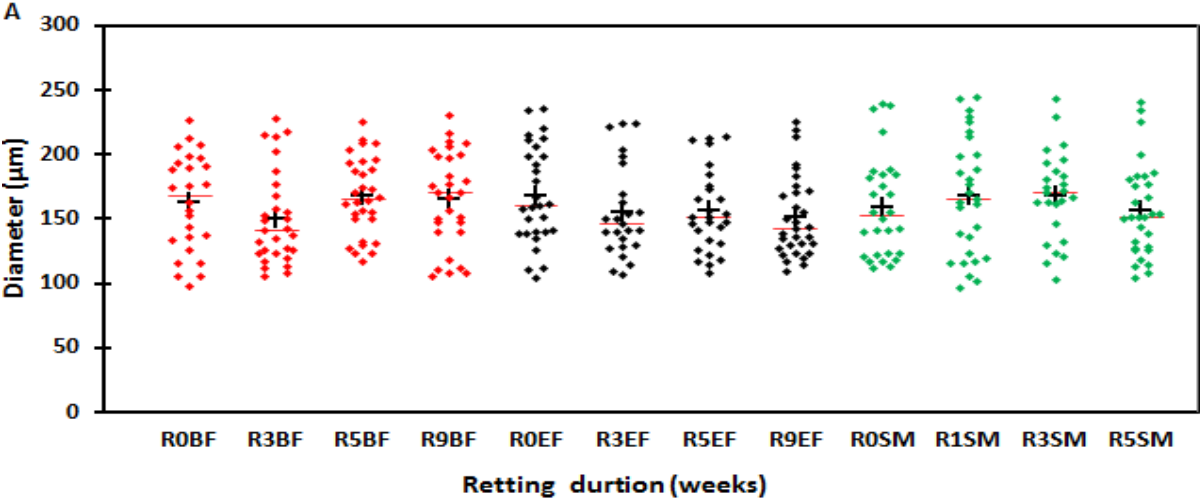
Besides of this comparison of tensile properties of the initial state of the fibres after BF, EF and SM harvest period, a variation in mechanical performance during field retting of hemp fibres was also observed for these selected growth stage. The tensile strength of fibres harvested at BF increased gradually, from 174 MPa for unretted fibres (R0BF) to 342 MPa for 5 weeks of retting (R5BF), then decreased slight to 324 MPa after a prolonged field retting of 9 weeks (R9BF). The Young's modulus of retted fibres increased ($p < 0.05$) to 12 GPa compared to that of unretted fibres (8 GPa). The strain at failure increased significantly ($p < 0.01$) from 2.4% for unretted fibres (R0BF) to 2.8%, 3.4%, and 3.3% for retted hemp fibres R3BF, R5BF and R9BF, respectively.

The trend evolution of tensile properties of the fibres harvested at EF is identical to those of BF, although some interesting differences are noted. In particular, the fibres harvested at EF exhibited higher mechanical properties during retting. The tensile strength, Young's modulus and strain at failure of fibres harvested at EF increased, respectively, from 331 MPa, 13 GPa and 3.2% for R0EF to 487 MPa, 17 GPa and 3.4% for R5EF and then decreased significantly to 323 MPa, 13 GPa and 2.8%, respectively, for R9EF. As concern the results of the fibres harvested at SM, no significant difference can be noticed for the tensile strength, even though, it tended to decrease from 352 MPa for R0SM to 282 MPa for R5SM. No apparent change could be observed for Young's modulus, contrary of the strain of failure that decreased gradually and significantly from 3.5% for R0SM to 2.4% for R5SM. Whatever the plant growth stage, a maximum of tensile properties is reached and then reduced with an extended of field retting.

During field retting of all examined harvest periods, the cellulose fraction and the cellulose chain packing order were improved due to the removal of non-cellulosic materials, which could bring better tensile performances [6][39][40][41]. However, since hemp fibres can be seen as a natural composite of cellulose microfibril and matrix of non-cellulosic components, the mechanical properties are not only governed by cellulose and crystallinity index, but also by the coherence between the cellulose and non-cellulosic components [49]. Therefore, a high degradation of non-cellulosic components with extended retting duration (over-field retting), might override the influence of increased of cellulose and crystallinity and thereby results in lower tensile properties. In addition, generally, with increasing of retting duration, the cementing compounds that bind different parts of the stem were gradually removed by microorganisms. This allows an easier hand separation of the bast fibres from the ligneous shives and limits the engendering of the micro-defects in the fibres.

These results clearly indicate that the mechanical properties of the hemp fibres depend on the plant growth period and the retting duration which is governed by the weather conditions. The retting periods of fibres harvested at BF and EF was long because they were carried out under dry weather conditions, contrary to the retting period of fibres harvested at SM that performed under rainy weather conditions. Therefore, a long period (5 weeks) is required for getting the highest mechanical properties of fibres harvested at BF and EF. However, the retting of fibres harvested at SM has to be done in a short period (around 1 week) in order to avoid over-retting treatment. In a recent work, Placet et al. [50], compared three times (10, 39 and 75 days) of field retting of hemp fibres, and found that the mechanical properties of single hemp fibres increased at early stage and then decreased

with prolonged field retting. Liu et al. [13] also showed that a negative effect of field retting occurred with extended retting duration due to the accelerated degradation of cellulose by microorganisms. To this end, according to the results obtained in this study, in order to avoid an under- and over-retting treatment, it would be judicious to choose the end of flowering period for both reasons i) the tensile properties of the initial state of the fibres after harvesting were high ii) the retting period coincide with two seasons (summer and autumn) which allow to master retting mechanisms.



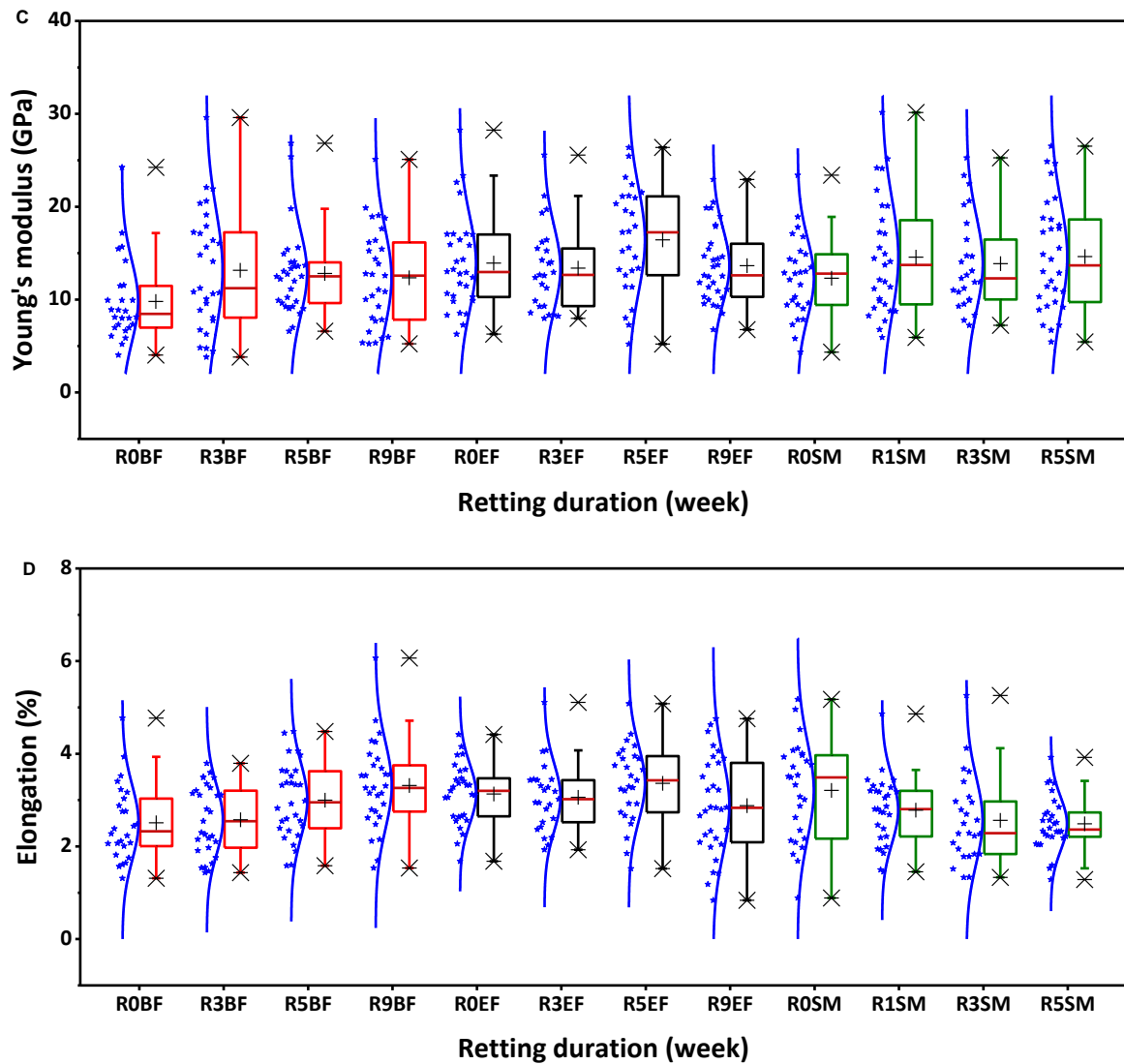


Figure II.25. Scattegram of measured bundle fibres diameters for each batch (A) ; Box plots of tensile strength (B), young modulus (C) , and stain at break (D) for unretted and retted fibres harvested at BF, EF and SM. The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively

4. Conclusions

A comparison of the effect of field retting duration on the properties of the hemp fibres harvested at different growth stages (beginning of flowering, end of flowering, and seed maturity) was examined in this work. The retting of these periods was performed under different weather conditions.

The fibres harvested at BF and EF, showed a similar evolution in color change, from light green for unretted samples (R0), yellow for low retted samples (R1 to R3), yellow with the presence of grey fibres for medium retted samples (R4 and R5) and grey for highly retted samples (R9). However, for seed maturity (SM) period, the color transition from yellow to

dark grey was rapid (3 weeks). This color change is related to weather conditions and the development of microorganisms at surface stem (ESEM images).

TGA, biochemical and XRD measurements showed an increase of cellulose fraction and its degree of crystallinity during retting for all examined harvest periods. Nonetheless, the kinetic of this variation is not identical during retting of each examined harvest periods, since each harvest period was field retted with specific climatic conditions. Furthermore, during plant development, the cellulose fraction was increased (e.g. from 68% for ROEF to 70% for ROSM) with a removal of non-cellulosic materials. The increase of cellulose during retting led to a progressive improvement in thermal stability. The fibres harvested at SM exhibit a better thermal stability compared to that of the fibres harvested at BF and EF, due to the high cellulose fraction present in the fibres at plant maturity. The change in biochemical composition, especially degradation of cementing components (e.g. pectins and lipids) during retting led to remove epidermal and parenchyma cells, resulting in a separation of bundle of fibres to individual elementary fibres.

The tensile properties increased during retting of fibres harvested at BF and EF to a threshold value (after 5 weeks) and decreased at the end of retting. As concern the fibres harvested at SM, the stems were started to be slightly retted before even harvesting, thus under very rainy retting period, the tensile properties decreased progressively and slightly. The increase of the cellulose fraction and the cellulose chain packing order allow bringing better tensile performances of the fibres before reaching an over-retting. When non-cellulosic materials are high degraded, the coherence between the cellulose microfibrils and non-cellulosic matrix becomes weaker and thereby results in lower tensile properties.

Then, in order to avoid an under- and over-retting treatment, it seems to be judicious to control both criteria: initial intrinsic characteristics of the fibres at the harvesting period and during retting process as retting kinetics are closely linked with climatic conditions. From all these data, reliable tools could be provided for farmers in order to better manage the retting process.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the “CIVAM Chanvre Gardois (Bouquet, France)” for making available for us a plot of land to conduct this study.

References

- [1] Duval A, Bourmaud A, Augier L, Baley C. Influence of the sampling area of the stem on the mechanical properties of hemp fibers. *Mater Lett* 2011;65:797–800.
- [2] Bourmaud A, Beaugrand J, Shah DU, Placet V, Baley C. Towards the design of high-performance plant fibre composites: How can we best define the diversity and specificities of plant cell walls? *Prog Mater Sci* 2018;97:347–408.
- [3] Islam MS, Kim L P, Nic J F. Influence of Alkali Fiber Treatment and Fiber Processing on the Mechanical Properties of Hemp/Epoxy Composites. *J Appl Polym Sci* 2010;21:449–56.
- [4] Stamboulis A, Baillie CA, Peijs T. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. *Compos. Part A* 2001;32:1105–1115.
- [5] Aziz SH, Ansell MP. The effect of alkalization and fibre alignment on the mechanical and thermal properties of kenaf and hemp bast fibre composites : Part 1 – polyester resin matrix 2004;64:1219–30.
- [6] Marrot L, Lefeuvre A, Pontoire B, Bourmaud A, Baley C. Analysis of the hemp fiber mechanical properties and their scattering (Fedora 17). *Ind Crops Prod* 2013;51:317–27.
- [7] Van der Werf HMG, Wijlhuizen M, de Schutter JAA. Plant density and self-thinning affect yield and quality of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *F Crop Res* 1995;40:153–64.
- [8] Mediavilla V, Jonquera M, Schmid-slembrouck I. Decimal code for growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L .). *Ind Crops Prod* 1998;5:68–74.
- [9] Keller A, Leupin M, Mediavilla V, Wintermantel E. Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. *Ind Crops Prod* 2001;13:35–48.
- [10] Goudenhoofft C, Siniscalco D, Arnould O, Bourmaud A, Sire O, Gorshkova T, Baley C. Investigation of the Mechanical Properties of Flax Cell Walls during Plant Development: The Relation between Performance and Cell Wall Structure. *Fibers* 2018;6:6.
- [11] Martin N, Mouret N, Davies P, Baley C. Influence of the degree of retting of flax fibers on the tensile properties of single fibers and short fiber/polypropylene composites. *Ind Crops Prod* 2013;49:755–67.
- [12] Placet V, Day A, Beaugrand J. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. *J Mater Sci* 2017;52:5759–77.
- [13] Liu M, Fernando D, Daniel G, Madsen B, Meyer AS, Ale MT, Thygesen A. Effect of harvest time and field retting duration on the chemical composition, morphology and mechanical properties of hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;69:29–39.

- [14] Hearle JW. The Fine Structure of Fibers and Crystalline. *J Appl Polym Sci* 1963;7:1175–92.
- [15] Crônier D, Monties B, Chabbert BR. Structure and Chemical Composition of Bast Fibers Isolated from Developing Hemp Stem. *J Agric Food Chem* 2005;53:8279–89.
- [16] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Analysis of green hemp fibre reinforced composites using bag retting and white rot fungal treatments. *Ind Crops Prod* 2009;29:420–6.
- [17] Sisti L, Totaro G, Vannini M, Fabbri P, Kalia S, Zatta A. Evaluation of the retting process as a pre-treatment of vegetable fibers for the preparation of high-performance polymer biocomposites. *Ind Crops Prod* 2016;81:56–65.
- [18] Tahir P, Ahmed AB, SaifulAzry SO a, Ahmed Z. Retting process of some bast plant fibres and its effect on fibre quality: A review. *BioResources* 2011;6:5260–81.
- [19] Bacci L, Di Lonardo S, Albanese L, Mastromei G, Perito B. Effect of different extraction methods on fiber quality of nettle (*Urtica dioica* L.). *Text Res J* 2011;81:827–37.
- [20] Akin DE, Condon B, Sohn M, Foulk JA, Dodd RB, Rigsby LL. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase 2007;25:136–46.
- [21] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, Eriksson L KE. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and europe. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3950–6.
- [22] Mazian B, Bergeret A, Benezet J-C, Malhautier L. Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering. *Ind Crops Prod* 2018;116:170–81.
- [23] Charlet K, Baley C, Morvan C, Jernot JP, Gomina M, Bréard J. Characteristics of Hermès flax fibres as a function of their location in the stem and properties of the derived unidirectional composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2007;38:1912–21.
- [24] Liu M, Fernando D, Meyer AS, Madsen B, Daniel G, Thygesen A. Characterization and biological depectinization of hemp fibers originating from different stem sections. *Ind Crops Prod* 2015;76:880–91.
- [25] Hörtensteiner S. The loss of green color during chlorophyll degradation - A prerequisite to prevent cell death? *Planta* 2004;219:191–4.
- [26] Merzlyak MN, Gitelson A. Why and What for the Leaves Are Yellow in Autumn? On the Interpretation of Optical Spectra of Senescing Leaves (*Acerplatanoides* L.). *J Plant Physiol* 1995;145:315–20.
- [27] Matile P. Biochemistry of Indian summer: Physiology of autumnal leaf coloration. *Exp Gerontol* 2000;35:145–58.
- [28] Pallesen BE. The quality of combine-harvested fibre flax for industrials purposes depends on the degree of retting 1996;5:65–78.
- [29] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J, Spadoni JL, Mangin I. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol*

2015:4471–84.

- [30] Liu M, Ale MT, Kołaczkowski B, Fernando D, Daniel G, Meyer AS, Thygesen A. Comparison of traditional field retting and *Phlebia radiata* Cel 26 retting of hemp fibres for fibre-reinforced composites. *AMB Express* 2017;7.
- [31] Bleuze L, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chabbert B. *Industrial Crops & Products* Tracking the dynamics of hemp dew retting under controlled environmental conditions. *Ind Crop Prod* 2018;123:55–63.
- [32] Nykter M, Kyma H, Belinda A, Lilholt H, Thygesen A. Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) 2008;32:392–9.
- [33] Meijer WJM, Vertregt N, Rutgers B, van de Waart M. The pectin content as a measure of the retting and rettability of flax. *Ind Crops Prod* 1995;4:273–84.
- [34] Musialak M, Wróbel-Kwiatkowska M, Kulma A, Starzycka E, Szopa J. Improving retting of fibre through genetic modification of flax to express pectinases. *Transgenic Res* 2008;17:133–47.
- [35] Foulk JA, Akin DE, Dodd RB. Processing techniques for improving enzyme-retting of flax. *Ind Crops Prod* 2001;13:239–48.
- [36] Tserki V, Zafeiropoulos NE, Simon F, Panayiotou C. A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2005;36:1110–8.
- [37] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Determination of interfacial shear strength of white rot fungi treated hemp fibre reinforced polypropylene. *Compos Sci Technol* 2009;69:1165–71.
- [38] Zafeiropoulos NE, Baillie CA, Matthews FL. Study of transcrystallinity and its effect on the interface in flax fibre reinforced composite materials. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2001;32:525–43.
- [39] Bledzki A, Gassan J. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog Polym Sci* 1999;24:221–74.
- [40] Placet V, Trivaudey F, Cisse O, Gucheret-Retel V, Boubakar ML. Diameter dependence of the apparent tensile modulus of hemp fibres: A morphological, structural or ultrastructural effect? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2012;43:275–87.
- [41] Sawpan MA, Pickering KL, Fernyhough A. Effect of various chemical treatments on the fibre structure and tensile properties of industrial hemp fibres. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2011;42:888–95.
- [42] Ghetti P, Ricca L, Angelini L. Thermal analysis of biomass and corresponding pyrolysis products. *Fuel* 1996;75:565–73.
- [43] Ouajai S, Shanks RA. Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments. *Polym Degrad Stab* 2005;89:327–35.

- [44] Kabir MM, Wang H, Lau KT, Cardona F. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. *Appl Surf Sci* 2013;276:13–23.
- [45] Manikandan Nair KC, Thomas S, Groeninckx G. Thermal and dynamic mechanical analysis of polystyrene composites reinforced with short sisal fibres. *Compos Sci Technol* 2001;61:2519–29.
- [46] Tanja Schäfer BH. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (*Cannabis sativa* L.) 2006;23:88–98.
- [47] Réquillé S, Goudenhoft C, Bourmaud A, Le Duigou A, Baley C. Exploring the link between flexural behaviour of hemp and flax stems and fibre stiffness. *Ind Crops Prod* 2018;113:179–86.
- [48] Mediavilla V, Leupin M, Keller A. Influence of the growth stage of industrial hemp on the yield formation in relation to certain fibre quality traits. *Ind Crops Prod* 2001;13:49–56.
- [49] Bourmaud A, Morvan C, Bouali A, Placet V, Perré P, Baley C. Relationships between micro-fibrillar angle, mechanical properties and biochemical composition of flax fibers. *Ind Crops Prod* 2013;44:343–51.
- [50] Placet V, François C, Day A, Beaugrand J, Ouagne P. Industrial Hemp Transformation for Composite Applications: Influence of Processing Parameters on the Fibre Properties. *Adv Nat Fibre Compos* 2018:13–25.

CHAPITRE III

**ETUDE DE LA DYNAMIQUE TEMPORELLE DES
EMISSIONS DE COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS
(COV) ET DES EMISSIONS ODORANTES PAR LES TIGES
DE CHANVRE LORS DU ROUISSAGE EN CHAMP**

Introduction du chapitre

Dans l'industrie du chanvre, le rouissage est un traitement amont appliqué aux plantes afin de faciliter la décortication des fibres de la partie ligneuse centrale de la tige. Ce traitement est actuellement réalisé de manière empirique au champ ce qui entraîne une variabilité de la qualité des fibres de chanvre (couleur, morphologie, composition biochimique, propriétés thermiques et mécaniques). Par conséquent, le contrôle de ce traitement est une étape cruciale pour obtenir des fibres de chanvre qui peuvent être utilisées pour la fabrication de biocomposites de hautes performances. Le chapitre précédent a permis de caractériser les fibres pendant le rouissage en étudiant l'impact de paramètres tels que la période de récolte ou les conditions climatiques (faible taux d'humidité et forte amplitude de température) sur le rouissage des fibres de chanvre. L'influence de ces paramètres a été examinée en se basant sur différentes techniques de caractérisation des fibres végétales telles que la couleur, la composition biochimique, la microstructure, la résistance thermique et les propriétés mécaniques. Ces techniques restent cependant délicates à mettre en œuvre.

Une autre voie pour caractériser le comportement des tiges pendant le rouissage consisterait à examiner la dynamique temporelle des émissions de composés organiques volatils ou COV et d'odeurs par les tiges de chanvre. Pour cela, différents prélèvements en champ ont été effectués pendant le rouissage pour deux périodes de récolte différentes (fin de floraison et période de semence). Des analyses de COV ont été réalisées en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les analyses sensorielles ont été également réalisées et la qualité de l'odeur a été plus particulièrement examinée. Les résultats montrent qu'indépendamment de la période de récolte, les concentrations de COV émis diminuent progressivement et que certaines familles (alcools, aldéhydes) ne sont plus identifiées à la fin du rouissage. De plus, concernant la qualité de l'odeur, l'odeur de plante verte dominante au début du rouissage disparaît alors que l'émergence d'une odeur de plantes sèches et d'une odeur en lien avec la fermentation est observée en fin du rouissage. De ce fait, ce premier travail montre que ce critère pourrait être pris en compte dans la mise en place d'indicateurs du degré de rouissage de ces fibres de chanvre par les agriculteurs dans une démarche d'optimisation des performances de biocomposites renforcés par des fibres de chanvre.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise à *Journal of Chromatography A*.

Evolution of temporal dynamic of Volatile Organic Compounds (VOCs) and odors of hemp stem during field retting

Brahim Mazian^{1,2}, Stéphane Cariou¹, Mathilde Chaignaud³, Jean-Louis Fanlo^{1,3}, Anne Bergeret², Luc Malhautier^{1*}

¹Laboratoire du Génie de l'Environnement Industriel, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

²Centre des Matériaux des Mines d'Alès, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

³Olentica sas, 14 boulevard Charles Peguy, 30100 Alès, France

Abstract

In the hemp industry, retting is an upstream processing applied to the plants in order to facilitate the decortication of fibres from the central woody part of the stem. This treatment is currently carried out in an empirical way in the fields that leads to variability in the quality of the hemp stems, and thus to the hemp fibres quality (color, morphology, biochemical composition, thermal and mechanical properties). Therefore, controlling retting treatment is a crucial step for having hemp fibre intended for the development of high-performance hemp biocomposites. In this study, a new approach is used to assess the retting degree by following the evolution of VOCs emitted by plants during different retting durations. Either harvest time or retting induces a change in VOCs evolved by plants. During plant maturity, VOCs compounds emitted decreased with a factor of about 2, in relation to VOCs evolved at the end of flowering. Regardless the harvest period, the majority of COVs and odor concentrations decrease gradually until some of them disappear at the end of retting. Likewise, the green plant odor disappears during retting with an increase of dry plants one and an appearance of fermented odor at the end of retting. The rate of decomposition of VOCs and odor change could be used as indicators for retting degree before passing to the fibers extraction steps.

1. Introduction

The recent consideration of environmental and economic factors in the development of materials pushes manufacturers to develop new materials with less impact on the environment and for which the costs of raw materials and manufacturing are moderate. The use of renewable resources, such as lignocellulosic fibres as reinforcements in polymeric materials forming bio-based composites provides an answer to these environmental and economic constraints [1]. In addition to their availability, these fibres also have advantages directly related to their intrinsic properties such as density [2], biodegradability [3,4], high specific mechanical properties [5–7], and indirectly, the cost of manufacturing bio-based composite materials.

Plant fibres issued from hemp (*cannabis sativa L*) are part of these attractive lignocellulosic fibres which could be used in the production of bio-based materials by replacing the conventional fibres (e.g. glass and synthetic fibres). However, any deviation of the quality of these fibres is observed in term of morphology, physico-chemical properties which results in heterogeneous mechanical properties of the fibres. Therefore, this is an important impediment to the use of these fibres in structural application when high consistency and homogeneity are required [4].

In order to extract the hemp fibres from woody core of the stems, the traditional separation and extraction process called retting is performed in the hemp industry. This treatment is among of the factors that affects the final quality of hemp fibres [8–12]. In Europe, the field retting (also known as dew-retting) is the most widely used treatment after the prohibition of water-retting due to the water pollution by stem fermentation products. The field retting consists to spread out hemp plants on the ground for a duration ranging from a few days to several weeks. This treatment is currently performed in an empirical way in the field due to its dependence on environmental conditions. Indeed, during field retting the plants are exposed to stress factors. Biotic stress is caused by living organisms. The microorganisms (fungi and bacteria) attack the plants producing a range of polysaccharide-degrading enzymes, especially pectinolytic which remove the components in the middle lamella region surrounding the fibres [13–15]. Conversely, the abiotic stress is caused by the change in environmental conditions, such as temperature, humidity, salinity, light. The plants have self- defense mechanisms to struggle against these stress and threats. Indeed, the plant release odor and volatile organic compounds (VOCs) for plant-plant communication and in

order to reduce biotic and abiotic stress [16–26]. On the other hand, the microorganisms have the capacity to use some VOCs emitted by plants as carbon and energy source [27–30]. Depending on plant situation during growth and retting, emitted odor and VOCs would differ. Thus, following these plant characteristics would give some data about the retting level progress.

Several methods in literature have been done to evaluate the degree of retting based on biochemical composition, microbial community colonization, stem peeling and morphology [9,31–33]. However, these methods are not rapid and destructive. Therefore, this paper attempts to use a new non-destructive approach to evaluate the degree of retting treatment based on the odor and VOCs emitted by plants during different retting times for the stems harvested at end of flowering and seed maturity. The VOCs composition and concentration were identified and measured using Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis and the odor evaluation in term of persistency, acceptability and quality were performed using olfactometric analyses.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

2.1.1. Cultivation and sampling

Hemp (*Cannabis sativa L.*, Cultivar ‘Santhica 27’) was sown at a rate of 30kg/ha on 10th May, 2017 in the south of France (N 44.130673°, E 4.315895°) by CIVAM Chanvre gardois (Le Bouquet, France). The hemp plants were harvested manually at the end of flowering (EF) (21th august, 2017), and at the seed maturity (SM) (26th September, 2017) (figure III.1). The stems length during EF and SM are 1.56 and 1.58m, respectively. After each harvest period, the plants were left in the field for retting, and then a weekly collection of retted stems was performed. Table III.1 gives the retting times and corresponding collected samples for each selected growth stage. Plants harvested were turned regularly (once a week) on the ground to homogenize the retting of the stems.

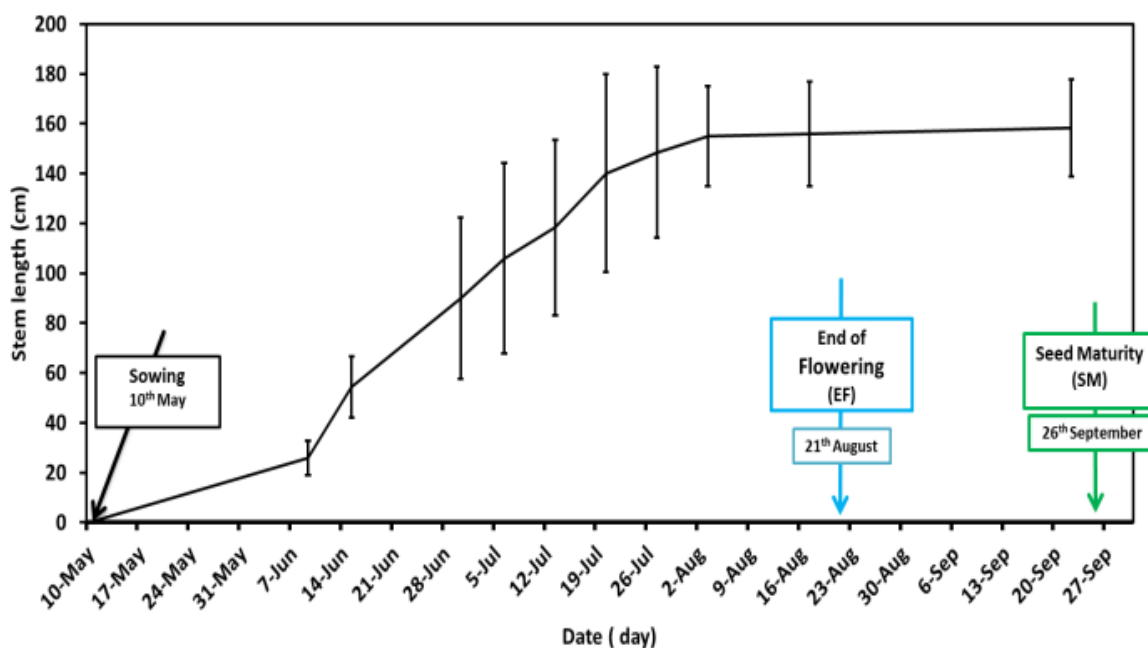


Figure III.1. Hemp plant growth (May 10th, 2017)

Table III.1. Name of samples collected during different retting times

Retting time (day)	0	7	14	21	28	35	42	49	63	77
Retting time (week)	0	1	2	3	4	5	6	7	9	11
Samples name	ROEF ROSM	R1EF R1SM	R2EF R2SM	R3EF R3SM	R4EF R4SM	R5EF R5SM	- R6SM	R7EF -	R9EF R9SM	R11EF -

2.1.2. Weather conditions

The temperature and the relative humidity were recorded during retting of the stems collected at the end of flowering and the period of seed maturity. This monitoring was performed using hygro-buttons sensors (Progesplus, Carquefou, France) which are put in contact with the soil. In addition, daily average precipitation data were acquired from Météo France (meteorological station Méjannes-le-Clap, France). Figure III.2 highlights the weather conditions during retting of both selected harvest periods during the 2017-campaign.

During retting of the stems harvested at EF, the weather was hot, except for the two last weeks of treatment. Indeed, the average maximum and minimum temperatures between the 1st week and the 9th week are 40.2°C and 17.5°C, respectively, while both decreased to 26.3°C and 7.1°C, respectively during two last weeks of this period. As concerns the retting

period of the stems harvested at SM, the temperature profile differs from that observed during the retting of stems harvested at EF. The average maximum and minimum temperatures between the 1st week and the 7th week are 31.8°C and 8.6°C, respectively, while, they decreased to 17.7°C and 2.6°C, respectively during the last weeks of this period. The rainfall was low during retting for both harvest periods and the relative humidity is not homogenously distributed during retting periods.

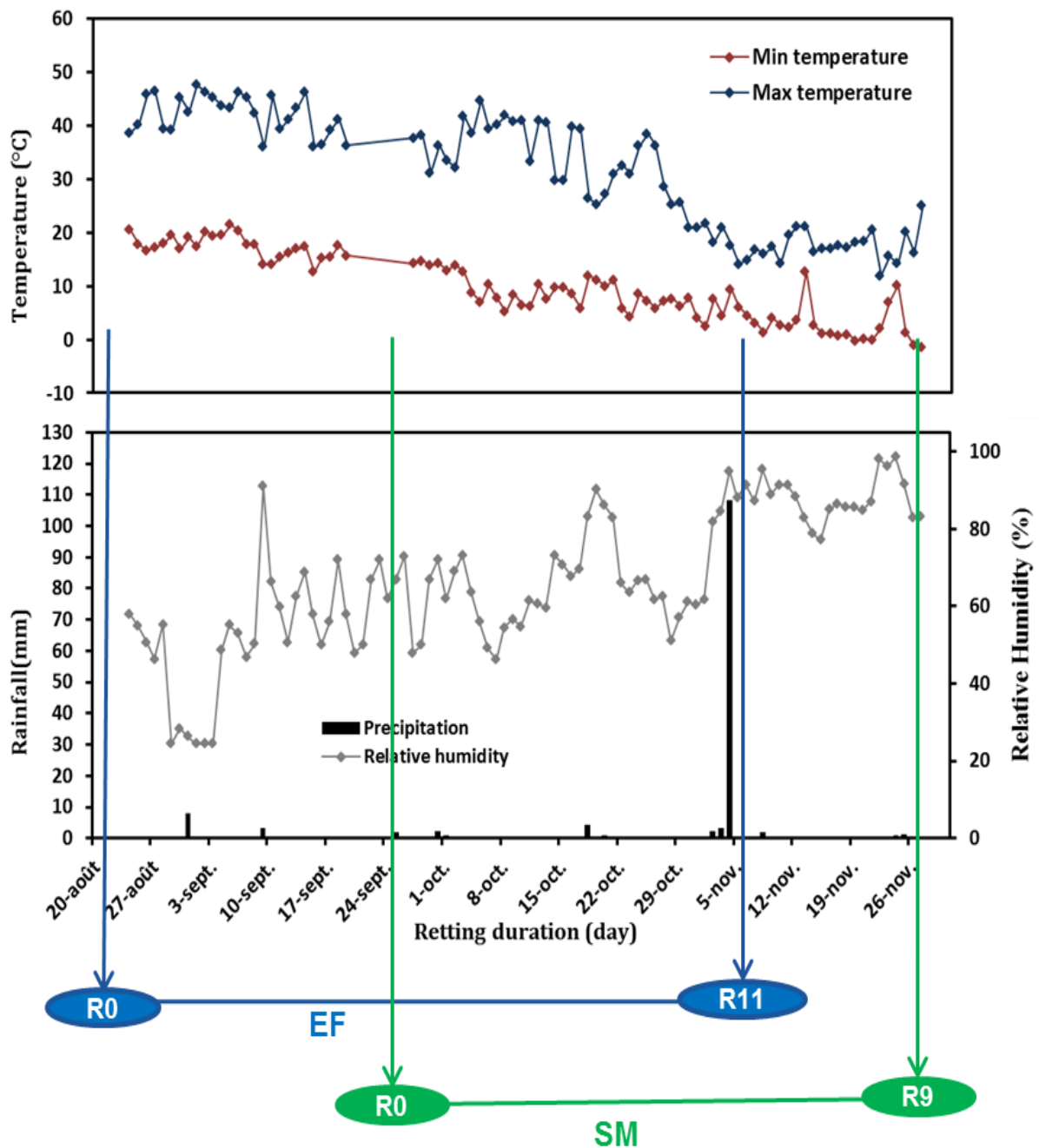


Figure III.2. Daily weather conditions (minimum and maximum temperatures, relative humidity and precipitation) during retting of stems harvested at EF and SM

2.2. Experimental methods

2.2.1. Color

The color change of the stems collected from different retting durations for each harvest period (end of flowering and seed maturity) was visually evaluated.

2.2.2. TD-GC-MS analyses

Prior to GC-MS analyses, 100g of stems that were sampled at each retting time were introduced in Nalophan® bags (figure III.3) and subsequently the 40L of dry compressed air was used to fill the bags. In order to reach the VOC equilibrium (figure III.4), the Nalophan® bags were preserved 3 days in clean environment and not exposed to thermal sudden changes before sampling and analyzing air. At the end of the conditioning period the effluent air from the Nalophan® bags was sampled on a multi-bed sorbent tube containing Carboxen® 569 (100 mg, 20-45 mesh, Supelco) and Tenax® TA (100mg, 60-80 mesh, Supelco). The air was sampled for 20 min at a 100 NmL/min flow rate with a pump (KNF) coupled with a mass-flow-controller (5850 TR, Brooks). The chromatographic analyses were carried out by a thermodesorption unit (Turbomatrix, Perkin Elmer, USA), coupled with a gas chromatograph (Trace GC, Thermo Scientific, USA) and a mass spectrometer (DSQ2 model, Thermo Scientific, USA). The analytical column was an Optima 5-ms Accent 60 m x 0.25 mm x 1 µm. Helium was used as carrier gas at 1.5 mL/min in constant flow mode. The GC oven temperature program was set as followed: 9 min at 40°C, a ramp at 15°C/min until 90°C, 4 min at 90°C then a ramp at 10°C/min until 250°C and finally 5 min at 250°C. The ionization of compounds was made by electronic impact at 70 eV. The full scan mode was used to analyze fragments from 20 to 250 amu (atomic mass unit). Compounds identification was led by comparison of our spectra with those referenced in the NIST library. The system was calibrated with toluene.



Figure III.3. Example of prepared Nalophan® bags

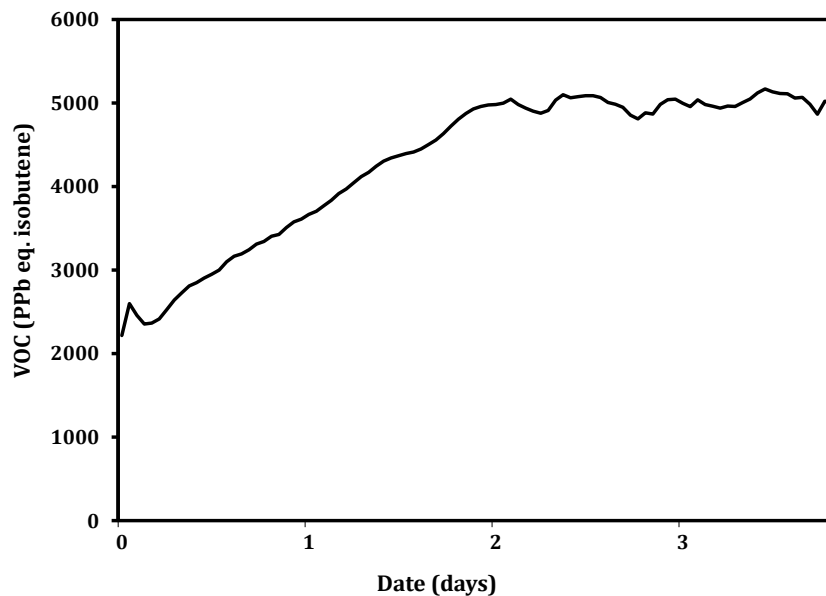


Figure III.4. VOC equilibrium in Nalophan® bags by using ppbRAE 3000 (RAE Systems Inc)

2.2.3. Olfactometric analyses

After each harvesting period, odor concentration of the samples was measured according EN 13725 standard using a dynamic dilution olfactometer ODILE (Odotech Inc., Canada). The tests were carried out inside an odor-free, clean laboratory with selected and trained panelists. Each sample was diluted in the olfactometer several times differing from each other by a factor of 1.58 and presented to the panelist three times. The olfactometer is a computer controlled semi-automatic instrument with six panel member places and computes the odor concentration by means of a special computer program based on the perception response data of panelists. This method employs a “presence or non-presence of odor” technique and determines how many times a sample must be diluted with odor-free air to be at the threshold of detection by 50% of the panel. At this instance the number of required dilution defines the odor concentration in odor units per cubic meter ($OU_E m^{-3}$).

After the determination of odor concertation, the odor acceptability was evaluated using the method developed by Olentica company [34]: i) determination of the dilution level for which all members of the panel perceive odor; ii) evaluation of odor acceptability at this level of dilution, on a closed scale ranging from -5 to +5 (-5 = very unpleasant odor, 0 = neutral odor, 5 = very pleasant odor). iii) Repetition of step 2 in three lower levels of dilution. iv) calculation of the median acceptability level for each dilution. v) Plotting of acceptability levels vs dilution levels.

2.2.4. Odor intensity and quality

Both intensity and quality of the odor of the stems sampled at different retting duration were determined using an oriented approach by an expert of Olentica Company (Ales, France).

The odor intensity was determined using the evaluation given by jurors of the strength of the odor on a discrete scale from 0 to 5 (table III.2). The results of all the jurors are collected and an average value of the intensity is calculated.

Table III.2: Odor intensity assessment

Intensity level	Meaning
0	Odourless / Neutral
1	Very low odour
2	Slight odour
3	Medium odour
4	Strong odour
5	Very strong odour

The odor quality was determined after the evaluation of the olfactory profile of each odor. Indeed, panelists describe the smell of the stems using their own vocabulary. Each tone perceived by juror is prioritized: 5 points are automatically assigned to the main tone or tones. Secondary tones are rated on a scale of 1 to 4. After this stage, the olfactory descriptors provided by all the panelists are grouped into odor classes. The odor classes used are chosen according to an odor wheel. Different descriptors of stem odor after harvest periods and during retting are grouped into these odor classes: dry plants, green plants, pungent, fresh, soft, wooded, fermented, mold, humus, and mushroom.

3. Results and discussion

3.1. Color change

The visual assessment of the color has been performed for the stems harvested at the end of flowering and at the seed maturity and retted at different durations. As can be observed in the photograph (figure III.5), the color changes with plant development and also during dew-retting. The color of the unretted stems collected at EF was light green, while unretted stems harvested at SM were transformed to yellow. This ranging of color from green to yellow after maturity is presumably due to the degradation of plant pigment due to photodegradation, biodegradation, and microbial colonization. Indeed, the chlorophyll that is responsible of green color was decomposed with the partial retention of carotenoids that emit yellow color [35–37].

During retting of hemp stems harvested at EF, the color ranges from light green for unretted stems (R0EF), to yellow for low retted stems (R1EF to R3EF), to yellow with the presence of black spots at medium retted stems (R4EF and R5EF) and to black for highly retted stems (R9EF and R11EF). In contrast, for the samples harvested at SM, the color only changes from yellow (R0SM) to a gradual appearance emergence of black spots at retted stems surface (R4SM, R6SM and R9SM). The retting performed with stems harvested at EF and SM was carried out under dry weather conditions. Therefore, slow and gradual color transition is observed for both periods. This variation of color is related to biotic and abiotic factors that interact with one another during field retting. The color change of the stems from yellow to black is attributed to the colonization of microbial communities (fungal and bacteria [33,38] of the stems surface). Indeed, the appearance of black spots on the stems surface increase is associated to the development of microbial communities [9,39–41]. This color transition is typical during field retting, even for other natural plant like flax [8,42].

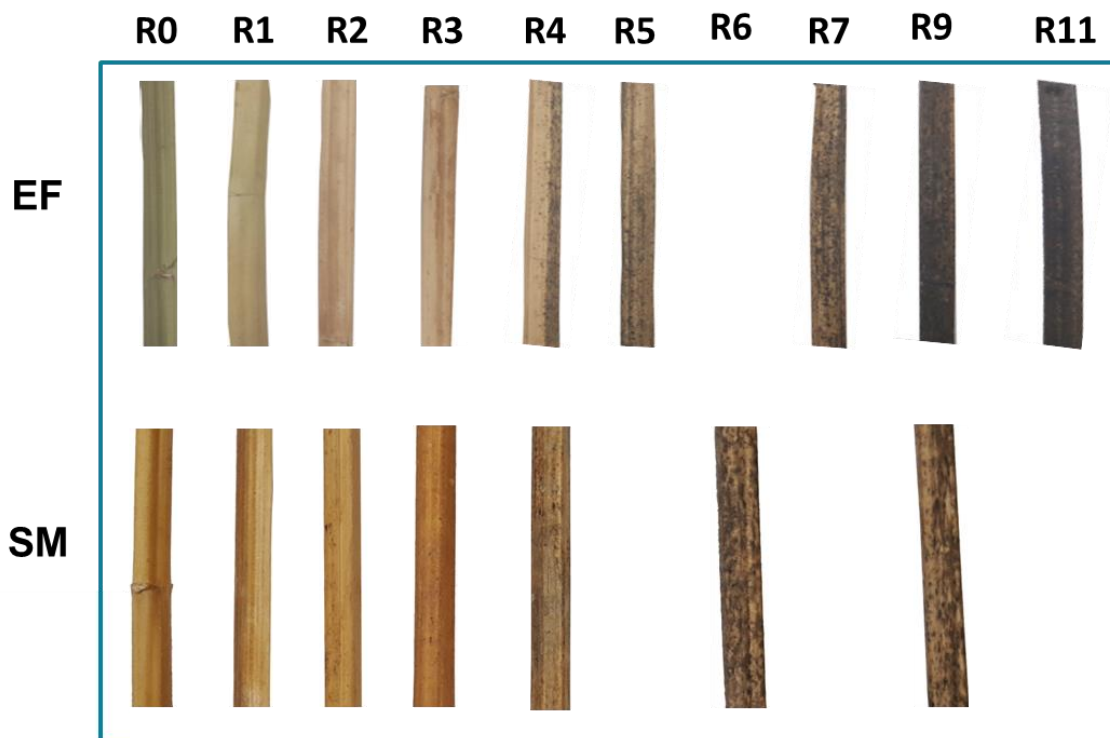


Figure III.5. Photograph of color changes of the stems during retting of hemp harvested at different periods (EF and SM)

3.2. VOCs identification and quantification

Firstly, the evolution of VOCs composition during growth hemp plants was analyzed. Table III.3 gives the list of identified chromatographic peaks and their concentrations. In both sampling periods (EF and SM) the odorous emissions from the stems collected at different plant development contained several compounds. 75 and 69 VOCs were identified from the stems harvested at the end of flowering and seed maturity respectively. The measured VOCs were ordered as chemical families such as terpenes (e.g. α -pinene, β -pinene), alcohols (e.g. methanol, hexanol), aldehydes (e.g. acetaldehyde, hexanal), monoaromatics (e.g. benzene, toluene), ketones (e.g. 2-butanone, acetone), esters (e.g. methylacetate), ethers (e.g. 2-ethylfuran, eucalyptol), alkanes (e.g. pentane, tetradecane), acids (e.g. isobutyric acid) and alkenes (e.g. 2, 4-dimethylheptene). Many of these compounds were already detected from the emission pattern of the *cannabis sativa L* plant species [43,44], and also in many different plant tissues and physiological processes [45]. Plants are known to release airborne VOCs to attract pollinators and seed dispersers and to prevent herbivores' and pathogens' attacks. In a way, they act as a kind of language for plants [46]. For example, it is well-known that terpenes act as defense compounds against pathogens and herbivores [47–

49], and as well protect plant membrane against high temperatures or the alteration of flowering in nearby plants [24,45,50,51]. Conversely, some of VOCs may act also as a carbon source for microorganisms. Indeed, the microbial community is able to use VOCs as a carbon or energy source [27–30].

As it can be observed in figure III.6, the most abundant chemical family in the stems harvested at the end of flowering was terpenes with 60% of total VOCs concentrations, followed by alcohols (17%), aldehydes (13%), ethers (5%), ketones (3%), esters and alkanes (1%), and less than 1% for other compounds (monoaromatics, alkenes and acids). Identical compounds were detected in the stems harvested at seed maturity, with similar ordering. Terpenes had also the highest concentration in the stems harvested at seed maturity with 38% of total VOCs concentrations, and they are followed by alcohols (8%), aldehydes (6%), and 1% for other compounds (ethers, ketones, alkenes, acids and alkanes). With plant maturity, the sum of concentrations of the detected compounds decreased with a factor of about 2, from 20638 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for the unretted stems harvested at the end of flowering (ROEF) to 11368 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for the unretted stems harvested at the seed maturity (ROSM).

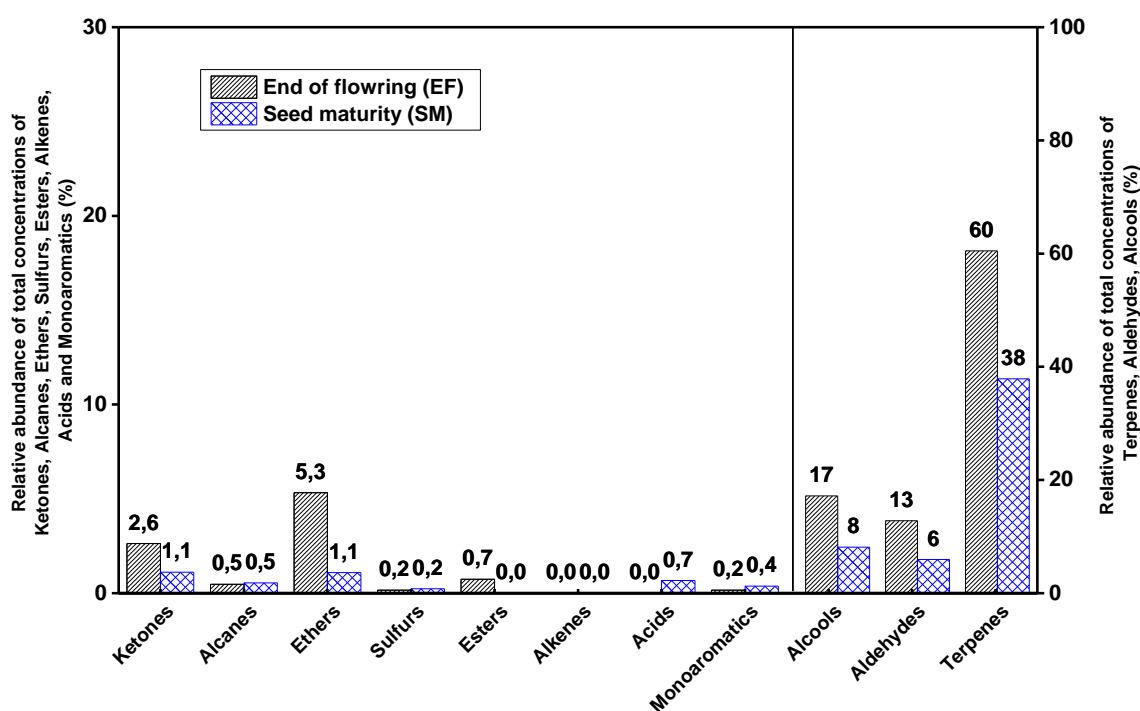


Figure III.6. Most abundant chemical families emitted by stems harvested at EF and SM

However, only the concentration of some compounds increased significantly with plant maturity, such as β -caryophyllene, α -humulene, $\delta,3$ -carene and methanol. Indeed, the stems

collected at the seed maturity seem to be more easily colonized by microorganisms. Thus, the emission of sesquiterpenes at the end of plant life is not surprising, since it is known that these compounds induced a direct inhibition of bacterial growth and also could prevent pathogen attacks [52]. Concerning methanol, the increase of the concentration during plant growth is presumably due to the demethylation of pectins in the primary cell wall during plant growth. The pectin-methylesterase-catalyzed reaction in plant cell wall is a source of methanol production in plants [53–56]. Massiot et al. [57] found that pectin methylase treatment of apple pectin induced the emission of 65% of the total methanol content of the pectin. Another source of methanol during plant decay could be the demethylation of lignin during fungal decomposition [58]. Dorokhow et al. [59] have been reported that the increase of methanol emission from pectin methylase delayed the growth of the bacterial pathogen *ralstonia solanacearum* in neighboring receiver plants. Indeed, methanol acts most probably as a signal notably in plant-to-plant communication.

The influence of the growth stage on VOCs emission by the plant has been already reported [45,60–62]. Biogenic VOCs are emitted by various organs (seeds, flowers, leaves, stems, and roots) [63]. Staudt et al., [64] have shown that VOCs emissions of umbrella pine (*Pinus pinea*) change by a factor of 20 during plant development.

Therefore, these results indicate clearly that the physico-chemical composition of hemp plants changes during plant development (from end of flowering to seed maturity) which is a result of complex interactions between the organism and its environment. This is not surprising since the stem color changes, as well, ranging from green to yellow during plant growth.

Table III.3. List of identified compounds and their concentrations (μg toluene equivalent m-3) N.B : Not identified.

Case N°	Name	Family	ROEF	ROS M
99-86-5	α -terpinene	Terpenes	16	N.B.
2867-05-2	α -thujene	Terpenes	13	0,4
80-56-8	α -pinene	Terpenes	8 445	4 924
471-84-1	α -fenchene	Terpenes	34	22
79-92-5	Camphene	Terpenes	349	169
123-35-3	β -myrcene	Terpenes	N.B.	116
127-91-3	β -pinene	Terpenes	1 626	874
6874-10-8	<i>cis</i> -o-cimene	Terpenes	79	15
138-86-3	Limonene	Terpenes	1 303	183
99-85-4	γ -terpinene	Terpenes	62	11
13474-59-4	α -bergamotene	Terpenes	47	28
87-44-5	β -caryophyllene	Terpenes	155	580
6753-98-6	α -humulene	Terpenes	N.B.	117
13466-78-9	delta,3-carene	Terpenes	N.B.	565
555-10-2	β _phellandrene	Terpenes	N.B.	5

473-13-2	α -selinene	Terpenes	N.B.	15
489-39-4	(+)-aromadendrene	Terpenes	197	64
75-07-0	Acetaldehyde	Aldehydes	1 367	766
107-02-8	2-propenal (acrolein)	Aldehydes	218	5
123-38-6	Propanal	Aldehydes	39	27
78-84-2	2-methylpropanal	Aldehydes	248	74
78-85-3	2-methyl-2-propenal	Aldehydes	6	5
123-72-8	Butanal	Aldehydes	6	3
15798-64-8	(z)-2-butenal	Aldehydes	N.B.	5
590-86-3	3-methylbutanal	Aldehydes	81	38
96-17-3	2-methylbutanal	Aldehydes	92	35
110-62-3	Pentanal	Aldehydes	139	112
66-25-1	Hexanal	Aldehydes	248	113
6728-26-3	2-hexenal (e)	Aldehydes	24	11
111-71-7	Heptanal	Aldehydes	8	N.B.
124-19-6	Nonanal	Aldehydes	88	N.B.
26882-03-1	α -campholene aldehyde	Aldehydes	68	11
23727-16-4	Myrtenal	Aldehydes	11	N.B.
67-56-1	Methanol	Alcohols	342	964
64-17-5	Ethanol	Alcohols	2 632	492
67-63-0	isopropanol	Alcohols	26	10
71-23-8	1-propanol	Alcohols	4	N.B.
78-92-2	2-butanol	Alcohols	5	12
78-83-1	2-methylpropanol	Alcohols	10	N.B.
71-36-3	1-butanol	Alcohols	3	3
616-25-1	1-pentene-3-ol	Alcohols	8	4
123-51-3	3-methyl-1-butanol	Alcohols	26	18
137-32-6	2-methyl-1-butanol	Alcohols	8	3
71-41-0	1-pentanol	Alcohols	15	3
111-27-3	Hexanol	Alcohols	50	4
111-70-6	1-heptanol	Alcohols	N.B.	2
15826-82-1	<i>cis</i> -4-thuyanol	Alcohols	75	N.B.
17699-16-0	<i>trans</i> -4-thuyanol	Alcohols	13	N.B.
22771-44-4	<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	Alcohols	12	1
4948-29-2	<i>cis</i> -2-pinanol	Alcohols	12	N.B.
547-61-5	Pinocarveol	Alcohols	256	126
562-74-3	Terpinène-4-ol	Alcohols	23	2
78-70-6	Linalool	Alcohols	N.B.	5
515-00-4	(-)-Myrtenol	Alcohols	28	N.B.
67-64-1	Acetone	Ketones	218	148
431-03-8	2,3-butanedione (diacetyl)	Ketones	95	22
600-14-6	2,3-pentadione	Ketones	2	1
96-22-0	3-pentanone	Ketones	3	N.B.
513-86-0	3-hydroxy-2-butanone	Ketones	96	1
110-43-0	2-heptanone	Ketones	8	N.B.
110-93-0	6-methyl-5-hepten-2-one	Ketones	21	3
19890-00-7	<i>cis</i> -Pinocarveol	Ketones	92	43
1120-21-4	Undecane	Alkanes	N.B.	2
109-66-0	Pentane	Alkanes	8	13
111-65-9	Octane	Alkanes	N.B.	1
111-84-2	Nonane	Alkanes	7	N.B.
508-32-7	Tricyclene	Alkanes	36	N.B.
124-18-5	Decane	Alkanes	8	11
112-40-3	Dodecane	Alkanes	N.B.	34

629-50-5	Tridecane	Alkanes	14	1
629-59-4	Tetradecane	Alkanes	25	49
930-27-8	3-methylfuran	Ethers	2	N.B.
534-22-5	2-methylfuran	Ethers	15	22
497-26-7	2-methyl-1,3-dioxolane	Ethers	166	N.B.
3208-16-0	2-ethylfuran	Ethers	5	3
470-82-6	Eucalyptol	Ethers	886	168
1139-30-6	β -caryophyllene oxide	Ethers	26	29
463-58-1	Carbonyl sulfide	Sulfurs	3	N.D.
75-18-3	Dimethylsulfide	Sulfurs	26	48
75-15-0	Carbonedisulfide	Sulfurs	4	N.D.
79-20-9	Methyl acetate	Esters	9	N.B.
141-78-6	Ethyl acetate	Esters	142	1
123-86-4	Butyl acetate	Esters	N.B.	2
19549-87-2	2,4-dimethylheptene	Alkenes	5	N.B.
64-19-7	Isobutyric acid	Acids	N.B.	136
71-43-2	Benzene	Monoaromatics	N.B.	6
108-88-3	Toluene	Monoaromatics	15	8
535-77-3	m-cymene	Monoaromatics	N.B.	62

Secondly, the temporal dynamic of VOCs of hemp stems during field retting has been studied. As it can be seen in figures III.7A and 7B, retting has an impact on emitted VOCs by the stems. The VOCs emission behavior is similar during retting, irrespective of the harvest period.

The concentration of the most abundant groups emitted by the stems harvested at EF i.e. terpenes, alcohols, aldehydes, ethers and ketones decreased, respectively, from 12481, 3549, 2643, 1100, 542 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$, for unretted stems (R0EF) to 1324, 4371, 272, 71 and 513 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for 5 weeks retted stems (R5EF) and then decreased significantly to 455, 434, 65, 16 and 33 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ respectively, after 11 weeks of retting (R11EF). For the stems harvested at SM, terpenes, alcohols, aldehydes, ethers and ketones decreased, respectively, from 7690, 1651, 1206, 221 and 226 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$, for the unretted stems (R0SM) to 421, 926, 79, 14 and 89 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for 5 weeks retted stems (R3SM) and then decreased to 310, 490, 14, 2 and 11 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ respectively, after 9 weeks of retting (R9SM).

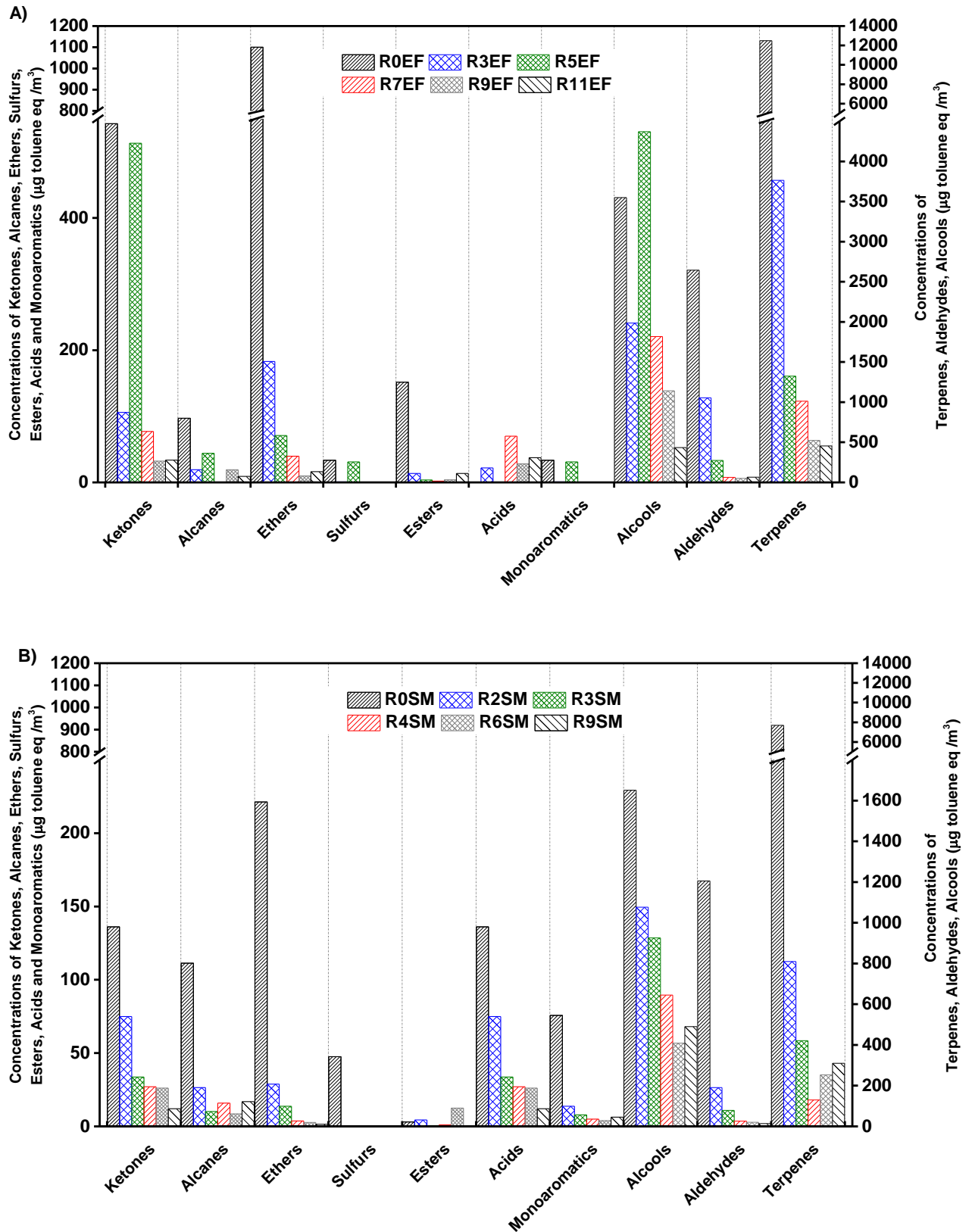


Figure III.7. Temporal dynamic of VOCs of hemp stems during field retting A) stems harvested at EF B) stems harvested at SM

The concentration of the most abundant VOCs before and after retting for the stems harvested at EF and SM are presented in the figures III.8, III.9, III.10, III.11, III.12 and III.13. As can be observed, the number of terpenes emitted decreased from 13 for unretted stems (R0EF) to 8 for 11 weeks retted stems (R11EF). Similar trend is observed during retting of stems harvested at SM. The number of VOCs emitted decreased from 15 for unretted stems of seed maturity (R0SM) to 6 for 9 weeks retted stems (R9SM). The α -pinene, β -pinene and limonene release (relative abundance of 93% of total terpenes concentration decreased from 8445, 1626 and 1303 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ to 893, 139 and 45 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$, for 5 weeks retted stems (R5EF) and then to 354, 46 and 16 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ after 11 weeks of retting (R11EF), respectively. A gradual decrease of the major terpenes emitted by the stems harvested at SM is also observed. The α -pinene, β -pinene and β -caryophyllene concentration decreased, respectively from 4924, 874 and 580 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for unretted stems (R0SM) to 253, 35 and 2 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for 9 weeks retted stems (R9SM). This phenomenon could be related to microbial activity during retting. The terpenes are considered to be recalcitrant to biodegradation [46]. But it has been reported that different bacteria and fungi populations can degrade such compounds (α -pinene, β -pinene and limonene) under aerobic and anaerobic conditions [27,65–67]. Likewise, the structures of the terpenes are rationalized as derivatives of isoprene, and this latter is known to be degraded by soil microorganisms including members of the *Arthrobacter* [67], *Nocardia* [68] and *Rhodococcus* genera [69].

As concern alcohols components, it can be observed in the figures III.10 and III.11 that the number of individual components in these groups decreased either during retting of the stems harvested at the end of flowering or seed maturity. Indeed, the number of the compounds emitted by unretted stems harvested at EF and SM are 19 and 15, respectively and then decreased to 7 and 3, after a retting period of 11 weeks of the stems harvested at the end of flowering (R11EF) and 9 weeks of retting of the seed maturity stems (R9SM), respectively. Moreover, the concentration of these compounds decreased as well, except for the methanol concentration. Methanol emission increased from 342 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for R0EF and 964 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for R0SM to 3913 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ after 5 weeks of retting of stems harvested at EF (R5EF) and 1017 $\mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for 2 weeks of retting of stems harvested at SM (R2SM). The increase of methanol at early stage of retting could be due to the pectin demethylation process by the pectin methylesterase. Indeed, during retting, the attack of stems by the microbial community by producing polysaccharide-degrading enzymes, especially pectinolytic results in the removal of components in the middle lamella (pectic substances) and allows the cortex fibres to be progressively separated from the plant

[9,13,14]. Therefore, methanol is considered as a major microbially end product of pectin removal. However, it is probable that other microorganisms growing on by-products could develop on the stems such as methylotrophs [55,70]. Moreover, this phenomenon can be interpreted as the expression of species coexistence which may arise from functional complementarity, through resource partitioning or positive interactions among different species [71].

In addition, the number and the concentration of individual components within aldehydes (figures III.12 and III.13), ketones, ethers and esters groups decreased as well during retting of the stems harvested at the end of flowering and seed maturity. The number of these compounds emitted by unretted stems harvested at the end flowering (R0EF) decreased from 15, 9, 6 and 2, respectively to 4, 4, 1 and 1, respectively after 11 weeks of retting (R11EF). Identical trend is observed when the stems are harvested at SM. A decrease of the number of aldehydes, ketones and ethers emitted from 13, 5, and 4 for R0SM to 5, 1 and 1 for R9SM. The predominant aldehyde is acetaldehyde with a concentration of $1367 \mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for R0EF and $766 \mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for R0SM. This compound decreased rapidly after 3 weeks of retting either for EF or SM. The concentrations of ketones, ethers and esters compounds are lower compared to other VOC groups, but the same pattern is observed.

The obtained results in this work also highlight that the field retting leads to a gradual decrease of VOCs emission by stems. Different studies reported that during field retting, the biofilm development on the stems surface leads to a change of stems morphology and composition [9,11,33]. This VOCs decrease could then be linked to the removal of some fibre constituents (pectins, wax,...) and stems layers like epidermis, considered as among of VOCs source by the plant [45,72].

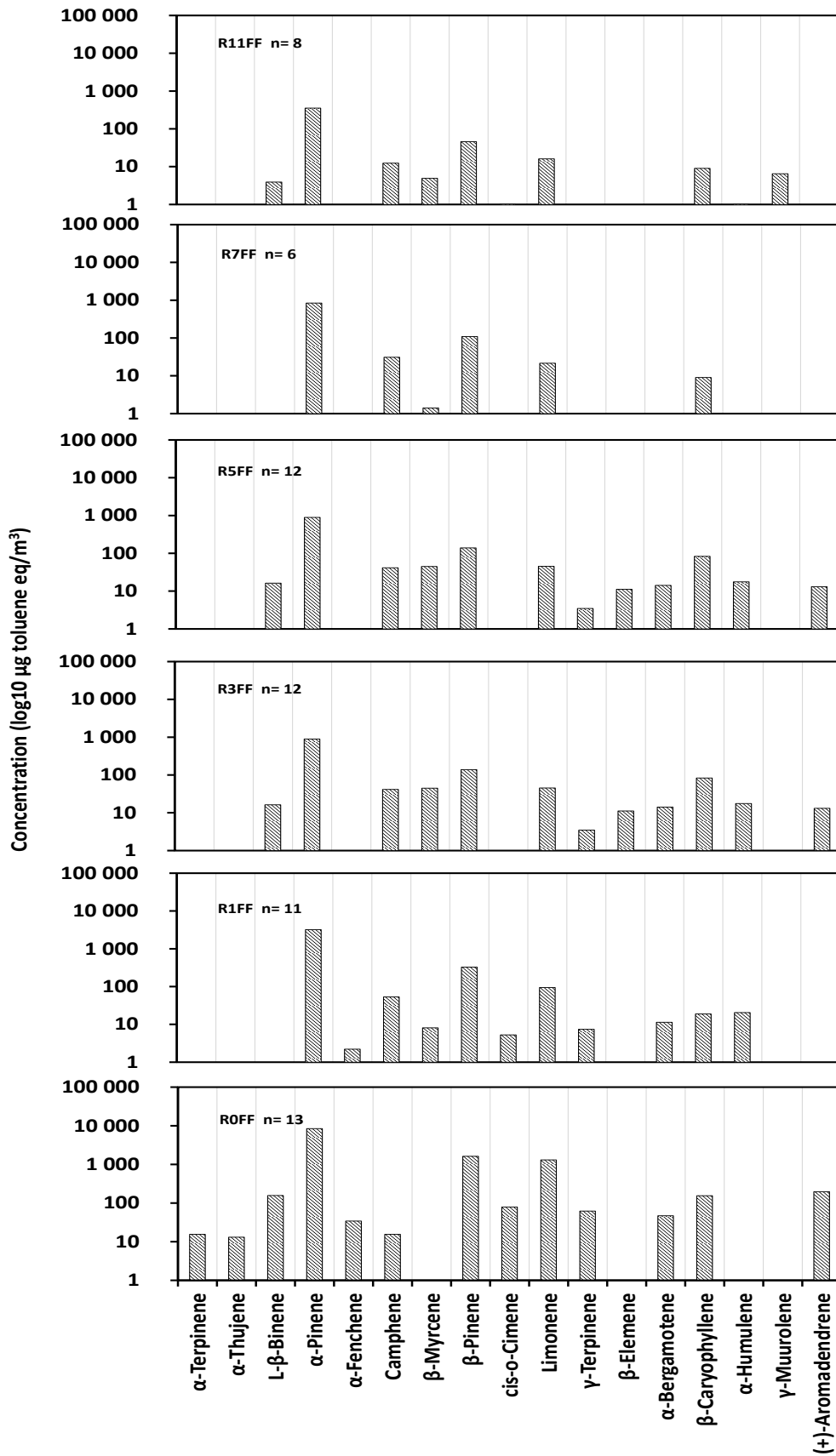


Figure III.8. Concentration variation of the terpenes during retting of stems harvested at EF

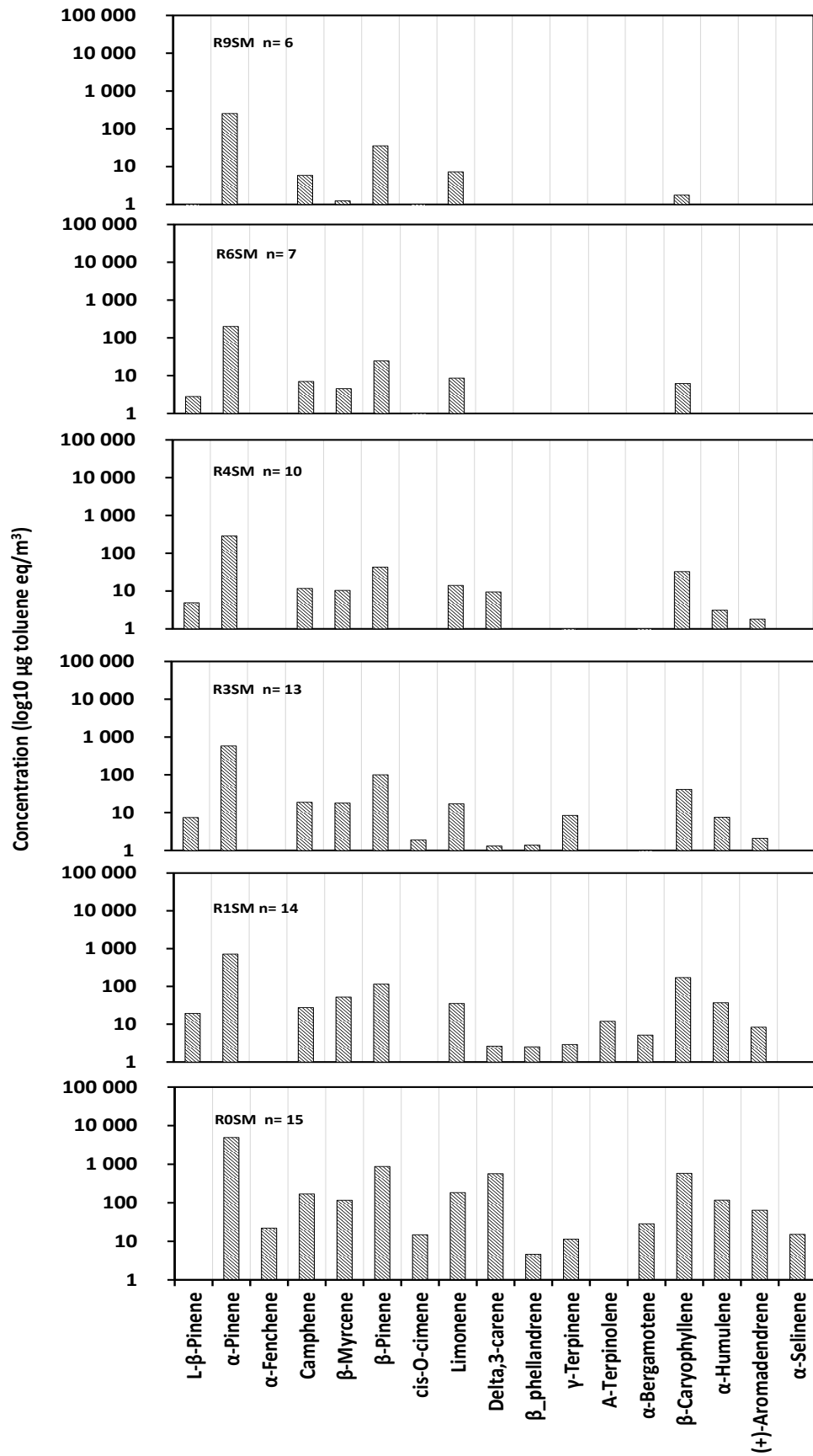


Figure III.9. Concentration variation of the terpenes during retting of stems harvested at SM

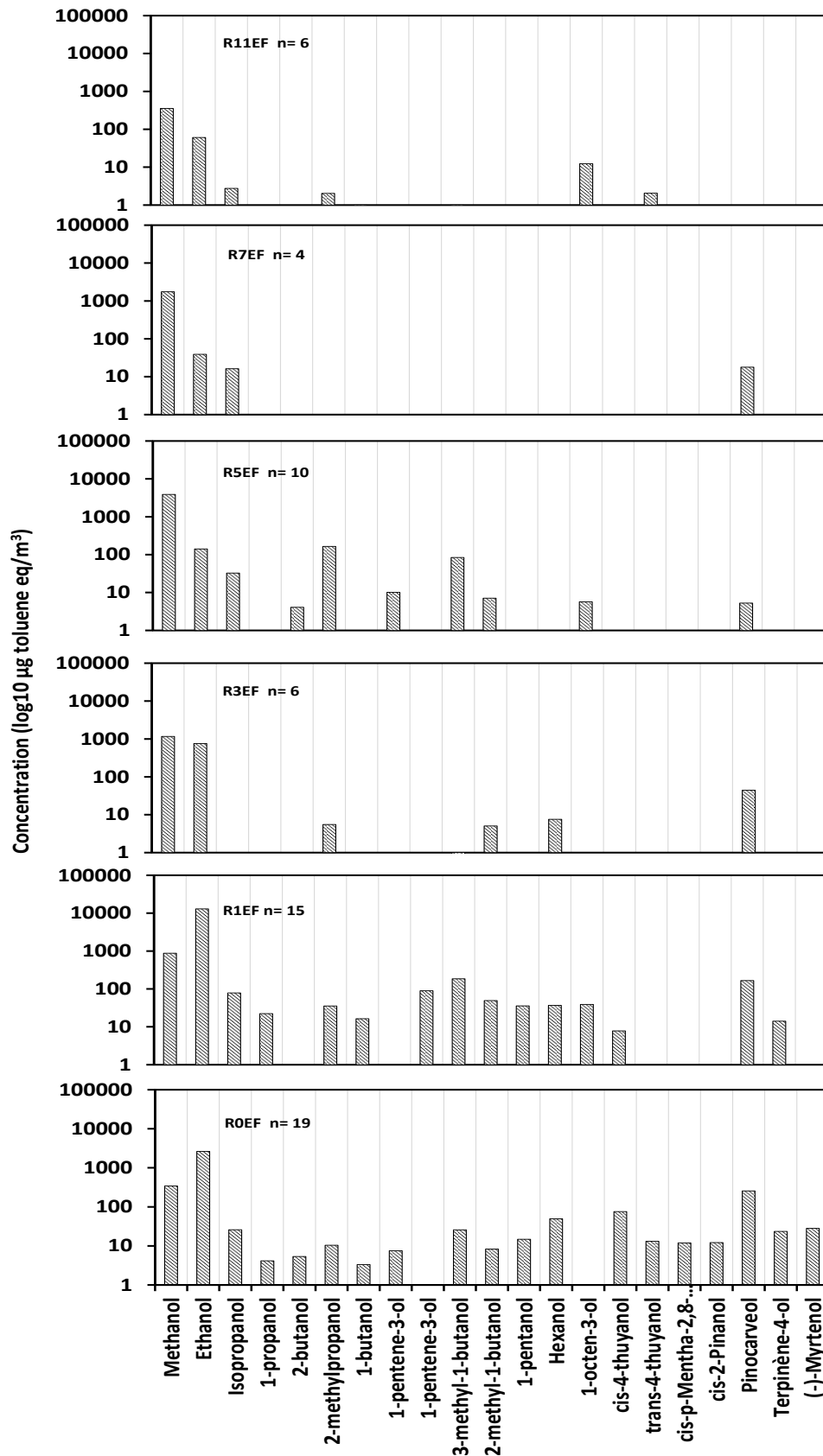


Figure III.10. Concentration variation of the alcohols during retting of stems harvested at EF

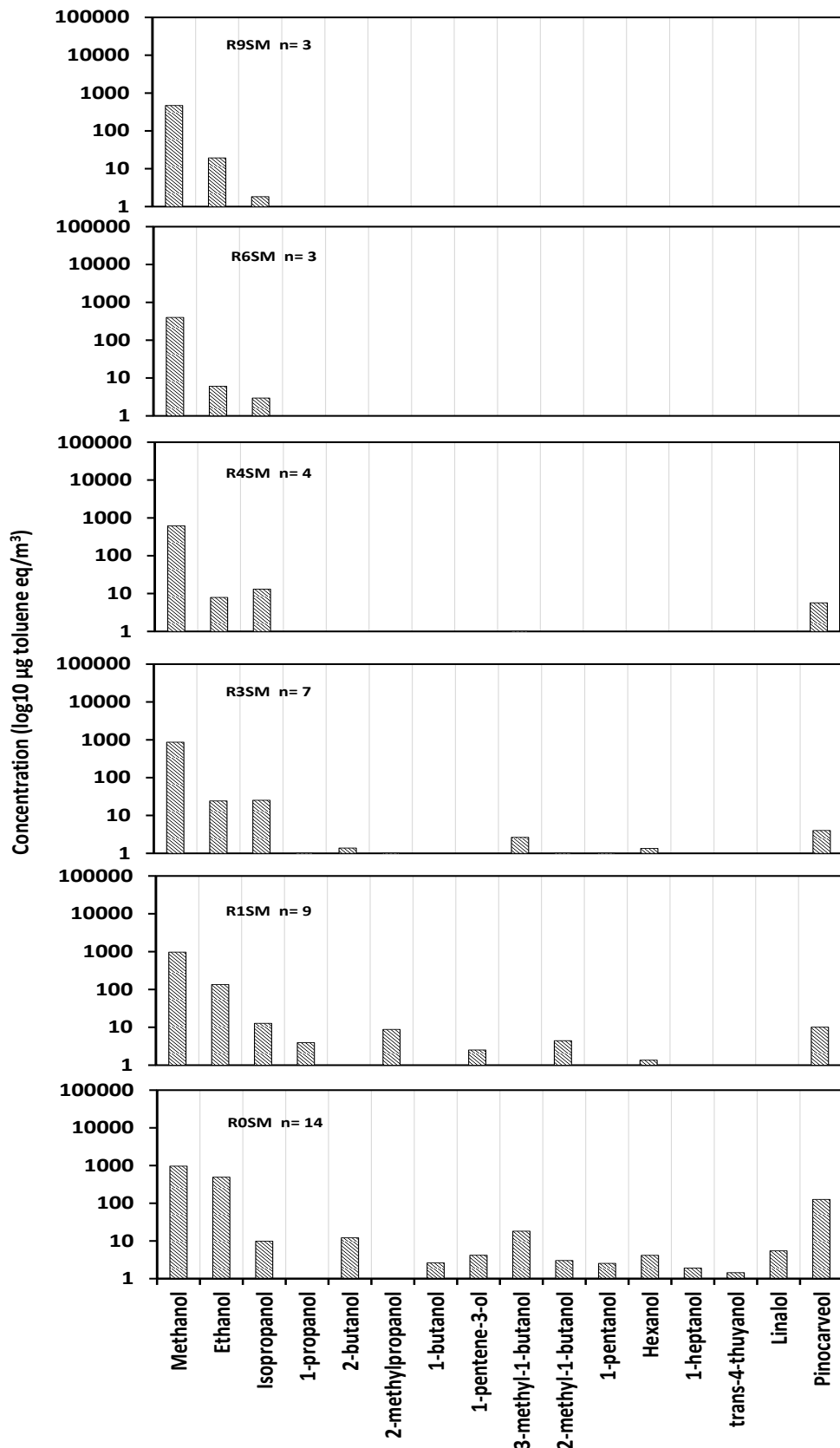


Figure III.11. Concentration variation of the alcohols during retting of stems harvested at SM

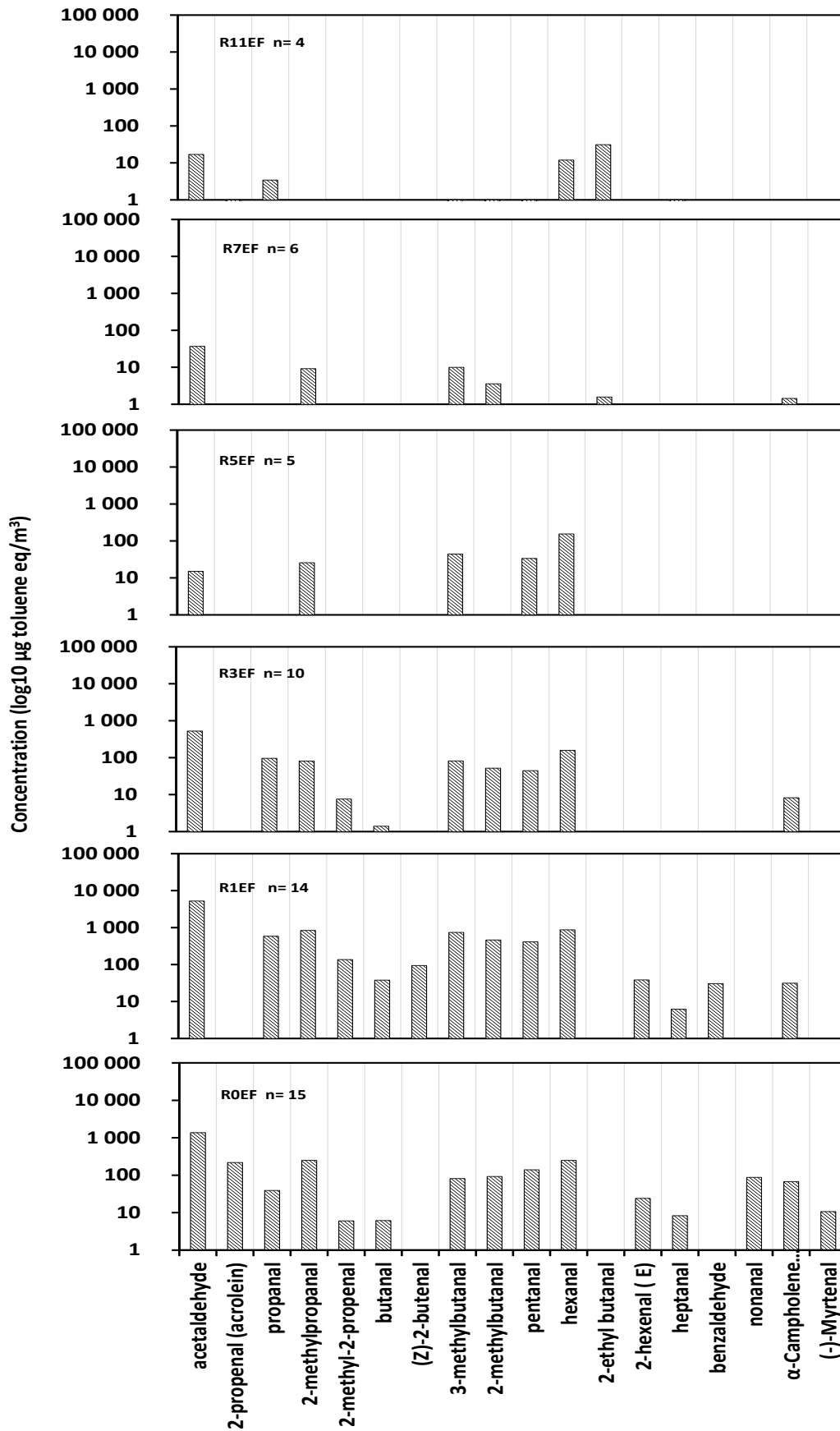


Figure III.12. Concentration variation of the aldehydes during retting of stems harvested at EF

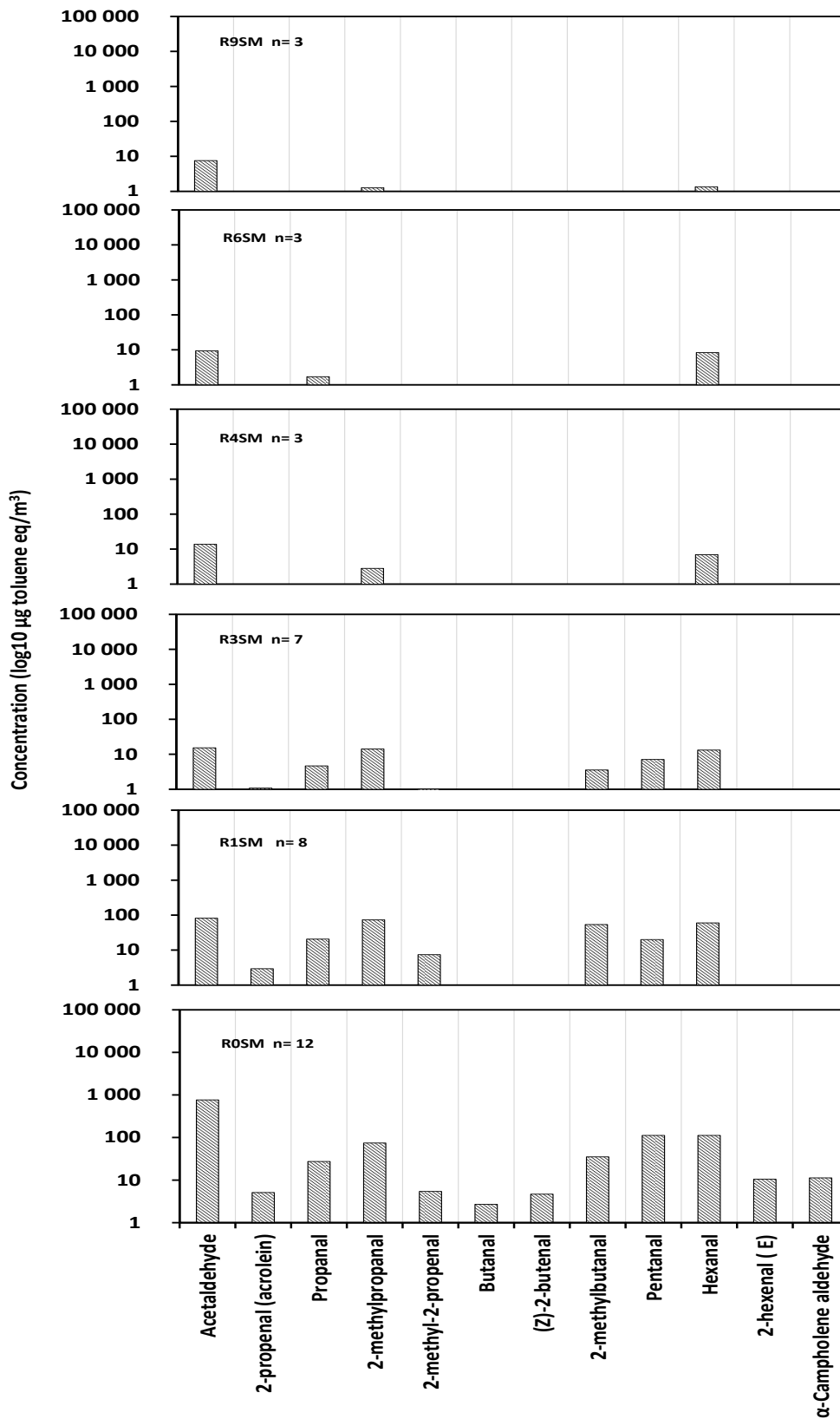


Figure III.13. Concentration variation of the aldehydes during retting of stems harvested at SM

3.3. Odor evaluation

The results of olfactometric analyses of the stems harvested at end of flowering and seed maturity, and retted at different durations are given in tables III.4 and III.5. Firstly, it can be observed that the odor concentrations and intensity during plant development decreased respectively from 1779 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 3.5, for the unretted stems harvested at EF (R0EF) to 1469 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 3.3 for the unretted stems harvested at seed maturity (R0SM). This is consistent with the results of the chemical analysis obtained with GC-MS. This decrease of odor concentration and intensity during plant ageing could presumably due to breakdown and decomposition of some compounds. On the other hand, regarding the odor acceptability evaluation, no difference could be noticed between the stems harvested at EF and SM. However, the obtained values of the odor acceptability indicate that the odor is considered as an unpleasant odor.

Secondly, it can be also observed that the retting have also an impact on the odor concentrations and the intensity. Indeed, during retting of the stems harvested at EF, the odor concentration and the intensity decreased gradually from 1779 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 3.5, respectively for unretted stems (R0EF), to 1253 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 3, respectively for 5 weeks retted stems (R5EF) and then to 898 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 2.7, respectively after 11 weeks of retting (R11EF). Similar trend of odor concentration is observed during retting of the stems harvested at SM. The odor concentration and the intensity decreased rapidly and gradually from 1469 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 3.3, respectively for unretted stems (R0SM) to 396 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 2.2, respectively for 6 weeks retted stems (R6SM) and then to 86 $\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$ and 1.7, respectively for 9 weeks retted stems (R9SM).

The odor acceptability of stems retted at different durations either at the end of flowering or at the seed maturity varied between -3.5 and -6 which represent unpleasant characteristics.

Table III.4. Olfactometric analyses and intensity evaluation of the stems harvested at the end of flowering

Retting duration (week)	Odor concentration ($\text{OU}_{\text{EM}^{-3}}$)	Intensity	Acceptability level
R0FF	1779	3.5	-4,9
R1FF	1572	3.3	-3,9
R3FF	1253	3.0	-5,6
R5FF	898	3.0	-6,6
R7FF	571	2.3	-6,6
R9FF	401	2.9	-5,9
R11FF	333	2.7	-3,8

Table III. 5. Olfactometric analyses and intensity evaluation of the stems harvested at the seed maturity

Retting duration (week)	Odor concentration (OU_Em⁻³)	Intensity	Acceptability level
R0 PS	1469	3.3	-4,3
R1PS	770	2.7	-3,6
R2PS	358	2.4	-4,1
R3PS	564	2.8	-3,8
R4PS	253	2.3	-4,4
R6PS	396	2.2	-5,1
R9PS	86	1.7	-

3.4. Odor quality

The results of odor evaluation of the stems harvested at the end of flowering and seed maturity and retted at different durations are illustrated in the figures III.14 and III.15. The odors description given by panels during retting are green plants, dry plants, spicy, fresh, soft, woody, fermented, moldiness, humus and mushroom odors. The green plants descriptor is predominant when the stems are harvested at the end of flowering (ROEF) and seed maturity (ROSM) with a percentage of 37% and 44%, respectively. The second descriptor given by the human sensory panels is dry plants odor with a percentage of 28% for ROEF and 20% for ROSM. This high green plants odor of the unretted stems of EF and SM could be related to the high presence of aldehydes, alcohols, and terpenes as it has been observed after GC-MS analysis (§II.1.4). Hatanaka [73] associated the fresh green odor emitted by plants to C6-aldehydes and C6-alcohols, which are used by plants to attract or repel insects and also to kill some bacteria. Högnadóttir et Rouseff, [74], reported also that the aldehydes and some terpenes such as α -pinene, β -pinene, limonene, β -myrcene and β _phellandrene contribute to the green aroma.

During field retting of the stems harvested at EF and SM, the “green plant” odor decreased significantly to 8% for R3EF and 4% for R3SM, and subsequently disappeared at the end of the retting. This decrease of “green plant” tonality is consistent with the disappearance of green color during retting. Likewise, according to VOCs concentration results, the C6-aldehydes and C6-alcohols emissions that seem to be linked to the green odor were reduced with retting. In contrast, the “dry plant” odor increased up to a maximum value and then decreased with a prolonged field retting. The fermented, moldiness odor emitted by stems increased as well during field retting. Mushroom odor starts to appear at the end of field retting. This observation is not surprising, since the microbial communities which develop

at the fully surface of the stems, leads to the appearance of black color. Regardless of the initial state of the stem after harvest period, the odor evolution is identical during retting like the evolution of VOCs concertation.

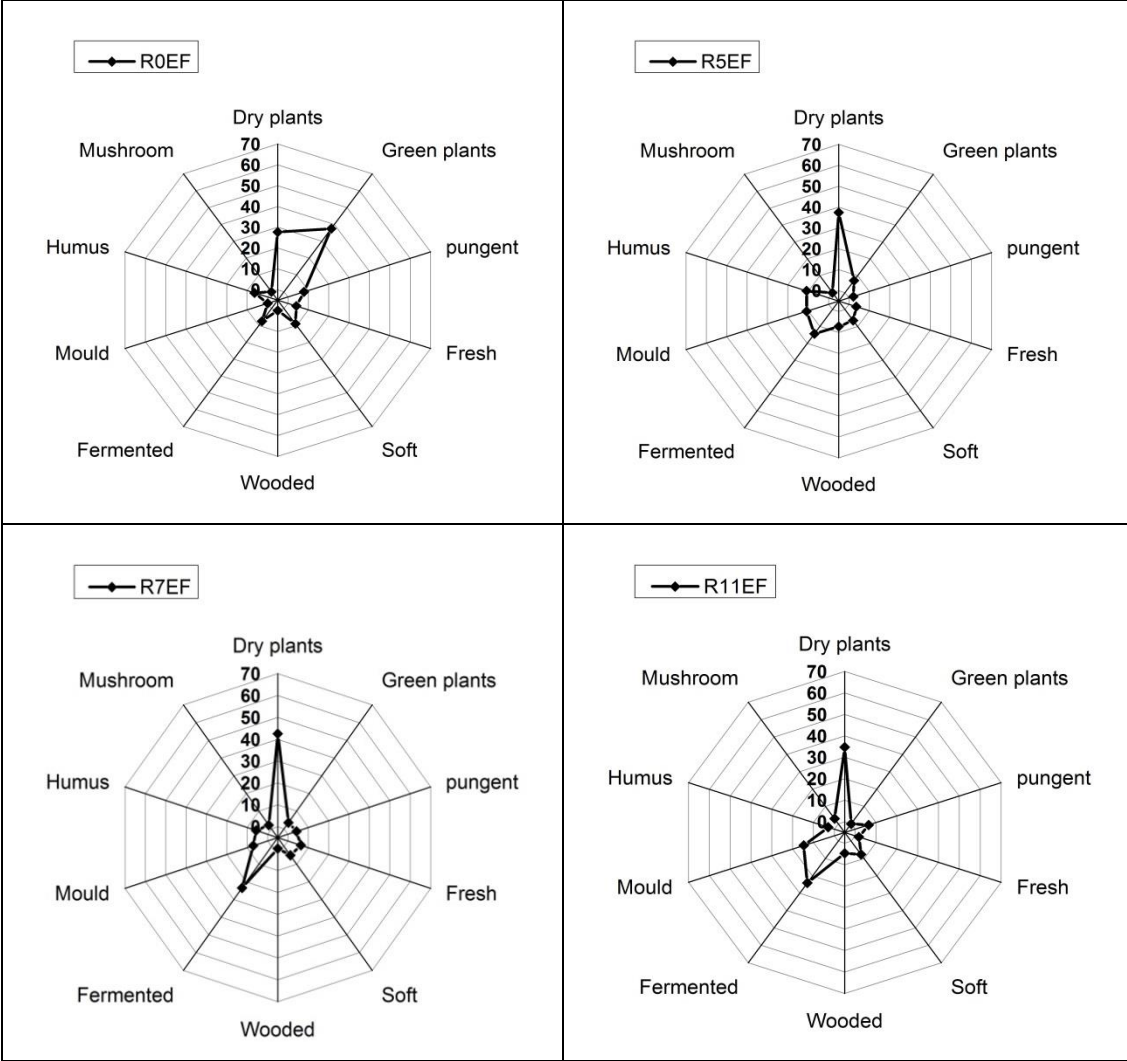


Figure III.14. Odor quality of retted stems previously harvested at EF

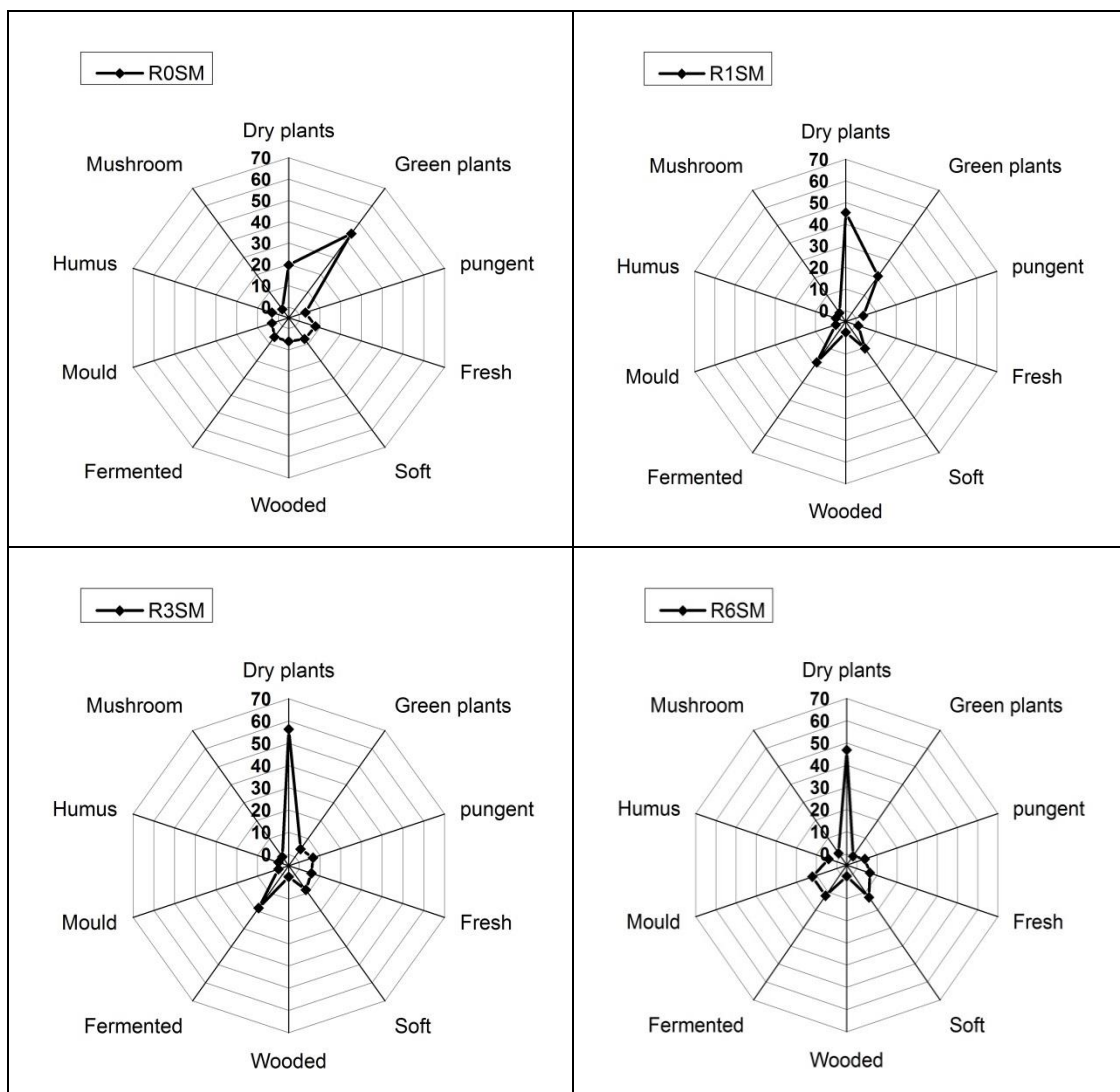


Figure III.15. Odor quality of retted-stems previously harvested at SM

4. Conclusion

The influence of field retting treatment on VOCs emitted by the stems harvested at the end of flowering and seed maturity was investigated in this study. Many compounds were emitted by stems, including α -pinene, β -pinene, methanol, hexanol, acetaldehyde, irrespective of the harvest period. The most abundant chemical family is terpenes, followed by alcohols and aldehydes groups. However, during plant maturity, the VOCs compounds emitted by stems decreased with a factor of about 2, from $20638 \mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for the stems harvested at the end of flowering (R0EF) to $11368 \mu\text{g}_{\text{toluene eq}}/\text{m}^3$ for the stems harvested at the seed maturity (R0SM).

During field retting process, the majority of COVs concentration decreased until some of them disappeared at the end of retting. This phenomenon is mainly due to a biotic factor, especially the development of the biofilm at the surface of the stems. In contrast, methanol increased owing to the demethylation of pectins in the primary cell wall. In addition, this behavior is confirmed by the olfactometric analyses. Indeed, the odor concentration decreased gradually during retting either for the stems harvested at the end of flowering and seed maturity. Likewise, the “green plant” tonality disappears during retting with an increase of “dry plant” odor and an appearance of “fermented odor” at the end of retting. This variation of VOCs and odor could be used as a good predictor to follow the retting degree. Nevertheless, a thorough work is required in order to establish some correlations between VOCs and odor emission and the mechanical properties of the fibers. This supplementary work would lead to define potential retting degree indicators that could be used by farmers.

Acknowledgements

The authors would like to thank the “CIVAM Chanvre Gardois (Bouquet, France)” for making available for us a plot of land to conduct this study.

References

- [1] Joshi S V., Drzal LT, Mohanty AK, Arora S. Are natural fiber composites environmentally superior to glass fiber reinforced composites? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2004;35:371–6.
- [2] Aziz SH, Ansell MP. The effect of alkalization and fibre alignment on the mechanical and thermal properties of kenaf and hemp bast fibre composites : Part 1 – polyester resin matrix 2004;64:1219–30.
- [3] Islam MS, Kim L P, Nic J F. Influence of Alkali Fiber Treatment and Fiber Processing on the Mechanical Properties of Hemp/Epoxy Composites Mohammad. *J Appl Polym Sci* 2010;21:449–56.
- [4] Stamboulis A, Baillie CA, Peijs T. Effects of environmental conditions on mechanical and physical properties of flax fibers. *Compos. Part A* 2001;32:1105-1115.
- [5] Bourmaud A, Baley C. Effects of thermo mechanical processing on the mechanical properties of biocomposite flax fibers evaluated by nanoindentation. *Polym Degrad Stab* 2010;95:1488–94

- [6] Liu M, Fernando D, Meyer AS, Madsen B, Daniel G, Thygesen A. Characterization and biological depectinization of hemp fibers originating from different stem sections. *Ind Crop Prod* 2015;76:880–91.
- [7] Duval A, Bourmaud A, Augier L, Baley C. Influence of the sampling area of the stem on the mechanical properties of hemp fibers. *Mater Lett* 2011;65:797–800.
- [8] Martin N, Mouret N, Davies P, Baley C. Influence of the degree of retting of flax fibers on the tensile properties of single fibers and short fiber/polypropylene composites. *Ind Crops Prod* 2013;49:755–67.
- [9] Mazian B, Bergeret A, Benezet J-C, Malhautier L. Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering. *Ind Crops Prod* 2018;116:170–81.
- [10] Placet V, François C, Day A, Beaugrand J, Ouagne P. Industrial Hemp Transformation for Composite Applications: Influence of Processing Parameters on the Fibre Properties. *Adv Nat Fibre Compos* 2018:13–25.
- [11] Placet V, Day A, Beaugrand J. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. *J Mater Sci* 2017;52:5759–77.
- [12] Liu M, Fernando D, Daniel G, Madsen B, Meyer AS, Ale MT, et al. Effect of harvest time and field retting duration on the chemical composition, morphology and mechanical properties of hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;69:29–39.
- [13] Akin DE, Condon B, Sohn M, Foulk JA, Dodd RB, Rigsby LL. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase. *Ind. Crops Prod* 2007;25:136–46.
- [14] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, et al. Identification and Retting Efficiencies of Fungi Isolated from Dew-Retted Flax in the United States and Europe 1997;63:3950–6.
- [15] Pakarinen A, Zhang J, Brock T, Majjala P, Viikari L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. *Bioresour Technol* 2012;107:275–81.
- [16] Singsaas EL, Lerda M, Winter K, Sharkey TD. Isoprene Increases Thermotolerance of Isoprene-Emitting Species. *Plant Physiol* 1997;115:1413–20.
- [17] Clark R, Menary R. The effect of irrigation and nitrogen on the yield and composition of peppermint oil (*Mentha piperita* L.). *Aust J Agric Res* 1980;31:489.
- [18] Holopainen JK, Blande JD. *Molecular Plant Volatile Communication*, 2012, p. 17–31.
- [19] Capitani D, Brilli F, Mannina L, Proietti N, Loreto F. In Situ Investigation of Leaf Water Status by Portable Unilateral Nuclear Magnetic Resonance. *PLANT Physiol* 2009;149:1638–47.
- [20] Filella I, Peñuelas J. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *Quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecol* 1999;145:157–65.

- [21] Copolovici L, Niinemets Ü. Flooding induced emissions of volatile signalling compounds in three tree species with differing waterlogging tolerance. *Plant Cell Environ* 2010.
- [22] Pinto DM, Blande JD, Nykänen R, Dong W-X, Nerg A-M, Holopainen JK. Ozone Degrades Common Herbivore-Induced Plant Volatiles: Does This Affect Herbivore Prey Location by Predators and Parasitoids? *J Chem Ecol* 2007;33:683–94.
- [23] Monson RK Metabolic and gene expression controls on the production of biogenic volatile organic compounds. In: Niinemets Ü, Monson RK (eds) *Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions*, vol 5, *Tree physiology*. Springer, Berlin, n.d.
- [24] Kessler A. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. *Science* (80-) 2001;291:2141–4.
- [25] Takabayashi J, Dicke M, Posthumus MA. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: Variation caused by biotic and abiotic factors. *J Chem Ecol* 1994;20:1329–54.
- [26] Kessler A, Halitschke R. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Curr Opin Plant Biol* 2007;10:409–14.
- [27] Paavolainen L, Kitunen V, Smolander a. Inhibition of nitrification in forest soil by monoterpenes. *Plant Soil* 1998;205:147–54.
- [28] Mackie A., Wheatley R. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biol Biochem* 1999;31:375–85.
- [29] Amaral JA, Knowles R. Inhibition of methane consumption in forest soils and pure cultures of methanotrophs by aqueous forest soil extracts. *Soil Biol Biochem* 1997;29:1713–20.
- [30] Owen SM, Clark S, Pompe M, Semple KT. Biogenic volatile organic compounds as potential carbon sources for microbial communities in soil from the rhizosphere of *Populus tremula*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;268:34–9.
- [31] Djemiel C, Grec S, Hawkins S. Characterization of bacterial and fungal community dynamics by high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding during flax dew-retting. *Front Microbiol* 2017;8:1–16.
- [32] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Analysis of green hemp fibre reinforced composites using bag retting and white rot fungal treatments. *Ind Crops Prod* 2009;29:420–6.
- [33] Liu M, Ale MT, Kołaczkowski B, Fernando D, Daniel G, Meyer AS, et al. Comparison of traditional field retting and *Phlebia radiata* Cel 26 retting of hemp fibres for fibre-reinforced composites. *AMB Express* 2017;7.
- [34] Chaignaud M, Cariou S, Poette J, Fages M, Despres F, Fanlo J. A New method to Evaluate Odour Annoyance Potential. *Chem Eng Trans* 2014;40:13–8.

- [35] Hörtensteiner S. The loss of green color during chlorophyll degradation - A prerequisite to prevent cell death? *Planta* 2004;219:191–4.
- [36] Merzlyak MN, Gitelson A. Why and What for the Leaves Are Yellow in Autumn? On the Interpretation of Optical Spectra of Senescing Leaves (*Acer platanoides* L.). *J Plant Physiol* 1995;145:315–20.
- [37] Matile P. Biochemistry of Indian summer: Physiology of autumnal leaf coloration. *Exp Gerontol* 2000;35:145–58.
- [38] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;4471–84.
- [39] Morrison WH, Archibald DD, Sharma HSS, Akin DE. Chemical and physical characterization of water- and dew-retted flax fibers. *Ind Crops Prod* 2000;12:39–46.
- [40] Jankauskienė Z, Gruzdevienė E. Physical parameters of dew retted and water retted hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. *Zemdirbyste-Agriculture* 2013;100:71–80.
- [41] Bleuze L, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chabbert B. Tracking the dynamics of hemp dew retting under controlled environmental conditions. *Ind Crops Prod* 2018;123:55–63.
- [42] Pallesen BE. The quality of combine-harvested fibre flax for industrial purposes depends on the degree of retting. *Ind Crops Prod* 1996;5:65–78.
- [43] Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG. Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A Review of the Natural Constituents. *J Nat Prod* 1980;43:169–234.
- [44] ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci* 2005;78:539–48.
- [45] Kesselmeier J, Staudt M. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J Atmos Chem* 1999;33:23–88.
- [46] Cookson JT, *Bioremediation engineering; design and application*. (1995) McGraw-Hill, New York, N n.d.
- [47] Gershenzon, J., and R. Croteau (1991), *Terpenoids*, G. Rosenthal and M. Berenbaum (eds), *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Vol. I: The Chemical Participants, Academic Press, p. 165–219
- [48] Oikawa PY, Lerdau MT. Catabolism of volatile organic compounds influences plant survival. *Trends Plant Sci* 2013;18:695–703.
- [49] Wink M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* 1988;75:225–33.
- [50] Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, et al. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:16672–6.
- [51] Maffei ME. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South*

- African J Bot 2010;76:612–31.
- [52] Huang P-Y, Zimmerli L. Enhancing crop innate immunity: new promising trends. *Front Plant Sci* 2014;5.
- [53] Schmidt R, Cordovez V, De Boer W, Raaijmakers J, Garbeva P. Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* 2015;9:2329–35.
- [54] PELLOUX J, RUSTERUCCI C, MELLEROWICZ E. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* 2007;12:267–77.
- [55] Galbally IE, Kirstine W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J Atmos Chem* 2002;43:195–229.
- [56] Fall R, Benson AA. Leaf methanol - The simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci* 1996;1:296–301.
- [57] Nykter M, Kyma H, Belinda A, Lilholt H, Thygesen A. Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) 2008;32:392–9.
- [58] Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:465–501.
- [59] Komarova T V., Sheshukova E V., Dorokhov YL. Cell wall methanol as a signal in plant immunity. *Front Plant Sci* 2014;5.
- [60] Jankauskienė Z, Butkutė B, Gruzdevienė E, Cesevičienė J, Fernando AL. Chemical composition and physical properties of dew- and water-retted hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;75:206–11.
- [61] Ohta K. Diurnal and seasonal variations in isoprene emission from live oak. *Geochem J* 1986;19:269–74.
- [62] Rozyanty AR, Nur Firdaus MY, Liew TZ, Yunus NFM. Kenaf-Unsaturated Polyester Composite: The Effect of Different Retting Process of Kenaf Bast Fiber on the Mechanical Properties. *Mater Sci Forum* 2015;819:256–61.
- [63] Gfeller A, Laloux M, Barsics F, Kati DE, Haubruge E, du Jardin P, et al. Characterization of Volatile Organic Compounds Emitted by Barley (*Hordeum vulgare* L.) Roots and Their Attractiveness to Wireworms. *J Chem Ecol* 2013;39:1129–39.
- [64] Staudt M, Bertin N, Hansen U, Seufert G, Ciccijolij P, Foster P, et al. Seasonal and diurnal patterns of monoterpene emissions from *Pinus pinea* (L.) under field conditions. *Atmos Environ* 1997;31:145–56.
- [65] Van Groenestijn JW, Liu JX. Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. *Atmos Environ* 2002;36:5501–8.
- [66] Misra G, Pavlostathis SG, Perdue EM, Araujo R. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;45:831–8.
- [67] Ramirez KS, Lauber CL, Fierer N. Microbial consumption and production of volatile

- organic compounds at the soil-litter interface. *Biogeochemistry* 2010;99:97–107.
- [68] Ginkel CG, Jong E, Tilanus JWR, Bont JAM. Microbial oxidation of isoprene, a biogenic foliage volatile and of 1,3-butadiene, an anthropogenic gas. *FEMS Microbiol Lett* 1987;45:275–9.
- [69] van Hylckama Vlieg JET, Leemhuis H, Spelberg JHL, Janssen DB. Characterization of the Gene Cluster Involved in Isoprene Metabolism in *Rhodococcus* sp. Strain AD45. *J Bacteriol* 2000;182:1956–63.
- [70] Schink B, Zeikus JG. Microbial Ecology of Pectin Decomposition in Anoxic Lake Sediments and in defined laboratory cultures of species prevalent in the lake sediment. *J Gen Microbiol* 1982;128:393–404.
- [71] Cabrol L, Malhautier L. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90:837–49.
- [72] Hartikainen K, Nerg A -m., Kivimaenpaa M, Kontunen-soppela S, Maenpaa M, Oksanen E, et al. Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. *Tree Physiol* 2009;29:1163–73.
- [73] Hatanaka A. The fresh green odor emitted by plants. *Food Rev Int* 1996;12:303–50.
- [74] Högnadóttir Á, Rouseff RL. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;998:201–11.

CHAPITRE IV

APPROCHE MICROBIOLOGIQUE DU ROUISSAGE

1. Introduction

La transition vers une bio-économie nécessite de remplacer les produits dérivés de pétrole par des produits « verts » ou des ressources naturelles renouvelables. Dans le domaine de l'élaboration des matériaux, une possibilité est la substitution des fibres minérales ou synthétiques par des fibres végétales (chanvre, lin, jute..). En plus de leur disponibilité, les fibres végétales présentent aussi des avantages liés à leur structure complexe qui leur confèrent de bonnes propriétés mécaniques spécifiques c'est-à-dire ramenées à leurs faibles densités [1]. L'utilisation de ces fibres nécessite d'appliquer aux tiges un traitement, ou une série de traitements, qui consiste à extraire les fibres de la plante. Pour les fibres de chanvre, la première étape de cette filière est le traitement de rouissage. Ce traitement est une étape importante, qui joue un rôle clé sur la qualité finale des fibres. L'efficacité de ce procédé dépend de la capacité des microorganismes à produire des enzymes pectinolytiques qui décomposent les substances pectiques liant les fibres à la plante. En effet, pendant le rouissage, les faisceaux de fibres se séparent progressivement des tissus de la tige [2] et la cohésion entre les fibres est réduite grâce à l'action d'exoenzymes hydrolytiques produites par des communautés microbiennes complexes colonisant les tiges.

Au cours du processus de rouissage, les microorganismes libèrent et utilisent des monosaccharides comme source de carbone et d'énergie. La diversité microbienne associée à cette dégradation de la biomasse peut varier en fonction de la structure de la paroi cellulaire de la plante et du stade de la décomposition [3][4][5]. La dynamique microbienne peut également varier en fonction de la localisation, de la composition du sol, des espèces de plantes et des caractéristiques de la biomasse (densité, diversité, activité) [5][6][7][8].

Comme cela a été montré dans le chapitre II, le principal défi lors du rouissage consiste à faciliter la séparation des fibres sans atteindre un sur-rouissage qui peut conduire à la dégradation de la composante principale des fibres (à savoir la cellulose) et donc des propriétés mécaniques à la fois des faisceaux de fibres de chanvre et des biocomposites les utilisant comme renfort [9][10]. Une meilleure connaissance des populations microbiennes intervenant directement dans la dégradation des pectines (communauté fonctionnelle) peut permettre également de mieux comprendre et contrôler ce processus complexe.

Dans le cadre de ce chapitre de thèse, nous n'avons pas été en mesure de caractériser en détail la microflore impliquée dans ce procédé de rouissage. En conséquence, ce chapitre rassemble quelques résultats obtenus dans le cadre d'une première approche. Dans un premier temps, il s'agira d'identifier le compartiment (sol, tige, système racinaire) où se

trouve localisée la microflore pectinolytique et ensuite d'étudier la dynamique temporelle des densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques au cours du processus de rouissage pour différentes périodes de la récolte (fin de floraison et période de semence) et durées de rouissage.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Prélèvements

Le chanvre (*Cannabis Sativa* L., variété : Santhica 27) a été cultivé dans le sud de la France autour du Mas La Valus (GPS: N 44.130673 °, E 4.315895 °) (figure IV.1) par des agriculteurs membres de l'Association Chanvre Gardois CIVAM (Bouquet, France). La densité de semis est environ de 30kg / ha. Deux cultures ont été réalisées en 2016 et 2017.

Lors d'une culture de chanvre en 2016 (figure IV.2), des prélèvements du système racinaire, de la partie aérienne de la plante, et du sol ont été réalisés en juillet après 11 semaines de croissance afin de localiser la communauté microbienne responsable de la dégradation de la pectine. Un sol non cultivé à proximité du champ a été également prélevé à la même date.

Lors d'une deuxième culture de chanvre en 2017, les densités de peuplement des bactéries, archées et micromycètes ont été estimées à partir de tiges récoltées en fin de floraison et à la période de semence et après différents temps de rouissage (tableau IV. 1). Les conditions climatiques sont données dans le chapitre III (§2.1.2). Les tas de tiges sont retournés manuellement une fois par semaine.

Tableau IV.1. Nomenclature des prélèvements réalisés pendant la culture de chanvre de 2017. FF : Fin de floraison ; PS : Période de semence.

Durée de rouissage (jour)	0	21	28	35	42	49	63	77
Durée de rouissage (semaine)	0	3	4	5	6	7	9	11
Nom des échantillons	R0FF	R3FF	-	R5FF	-	R7FF	R9FF	R11FF
	R0PS	-	R4PS	-	R6PS	-	R9PS	-



Figure IV.1. Parcelle cultivée par du chanvre à proximité du Mas la Valus (12/07/2016)

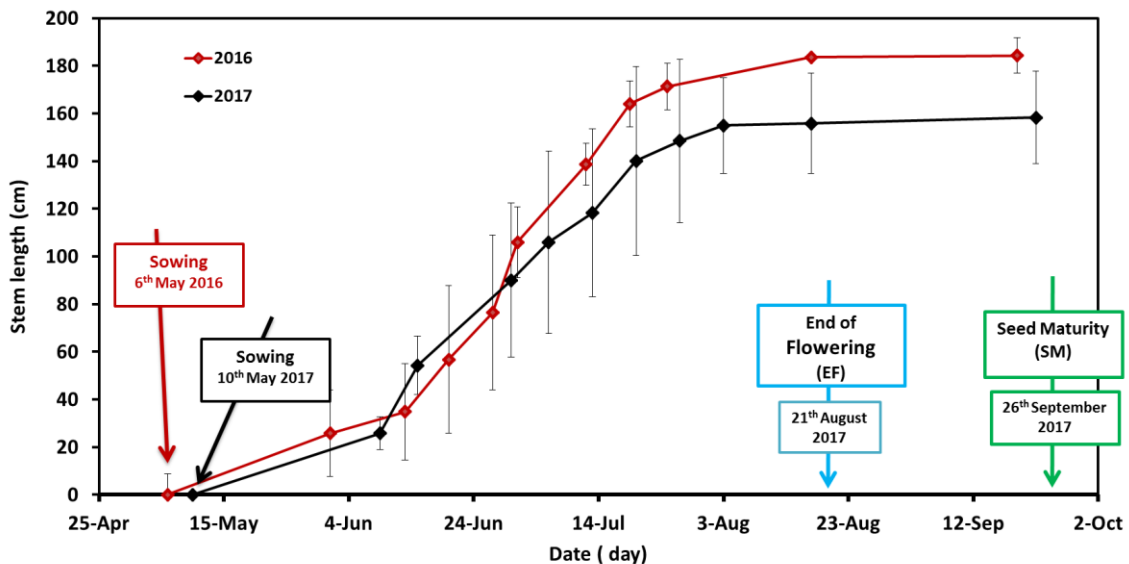


Figure IV.2. Développement de la plante de chanvre cultivée pendant la culture de 2016 ; et 2017

2.2. Localisation de la biomasse dégradant la pectine

Afin de localiser la communauté microbienne responsable de la dégradation de la pectine, la biomasse du système racinaire, de la partie aérienne de la plante (tige), du sol sur lequel est cultivé le chanvre et du même type de sol non cultivé a été récupérée en se basant sur la méthode utilisée par Cabrol et al. [11]. Les échantillons ont été introduits dans un volume de 15 mL de solution saline ($\text{NaCl } 9 \text{ g L}^{-1}$). Les bactéries sont désorbées par agitation du

matériau à 30 Hz pendant 10 min (Vibro-shaker MM200, Retsch, Haan, Allemagne). La phase liquide est ensuite centrifugée à 700 rpm pendant 20 min pour éliminer les particules les plus grossières. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 9000 rpm pendant 30 min à 5°C. Ensuite, le culot est remis en suspension dans une solution de NaCl à 9 g.L⁻¹. La suspension de microorganismes ainsi obtenue est utilisée pour ensemercer un milieu de culture contenant de la pectine commerciale (Coprane, Ales, France) et de l'extrait de levure (Merck, Darmstadt, Allemagne). La cinétique des réactions chimiques et enzymatiques est généralement dépendante de la température. Effectivement, quand la température augmente, les vitesses de ces réactions augmentent jusqu'à une température maximale au-delà de laquelle les composants cellulaires (enzymes, acides nucléiques, protéines,...) sont dénaturés, entraînant une inactivation des fonctions cellulaires [12]. Les microorganismes se développant sur les tiges étant probablement mésophiles *i.e.* avec des optimums de croissance compris entre 25 et 37°C, les essais ont donc été menés à des températures de 27 et 37°C sous agitation à 200 rpm. Un erlenmeyer contenant uniquement le milieu de culture (pas d'ensemencement) est utilisée comme contrôle négatif. Des prélèvements quotidiens pendant 10 jours ont été réalisés pour suivre l'évolution de la pectine dont la concentration initiale dans chaque erlenmeyer est de 5 g L⁻¹.

2.3. Dosage des pectines

La teneur en pectine a été déterminée à l'aide d'une méthode colorimétrique mise au point par Blumenkrantz et Asboe-Hansen. [13]. Cette méthode consiste à hydrolyser des substances pectiques en acide galacturonique qui est le composé principal des pectines, suivi d'une étape de coloration utilisant le m-hydroxydiphényle à température ambiante.

Tout d'abord, un dosage standard a été réalisé avec différentes quantités de pectine du commerce (Coprane, Ales, France) comprises entre 0 et 8 µg dans un volume de 40µL (soit une concentration variant de 0 à 200 µg mL⁻¹). Après ajout de 200 µl d'acide sulfurique concentré (96%), les échantillons ont été incubés à 80°C pendant 1 heure dans une étuve. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance des échantillons a été mesurée en spectrophotométrie (Thermo scientific Multiskan® spectrum, Waltham, MA USA) à 540 nm (blanc échantillon). Ensuite, un volume de 40 µl de réactif de m-hydroxydiphényl a été ajouté à chaque échantillon. Une coloration rose apparaît et l'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 540nm. La teneur exacte d'acide galacturonique est obtenue après soustraction du blanc échantillon. Une courbe d'étalonnage est obtenue entre 0 et 8 µg d'acide galacturonique (figure IV.3).

Ce réactif de m-hydroxydiphenyl est obtenu de la façon suivante : une masse de 100 mg de m-hydroxydiphenyl est mise en suspension dans 1ml de diméthylsulfoxyde. Un volume de 100 µl de la solution précédente est ensuite mélangé avec 4,9ml d'acide sulfurique 80%.

La teneur en pectines des échantillons a été estimée à partir du prélèvement d'un volume connu d'échantillon, à des temps réguliers et pendant toute la durée de l'expérience, et en utilisant la courbe d'étalonnage (figure IV.3) L'absorbance est mesurée à 540 nm et la concentration en acide galacturonique est obtenue directement de la courbe d'étalonnage.

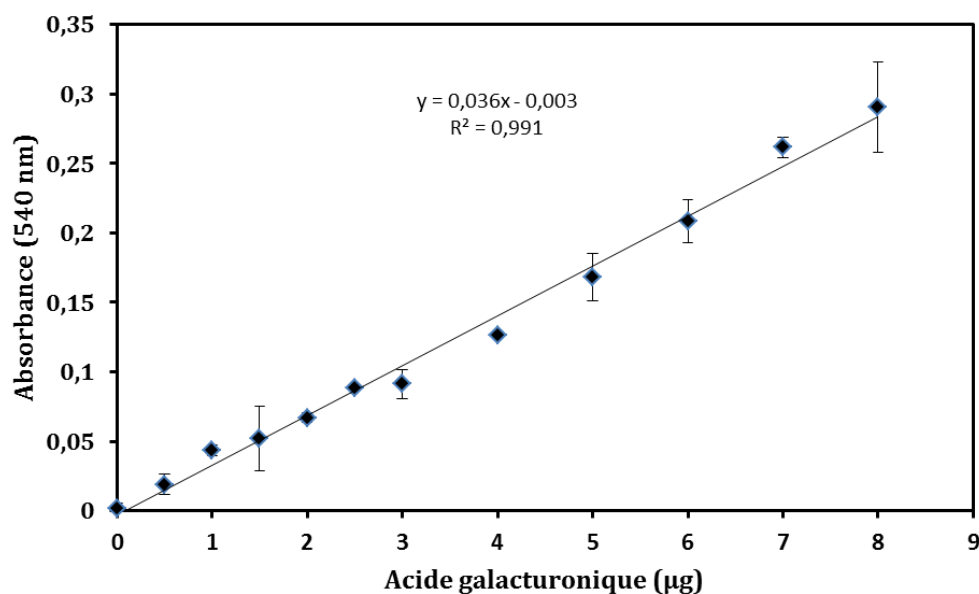


Figure IV.3. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique obtenue à partir de pectine du commerce (Coprane, Ales, France)

2.4. Extraction et amplification de l'ADN

L'extraction de l'ADN des tiges de chanvre et du sol cultivé durant les différentes périodes de la récolte et à différents temps de rouissage (tableau IV.1) a été réalisée en se basant sur la méthode mise au point par Cabrol et al. [11]. Une masse de 3 g de tiges a été introduite dans un volume de 15 mL de solution saline ($\text{NaCl } 9 \text{ g L}^{-1}$). Les bactéries sont désorbées par agitation du matériau à 30 Hz pendant 10 min (Vibro-shaker MM200, Retsch, Haan, Allemagne). La phase liquide est ensuite centrifugée à 700 rpm pendant 20 min pour éliminer les particules les plus grossières. Le surnageant est récupéré puis centrifugé à 9000 rpm pendant 30 min à 5°C permettant d'obtenir le culot cellulaire. L'ADN est extrait de ce dernier au moyen d'un kit FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) selon le protocole donné par le fournisseur. L'ADN génomique est quantifié par absorbance

à 535 nm après une coloration au PicoGreen (Quant-IT ds DNA HS reagent, Invitrogen, OR, USA). Les densités de peuplement des bactéries, archées et micromycètes (champignons filamenteux) ont été déterminées par PCR quantitative (qPCR) en ciblant les gènes de l'ADNr16S (bactéries et archées) et de l'ADNr18S (champignons filamenteux/micromycètes). Le protocole permettant de cibler ces trois populations est détaillé ci-dessous.

- Les amorces permettant de cibler la communauté archée sont ARC787F (5'-ATTAG ATACCCSBGTAGTCC-3', avec S = G ou C et B = C ou G ou T, T_m 56,6°C), ARC1059R (5'AGGAATTGGCGGGGAGCAC-3', T_m 54,3°C) et la sonde ACR915F (HEX-GCCATGCACWCCTCT-BHQ1, avec W = A ou T) [14]. Ce couple d'amorces génère un fragment de 273 paires de bases. La qPCR a été effectuée au moyen du kit Promega GoTaq Probe qPCR Master mix selon les conditions réactionnelles synthétisées dans le tableau IV.2, en thermocycleur Corbett Research Rotorgene 6000 (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le programme suivant : activation initiale à 95°C pendant 4min suivie de 50 cycles de : dénaturation à 95°C pendant 15s et d'hybridation-élongation à 60°C pendant 60s.
- Les amorces permettant de cibler la communauté bactérienne sont BAC338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3, T_m 57,6°C), BAC805R (5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC 3' T_m 57,9°C) et la sonde BAC516F (FAM-TGCCAGCAGCCGCGTAATAC-TAM) [14]. Ce couple d'amorces génère un fragment de 468 paires de bases. La qPCR a été effectuée au moyen du kit Promega GoTaq Probe qPCR Master mix (tableau IV.2), en thermocycleur Corbett Research Rotorgene 6000 (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le programme suivant : activation initiale à 95°C pendant 4min suivie de 50 cycles de: dénaturation à 95°C pendant 15s et d'hybridation-élongation à 60°C pendant 60s.
- Les amorces permettant de cibler la communauté fongique sont nu-SSU-0817-F (5'-TTAGCATGGAATAATRRRATAGGA-3', avec R = A ou G, T_m 54,2°C) et nu-SSU-1196-R (5'-TCTGGACCTGGTGAGTTTC-3', T_m 56.7°C) [15]. Ce couple d'amorces génère un fragment de 422 paires de bases. Le kit Hot firepol EvaGreen (Solis BioDyne, Tartu, Estonie) a été utilisé selon les conditions réactionnelles synthétisées dans le tableau IV.2, en thermocycleur Corbett Research Rotorgene 6000 (Qiagen, Hilden, Allemagne) pour réaliser les quantifications selon le programme suivant : activation initiale à 95°C pendant 15 min suivie de 48 cycles de dénaturation à 95°C pendant 18s, hybridation à 60°C pendant 60s et extension à 72°C pendant 20s. Les courbes de

fusion des amplicons ont été obtenues à partir de la rampe de température suivante : de 65 à 95°C à 0,5°C/s.

Tableau IV.2. Conditions réactionnelles des qPCR permettant de cibler les communautés archée, bactérienne et fongique.

	Volume (µL)	Concentration finale
qPCR duplex : communautés archées et bactéries		
Master mix Promega GoTaq Probe qPCR	10	1x
Primer ARC787F à 10 µM	1	500 nM
Primer ARC1059R à 10 µM	1	500 nM
Probe ACR915F à 20 µM	0,8	200 nM
Primer BAC338F à 10 µM	1	500 nM
Primer BAC805R à 10 µM	1	500 nM
Probe BAC516F à 20 µM	0,8	200 nM
Solution d'ADN	2	variable
Eau qualité qPCR	qsp 20	
Volume total	20	
qPCR : communauté fongique		
kit Hot Solis BioDyne firepol EvaGreen	4	1x
Primer nu-SSU-0817-F à 10 µM	1	500 nM
Primer nu-SSU-1196-R à 10 µM	1	500 nM
Solution d'ADN	2	variable
Eau qualité qPCR	qsp 20	
Volume total	20	

Les efficacités des qPCR réalisées sont globalement supérieures à 90% pour tous les échantillons. La spécificité de l'amplification du gène codant pour l'ARNr18S est vérifiée par les courbes de fusion (figure IV.4).

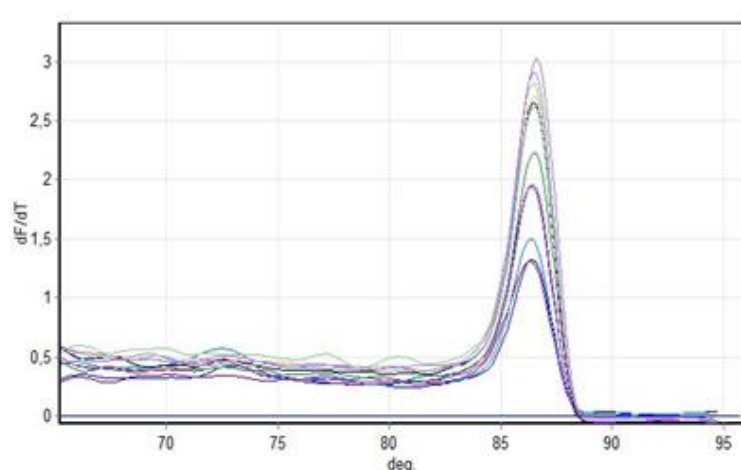


Figure IV.4. Exemple de courbes de fusion permettant de vérifier l'unicité du produit d'amplification (ADNr18S)

2.5. Principe de la qPCR

La qPCR repose sur la détermination du « cycle seuil » (ou cycle threshold, C_T), c'est-à-dire le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour que le niveau de fluorescence émis par les fragments amplifiés dépasse un certain seuil (figure IV.5). Chaque réaction de qPCR comprend, en plus des échantillons, les éléments suivants :

- une gamme standard
- un témoin négatif
- un témoin positif

La gamme standard permet de déterminer la relation entre le cycle seuil mesuré par la qPCR et le nombre de copies du gène cible (figure IV.6). Trois gammes standard ont été réalisées. La courbe standard ADN_r18S est réalisée à l'aide d'un gène artificiel (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) contenant une séquence partielle du gène de l'ADN_r18S (2500 paires de bases) de *Penicillium aurantiogriseum* incluant les amorces nu-SSU-0817-F et nu-SSU-1196-R et cloné dans un plasmide pGEM (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne). Chaque gamme standard est tracée à partir de triplicats, pouvant aller de 10^1 à 10^9 copies du plasmide pGEM.

La courbe standard archée est réalisée à l'aide d'un gène artificiel (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) contenant une séquence partielle du gène de l'ADN_r16S Archée (1403 paires de bases) de *Méthanobrevibacter smithii* DSM 861 incluant les amorces ARC787F et ARC1059R et cloné dans un plasmide pGEM (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne). Chaque gamme standard est tracée à partir de triplicats, pouvant aller de 10^1 à 10^9 copies du plasmide pGEM.

La courbe standard bactérie est réalisée à partir de dilutions de l'ADN génomique d'une souche de *Escherichia coli* ATCC 15597 disponible au laboratoire. Chaque gamme standard est tracée à partir de triplicatas, pouvant aller de 10^1 à 10^9 copies de l'ADN génomique.

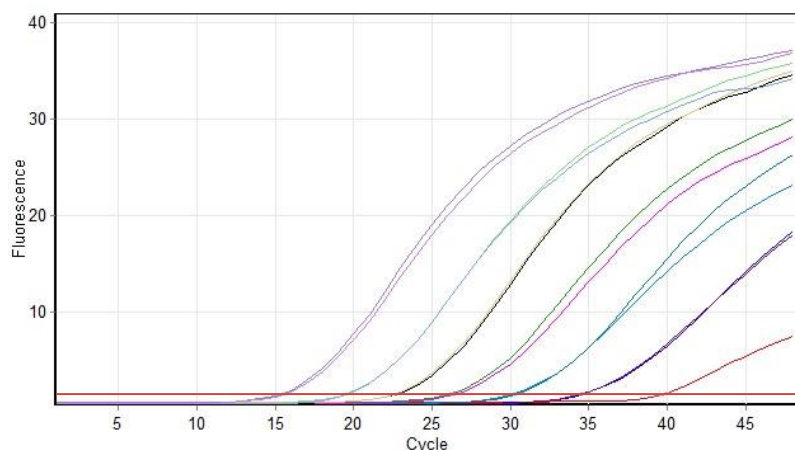


Figure IV.5. Exemple de courbes d'amplifications obtenues pour la qPCR ADNr18S permettant de déterminer le cycle seuil (trait horizontal rouge).

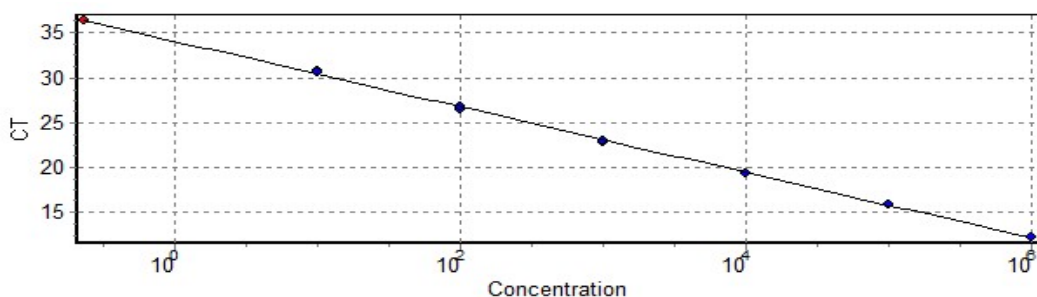


Figure IV.6. Exemple de gamme standard pour la qPCR ADNr18S, permettant de relier le nombre seuil de cycles (C_T) au nombre de copies d'ADNr18S.

3. Résultats et discussion

3.1. Localisation de la communauté microbienne responsable de la dégradation de la pectine

L'évolution globale de la dégradation de la pectine par la microflore extraite de la plante, du système racinaire, du sol cultivé et du sol non-cultivé à deux différentes températures 27°C et 37°C est présentée sur la figure IV.7. L'analyse de ces résultats révèle que les différents compartiments (sols, tige, système racinaire) possèdent la capacité à dégrader la pectine. Les résultats obtenus ne sont cependant pas surprenants puisque les sols et les plantes constituent des écosystèmes complexes avec une biodiversité importante pouvant présenter toutes des potentialités de dégradation de la pectine [16][17]. Les microorganismes apparaissent comme des acteurs majeurs des agrosystèmes, au travers de leur contribution à la dynamique des éléments nutritifs, à la croissance et au développement des plantes et la dégradation de la matière organique [18][19]. Ribeiro et al. [16] ont montré que, quel que

soit le sol considéré (lieu, teneur en argile), un socle commun de populations microbiennes colonise ces sols cultivés. Néanmoins, les abondances relatives de ces groupes diffèrent. Dans notre cas, les résultats obtenus pourraient effectivement s'expliquer par le développement de communautés microbiennes dont la composition (espèces présentes) est similaire, quel que soit le compartiment, ou par un phénomène de redondance fonctionnelle [20]. Différents groupes microbiens ont la capacité à assurer la dégradation de la pectine, certains étant plus adaptés à croître dans un compartiment (système racinaire, partie aérienne de la plante, sol) que dans un autre, leur activité métabolique pouvant dépendre également de la température.

Pour chaque compartiment et pour chaque température, le temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la quantité initiale de pectine ou temps de demi-réaction a été estimé. Pour cela, nous avons recherché si les cinétiques de dégradation de la pectine à 27 et 37°C pouvaient être assimilées à une cinétique d'ordre 1 ou d'ordre 2. Les résultats obtenus semblent indiquer que la cinétique de dégradation de la pectine est similaire, quelle que soit la température. Les profils de dégradation de la pectine à 27 et 37°C pourraient être assimilés à des cinétiques d'ordre 1. Les temps de demi-réaction sont présentés dans le tableau ci-dessous. Une analyse comparative a été réalisée pour différentes températures (27 et 37°C) pour chaque compartiment testé.

Tableau IV.3. Estimation de $t_{1/2}$ et $t_{1/4}$ (jours) pour chaque compartiment et à chaque température testée. SC : Sol cultivé ; SR : Système racinaire ; SNC : Sol Non Cultivé

Compartiment	SC		Tige		SR		SNC	
	$t_{1/2}$	$t_{1/4}$	$t_{1/2}$	$t_{1/4}$	$t_{1/2}$	$t_{1/4}$	$t_{1/2}$	$t_{1/4}$
27°C	1,7	4,3	2,0	6,0	2,5	4,9	2,6	4,9
37°C	2,6	5,8	3,8	7,0	2,2	5,5	4,2	8,6

D'après les résultats obtenus, la dégradation de la pectine semble être favorisée à une température de 27°C, excepté pour le système racinaire. Dans ce cas, le $t_{1/2}$ est similaire quelle que soit la température. Il convient de rappeler que la cinétique de rouissage est plus lente lorsque les températures sont élevées (températures maximales supérieures à 40°C en période estivale) qu'en période automnale (températures de l'ordre de 25°C) (chapitre II). Cette observation pourrait être reliée à l'activité pectinolytique qui serait favorisée dans des conditions de température proches de 25°C. Les enzymes pectinolytiques seraient donc adaptées pour fonctionner dans des conditions de mésophilie (25-30°C).

Il convient de noter que cette approche permet d'accéder seulement à des résultats préliminaires qui mériteraient d'être approfondis.

Il aurait été notamment pertinent de mesurer la quantité de biomasse issue de chaque compartiment pour réaliser une analyse comparative entre les différents compartiments, ce qui n'a pas pu être réalisé dans le cadre de la thèse.

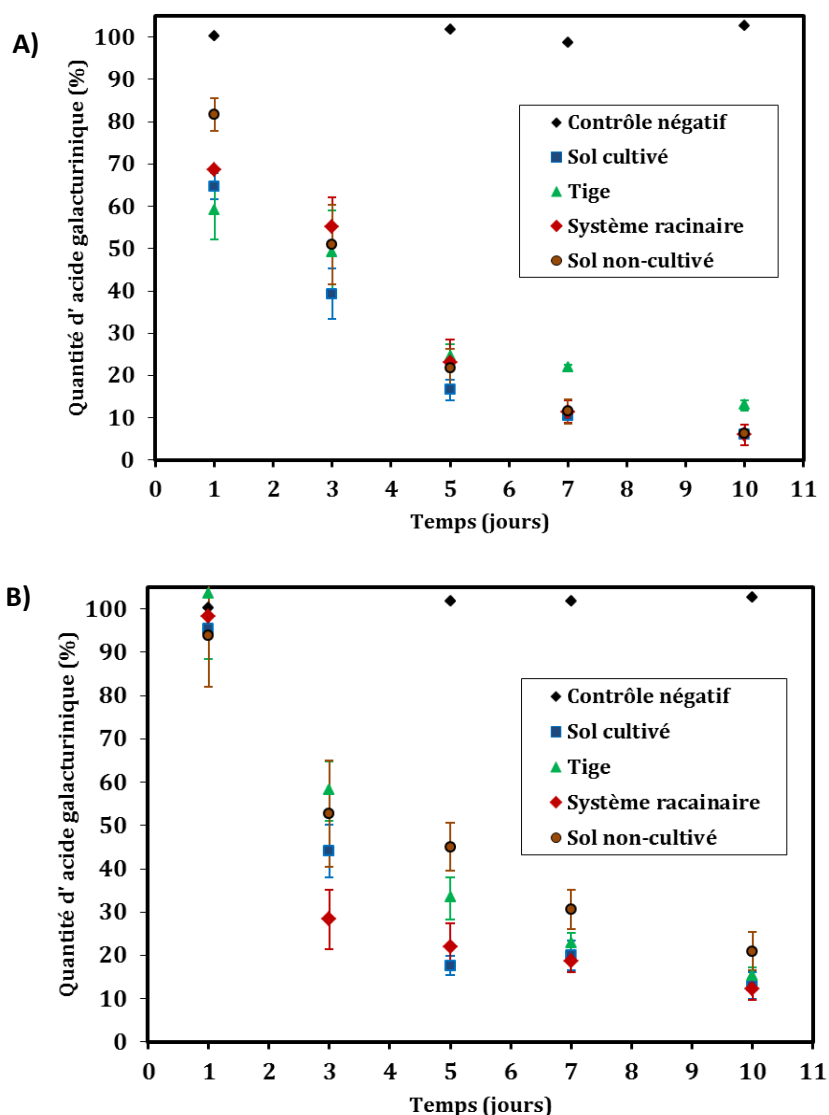


Figure IV.7. Cinétique de dégradation de la pectine par les communautés microbiennes extraites de différents compartiments : sol cultivé, système racinaire, tige (50-150 cm de hauteur), sol non cultivé. A : Essai réalisé à 27°C ; B. Essai réalisé à 37°C.

3.2. Densités de peuplement des communautés bactérienne et fongique

Les densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques à la surface de la tige et sur le sol cultivé ont été déterminées par qPCR au cours du processus de

rouissage pour différentes périodes de la récolte (fin de floraison et période de semence) lors de la culture réalisée en 2017 (figure IV.8).

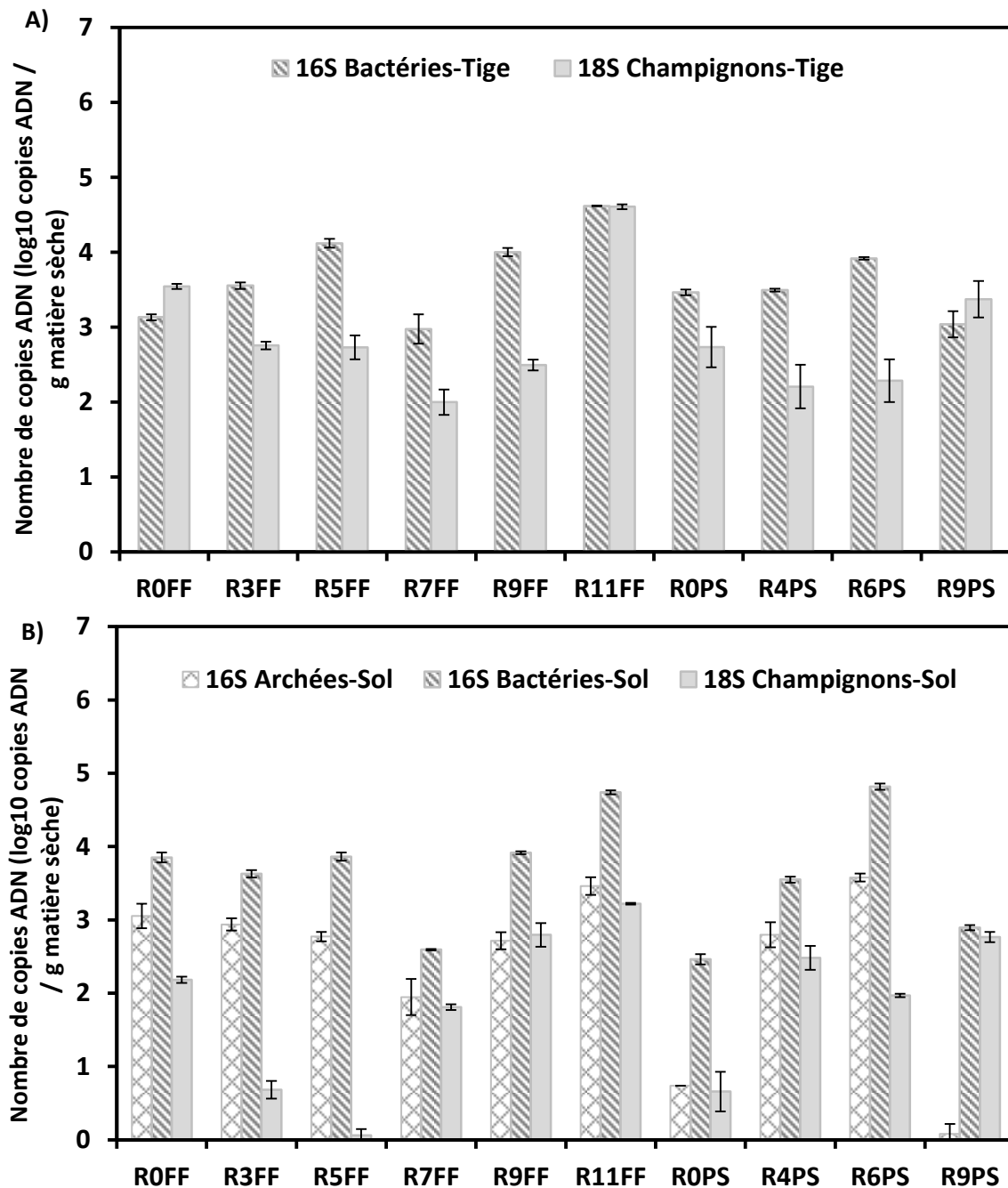


Figure IV.8. Evolution des densités de peuplement des communautés archées, bactériennes et fongiques déterminées à partir des tiges et du sol cultivé pendant le rouissage des tiges récoltées en fin de floraison (FF) ou lors de la période de semence (PS). A. Tige ; B. Sol cultivé.

La comparaison des valeurs de densité obtenues à partir du sol cultivé et de la tige met en évidence que les archées n'ont pas été détectées par qPCR sur la tige révélant ainsi que celles-ci sont largement minoritaires sur la plante. Les conditions environnementales

(humidité, température, disponibilité en nutriments et sources de carbone et d'énergie au niveau de la tige ne semblent pas favoriser le développement de ce groupe.

Une évolution similaire des valeurs de densité de peuplement au niveau du sol cultivé et de la tige est observée, celle-ci étant plus marquée pour le rouissage mis en œuvre à partir des tiges coupées en fin de floraison que pour celles coupées pendant la période de semence. Les valeurs de densités de peuplement des bactéries et micromycètes colonisant les tiges sont plus stables pendant le rouissage des tiges coupées à la période de semence que celles observées dans le sol cultivé pendant cette même période. Il est probable que les conditions climatiques et plus particulièrement les précipitations aient un impact différent sur le développement de ces deux groupes dans le sol et sur les tiges. Ce résultat peut être également dû au développement de deux communautés dont les caractéristiques en termes de structure (composition, abondances relatives) et de fonctionnement (redondance fonctionnelle) diffèrent.

L'analyse de la dynamique temporelle des densités de peuplement obtenues à partir des tiges ne semble pas révéler de tendance nette liée à une augmentation notable des valeurs de densité des bactéries et des micromycètes. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'effet du retournement des tas sur la structure des communautés microbiennes se développant sur la tige. Djemiel et al. [17][16] ont effectivement mis en évidence l'effet du retournement des andains sur la structure des communautés bactérienne et fongique.

Néanmoins, les niveaux de densités de peuplement de la communauté fongique tendent à augmenter en fin de période de rouissage pour atteindre des valeurs proches de 10^5 et 10^4 copies d'ADN g^{-1} matière sèche concernant le rouissage des tiges récoltées en fin de floraison et en période de semence respectivement. Concernant la communauté bactérienne, une évolution semblable est observée pour les tiges récoltées en fin de floraison (de 10^3 à 10^5 copies d'ADN g^{-1} matière sèche) alors que les niveaux de densité restent stables autour de $5 \cdot 10^3$ copies d'ADN g^{-1} matière sèche pour les tiges coupées en période de semence. Ces résultats semblent corroborer l'importance des micromycètes dans ce processus de rouissage par la production d'exoenzymes pectinolytiques [7]. Tout récemment, Djemiel et al. [17] ont également révélé que, dans le cas du rouissage du lin, la communauté bactérienne possède la capacité de produire des enzymes pectinolytiques. Ce résultat pourrait également s'expliquer par un développement de la microflore favorisée par les conditions climatiques à savoir des températures homogènes (autour de $20^\circ C$) et de fortes précipitations (jusqu'à 100 mm) enregistrées pendant la 11^{ème} semaine de rouissage.

Cependant, une étude plus approfondie de la dynamique temporelle de la structure des communautés microbiennes totales et fonctionnelles est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes biologiques qui se produisent au cours du rouissage en champ et pour identifier les populations directement impliquées dans la dégradation des composés pectiques.

4. Conclusion

Ce chapitre rassemble quelques résultats obtenus dans le cadre d'une approche microbiologique du rouissage.

La microflore localisée dans différents compartiments (sol cultivé ou non, tige, système racinaire) a la capacité à dégrader la pectine. En outre, la dégradation de la pectine semble être favorisée à des températures de 25-30°C.

L'étude de la dynamique temporelle des densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques extraites des tiges de chanvre à différents temps de rouissage semblent indiquer une augmentation des niveaux de densités de peuplement de la communauté fongique en fin de période de rouissage, quelle que soit la période de récolte des tiges. Concernant la communauté bactérienne, une évolution semblable est observée pour les tiges récoltées en fin de floraison alors que les niveaux de densité restent stables pour les tiges coupées en période de semence. Ces résultats semblent corroborer l'importance des micromycètes et de certaines populations bactériennes dans ce processus de rouissage par la production d'exoenzymes pectinolytiques.

La mesure des densités de peuplement n'est pas suffisante pour comprendre les mécanismes biologiques du rouissage. L'étude de la dynamique temporelle de la structure des communautés bactérienne et fongique par la métagénomique permettrait non seulement d'identifier les populations présentes mais aussi de mieux comprendre les phénomènes de succession de populations survenant pendant le rouissage lors des changements des conditions environnementales (température, précipitations,...) et potentiellement l'isolement et la qualité des fibres à l'issue du rouissage. De plus, l'analyse du protéome permettrait également d'identifier les enzymes impliquées dans la dégradation des ciments pectiques pendant le rouissage et de cibler la communauté réellement active dans la dégradation des pectines.

Références

- [1] Bourmaud A, Beaugrand J, Shah DU, Placet V, Baley C. Towards the design of high-performance plant fibre composites: How can we best define the diversity and specificities of plant cell walls? *Prog Mater Sci* 2018;97:347–408.
- [2] Mazian B, Bergeret A, Benezet J-C, Malhautier L. Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering. *Ind Crops Prod* 2018;116:170–81.
- [3] Akin DE. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2008;2:288–303.
- [4] Montella S, Ventorino V, Lombard V, Henrissat B, Pepe O, Faraco V. Discovery of genes coding for carbohydrate-active enzyme by metagenomic analysis of lignocellulosic biomasses. *Sci Rep* 2017;7:42623.
- [5] Ventorino V, Aliberti A, Faraco V, Robertiello A, Giacobbe S, Ercolini D, et al. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci Rep* 2015;5:8161.
- [6] Voříšková J, Baldrian P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J* 2013;7:477–86.
- [7] Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-Gleixner K, Ellersdorfer G, Roschitzki B, et al. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *ISME J* 2012;6:1749–62.
- [8] Cardenas E, Kranabetter JM, Hope G, Maas KR, Hallam S, Mohn WW. Forest harvesting reduces the soil metagenomic potential for biomass decomposition. *ISME J* 2015;9:2465–76.
- [9] Brown AE, Sharma HSS. Production of polysaccharide-degrading enzymes by saprophytic fungi from glyphosate-treated flax and their involvement in retting. *Ann Appl Biol* 1984;105:65–74.
- [10] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, et al. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and Europe. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3950–6.
- [11] Cabrol L, Malhautier L, Poly F, Lepeuple AS, Fanlo JL. Assessing the bias linked to DNA recovery from biofiltration woodchips for microbial community investigation by fingerprinting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:779–90.
- [12] Normand P, Caumette P, Goulas P, Pujic P, Wisniewski F. Adaptations des procaryotes à leurs biotopes et aux conditions physico-chimiques dans les milieux naturels ou anthropisés. 2011.
- [13] Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids 1973;489:484–9.

- [14] Yu Y, Lee C, Kim J, and Hwang S, "Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction," *Biotechnol. Bioeng.*, 2005: 670–679
- [15] Borneman J and R. J. Hartin R.J, "PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000: 4356–4360, 2000.
- [16] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;4471–84..
- [17] Djemiel C, Grec S, Hawkins S. Characterization of bacterial and fungal community dynamics by high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding during flax dew-retting. *Front Microbiol* 2017;8:1–16.
- [18] Bardgett RD, Chan KF. Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem* 1999;31:1007–14.
- [19] Brussaard L, de Ruiter PC, Brown GG. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric Ecosyst Environ* 2007;121:233–44.
- [20] Cabrol L, Malhautier L. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90:837–49.

CHAPITRE V

**IMPACT DU ROUISSAGE EN CHAMP ET D'UN
ROUISSAGE ACCELERE AU LABORATOIRE SUR LES
PROPRIETES D'UN BIOCOMPOSITE POLYPROPYLENE
/FIBRES DE CHANVRE**

Introduction du chapitre

Les fibres végétales ligno-cellulosiques, telles que les fibres de chanvre, sont de plus en plus utilisées comme une alternative aux fibres non renouvelables, comme les fibres de verre, pour le renforcement des matrices polymères. Ces tiges de chanvre, desquelles sont extraites les fibres techniques, sont soumises à une étape préalable de rouissage après leur récolte afin de séparer les faisceaux de fibres de la partie ligneuse centrale de la tige. Les mécanismes mis en jeu lors de cette phase de rouissage sont malheureusement mal définis à ce jour. Il est donc de prime importance de contribuer à une meilleure compréhension de ceux-ci dans le contexte actuel de développement des biocomposites renforcés de fibres de chanvre.

Les chapitres précédents se sont focalisés sur la compréhension du procédé de rouissage en examinant différents critères dont les caractéristiques intrinsèques des fibres, les densités de peuplement des micromycètes, bactéries et archées (chapitre II et IV). A ces critères, s'en est rajouté un troisième, rarement utilisé jusqu'à présent, l'évolution des émissions de composés organiques volatils (chapitre III). De plus, l'influence des conditions météorologiques et du stade de développement de la plante (début de floraison, fin de floraison, période de semence) a fait l'objet d'une attention particulière.

Dans ce **chapitre V**, l'impact du rouissage des fibres de chanvre sur les propriétés fonctionnelles de biocomposites polypropylène/fibres de chanvre (30% en masse) a été étudié. Des fibres de chanvre en fin de floraison rouies en champ (rouissage lent) et des fibres de chanvre en période de semence rouies en conditions contrôlées (rouissage rapide) ont été incorporées dans une matrice polypropylène. Différentes propriétés du biocomposite ont été examinées :

Les propriétés thermiques (par analyse thermogravimétrique ATG), la microstructure (par calorimétrie différentielle à balayage DSC) et les propriétés mécaniques en traction des biocomposites ont été suivies en fonction de la durée de rouissage (jusqu'à 11 semaines) et de la période de récolte et du type de rouissage. Des observations au microscope électronique à balayage ont été effectuées sur les surfaces de rupture après les essais mécaniques de traction.

Les résultats mettent en évidence que, quelle que soit la période de récolte et le type de rouissage, la stabilité thermique du biocomposite augmente progressivement avec la durée du rouissage en raison de l'amélioration de la stabilité thermique des fibres elles-mêmes. Cependant, la cinétique apparaît différente selon la période de récolte. La résistance à la

traction et le module de Young des biocomposites réalisés avec des fibres récoltées à la période de fin de floraison et rouies en champ augmentent progressivement jusqu'à un maximum (5 semaines), puis diminuent avec un rouissage prolongé. En revanche, pour les biocomposites réalisés avec des fibres récoltées à la période de semence et rouies dans des conditions accélérées, leurs propriétés mécaniques diminuent rapidement en raison de l'effet de sur-rouissage sur la qualité des fibres de chanvre. Ce résultat peut être relié au fait que le rouissage de chaque période de récolte a été réalisé sous des conditions climatiques spécifiques. En résumé, les propriétés intrinsèques des fibres sont des paramètres importants qui influencent les propriétés des biocomposites. Par conséquent, il est nécessaire de mesurer/contrôler le degré du rouissage pour éviter un sous ou un sur-rouissage afin d'optimiser la qualité du renforcement des composites.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication qui sera prochainement soumise dans « Composites part A : Applied Science and Manufacturing »

Impact of field retting and accelerated retting performed in a lab-scale pilot unit on the properties of hemp fibres/polypropylene biocomposites

Brahim Mazian^{1,2}, Anne Bergeret^{1*}, Jean-Charles Benezet¹, Luc Malhautier²

¹Centre des Matériaux des Mines d'Alès, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

²Laboratoire du Génie de l'Environnement Industriel, IMT Mines Alès, Université de Montpellier, 6 avenue de Clavières, 30319 Alès Cedex, France

Abstract

Lignocellulosic fibres such as hemp fibres have emerged as an attractive alternative to nonrenewable fibers in the reinforcements in polymer composites. These fibres are subjected to pretreatment prior fibre extraction. In hemp industry, the retting is the first treatment applied to the plant after harvesting in order to separate the fibres from the central woody part of the stem. This treatment is not well defined and need to be more understood because of its importance for the development of high-performance hemp biocomposites. In this study, the influence of a field retting treatment and of a lab-scale retting treatment (accelerated retting conditions) of hemp fibres harvested at the end of flowering (EF) and at the seed maturity (SM) respectively, on hemp fibres /polypropylene biocomposites was investigated. The results highlight that, regardless the harvest period and type of retting, the thermal stability of biocomposite increased gradually with retting duration due the increase of thermal stability of the fibres. However, the kinetic of the thermal stability evolution during retting of biocomposites with fibres harvested at EF and SM is not identical, since each harvest period correspond to specific climatic conditions. Tensile strength and Young's modulus of the biocomposites reinforced with fibres harvested at EF increase gradually until reaching a maximum (5 weeks), and then decreased with a prolonged field retting. In contrast, for biocomposites reinforced with fibres harvested at SM and retted in accelerated conditions, tensile properties decreased rapidly due to an effect of over-retting treatment on the fibres quality.

1. Introduction

Due to environmental consideration and economic factors, plant fibres reinforced polymer composites (biocomposites) have acquired a remarkable interest over last decades. They are developed in many sectors, such as in building (decking), naval, automobile (interior equipment, cowls), and sports (surfboard) as an alternative of conventional fibers (e.g. glass or carbon) reinforced composites materials [1][2]. Besides their excellent mechanical properties and their lightening structures [3,4], these plant fibres reinforced composites can reduce the environmental impact [2], can be recycled while keeping the original properties [5], and their processing do not damage the processing equipment as natural fibres causes less surface abrasion. However, the incompatibility of these fibres with the polymer matrix and the variation of their quality in term of the morphology, chemical composition, physical and mechanical properties greatly reduce their high use as reinforcement in polymers for structural application [3,4,6-8].

Hemp plant fibres are one of the species that are used as reinforcement in polymers. These fibres are located at the periphery of the hemp stems in form of bundles containing several elementary fibres that are assembled together by an interface of amorphous polysaccharides (cementing compounds e.g. pectins) [9]. Each unitary fibre (or elementary fibre) is composed of concentric cylindrical walls and has a complex structure that contains the microfibrils of cellulose as basic units and matrix of amorphous polysaccharide including pectins, hemicelluloses and lignin [3,10]. The variation of amount of hemp fibres substances has an impact on their intrinsic mechanical properties [4,8,11] that play a key role in mechanical performance of final composite. In addition, the presence of certain substances such as pectins, waxes that bind the fibres together can prevent the hydroxyl groups of cellulose from interacting with polar polymer matrix. Therefore, removing of these substances and separation of the fibres to obtain individual fibres or smaller fibres bundles are needed to improve interfacial bonding between fibres and matrix in order to enhance the mechanical performance of final composite [7,12-14].

For this aim, many pre-treatments of the fibres have been developed to improve the intrinsic properties of the fibre and the adhesion between the fibre and matrix. i) Chemical treatment using silane, alkaline, acetylation ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and ethylene diamine tetra (methylene phosphonic acid) (EDTMPA) increases the compatibility between fibres and matrix [15-18], ii) Enzymatic treatment (e.g. endo-polygalacturonase, hemicellulases) [17,19] inducing a cleaner fibre surface which help to improve the

mechanical properties of fibre reinforced composites and iii) steam explosion [20–22]. Although these methods are reported in literature, the most widely used pretreatment in the hemp industry is field retting (also known as dew-retting) because it is inexpensive and easy to be applied [23]. The field retting treatment consists to cut and spread out the hemp plants on the field after harvesting period, so that the microorganisms (fungi and bacteria[24][25]) attack and colonize the stems producing a range of polysaccharide-degrading enzymes, especially pectinolytic which remove the components in the middle lamella (pectic substance) and allows the cortex fibres to be progressively separated [26,27]. This treatment is weather-dependent and is performed in empirical way in the field which led to a variation of the hemp fibres quality in term of division state of the fibres, thermal and mechanical properties [6,28–30]. Indeed, field retting can be considered as an advantage or an inconvenience depending of its degree. Therefore, it is necessary to control/master this treatment in order to avoid under or over retting.

The variation of fibres properties during field retting has an impact on the final properties reinforced polymer composites. Martin et al. [7] show that an increased field retting duration lead to an improvement of mechanical properties either of the flax fibres (from 792 MPa and 38 GPa for unretted fibres to 1036 MPa and 55 GPa for 19 days retted fibres) or of flax/polypropylene (PP) composite (27 MPa and 3.6 GPa for composite with unretted fibres to 35 MPa and 4.1 GPa). In another work, Sisiti et al. [13] compared unretted and retted hemp fibres reinforced polybutylene succinate (PBS) and found that retting treatment allows an enhanced adhesion between fibres and matrix, thus creating a stronger interface and therefore superior composite performances (28 MPa for composite with 30% of retted fibres and 22 MPa for composite with 30% of unretted fibres). To our knowledge, any case of biocomposite with over-retted fibres was reported in the literature.

Therefore, the objective of this work is to assess the influence of two types of retting (a field retting on one side and an accelerated retting performed in lab-scale pilot units on the other side), of the retting duration (up to 11 weeks) and of the harvesting period (end of flowering and seed maturity) on the properties of a polypropylene/30 wt% hemp fibres. Thermal stability and microstructure were surveyed using thermogravimetry analyses (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), respectively. Scanning electron microscopy observations were carried out on the tensile fracture surfaces after mechanical test.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

2.1.1. Hemp cultivation and sampling

Hemp (*Cannabis sativa L.*, Cultivar ‘Santhica 27’) was sown at a rate of 30kg/ha on 10th May, 2017 in the south of France (N 44.130673°, E 4.315895°) by CIVAM Chanvre Gardois (Le Bouquet, France). The hemp plants were harvested manually at the end of flowering (EF) (21th august, 2017), and at the seed maturity (SM) (26th September, 2017) (figure V.1). The stems lengths at EF and SM are 1.56m and 1.58m, respectively.

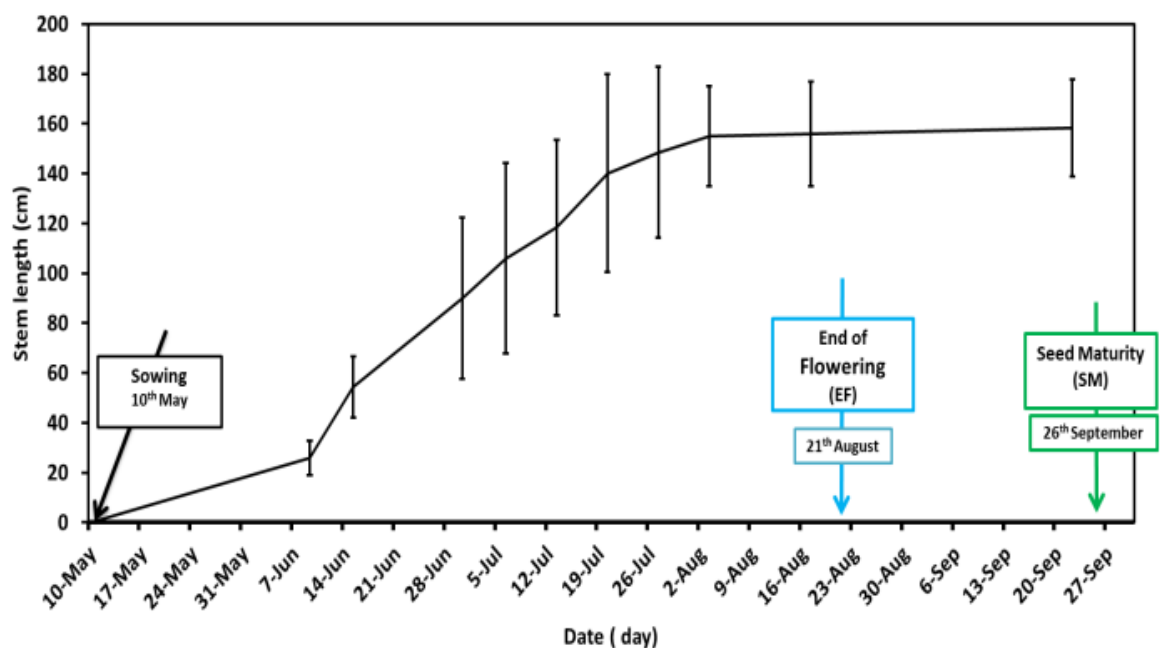


Figure V.1. Hemp plant growth

2.1.2. Retting conditions

After each harvest period, the plants were subjected to specific retting treatments.

- The plants harvested at the end of flowering were left in the field for retting (figure V.2)



Figure V.2. Field retting (left : non-retted stems ; middle : 3 weeks retted stems ; right : 9 weeks retted stems)

- The plants harvested at the seed maturity were retted using two designed lab-scale pilot units (figure V.3). Two equivalent lab-scale pilot units were used for performing the retting in controlled conditions, especially in terms of humidity and air speed. These lab-scale pilot units consist of two parts: i) the upper part that is transparent in polymethyl methacrylate (PMMA). The dimensions of this part are 1m (length) x 1m (width) x 45 cm (height). ii) the lower part is in PolyVinyl Chloride (PVC) with dimensions of 1m (length) x 1m (width) x 25 cm (height), filled with gravel / clay balls and containing 15 cm of soil retrieved directly from the field where the hemp was sown. The ventilation of this lab-scale pilot unit is ensured by suction of air through a perforated surface. The air speed sweeping the surface of the soil is representative of a calm time, 0.2 m s^{-1} . Intermittent watering of the soil and of the stems dropped and lined on the soil surface is performed 4 times for 24 hours to maintain the relative humidity at around 75%.

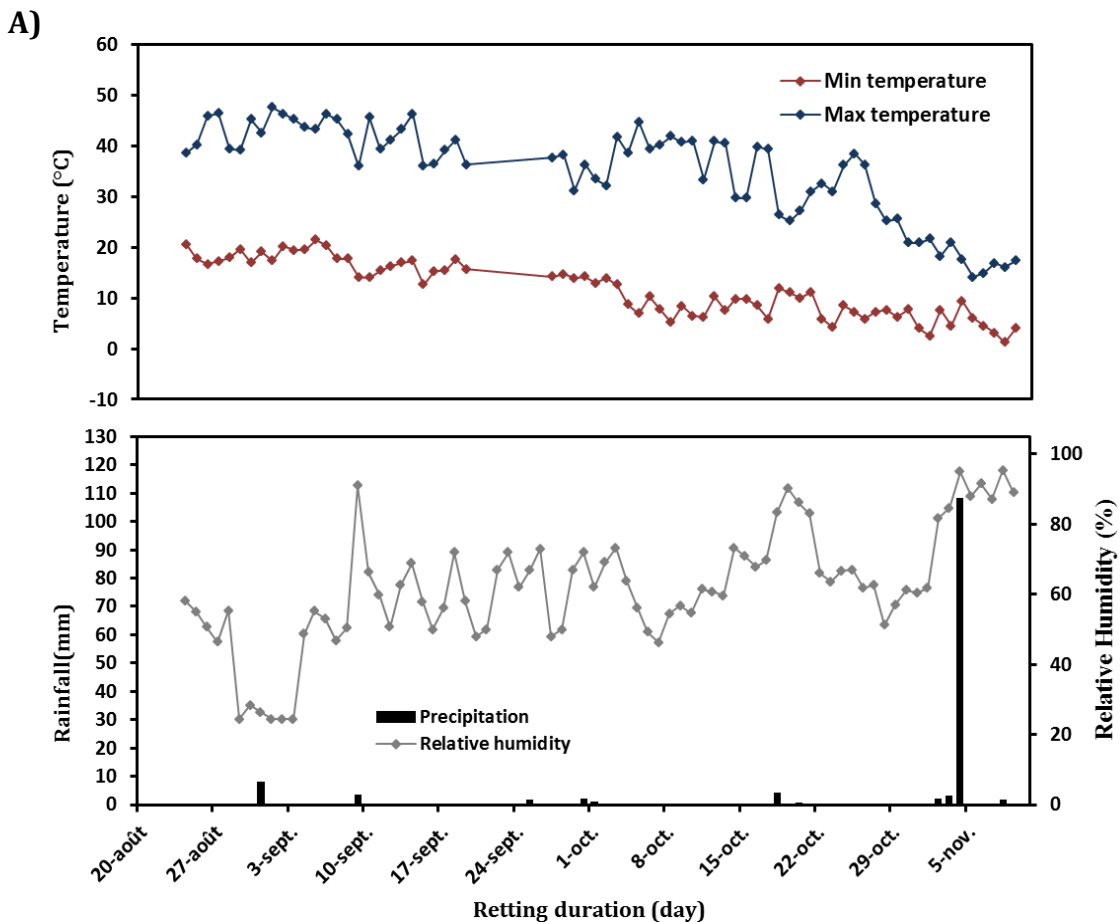


Figure V.3. Lab-scale pilot units used for a controlled and accelerated retting

2.1.3. Weather conditions

During field retting of the stems harvested at the end of flowering, the monitoring of the temperature and the relative humidity was realized using the hygro-buttons sensors (Progesplus, Carquefou, France) which are put in contact with the soil in the field. In addition, daily average precipitation data were acquired from Météo France (meteorological station Méjannes-le-Clap). For retting in the lab-scale pilot units, these parameters were followed using thermo-hygrometer Kimo.

Figure V.4A shows the weather conditions during field retting of plants harvested at the end of flowering. During this field retting, the weather was hot, except two last weeks of treatment. Indeed, the average maximum and minimum temperature between the 1st week and the 9th week are 40.2°C and 17.5°C, respectively, while during two last weeks of this period, they decreased to 26.3°C and 7.1°C, respectively. As concern the retting conditions for the stems harvested at SM and retted in the lab-scale pilot unit (figure V.4B), the temperature and relative humidity are homogeneous. The relative humidity and the temperature are around of 75% and between 10-20°C, respectively, throughout treatment.



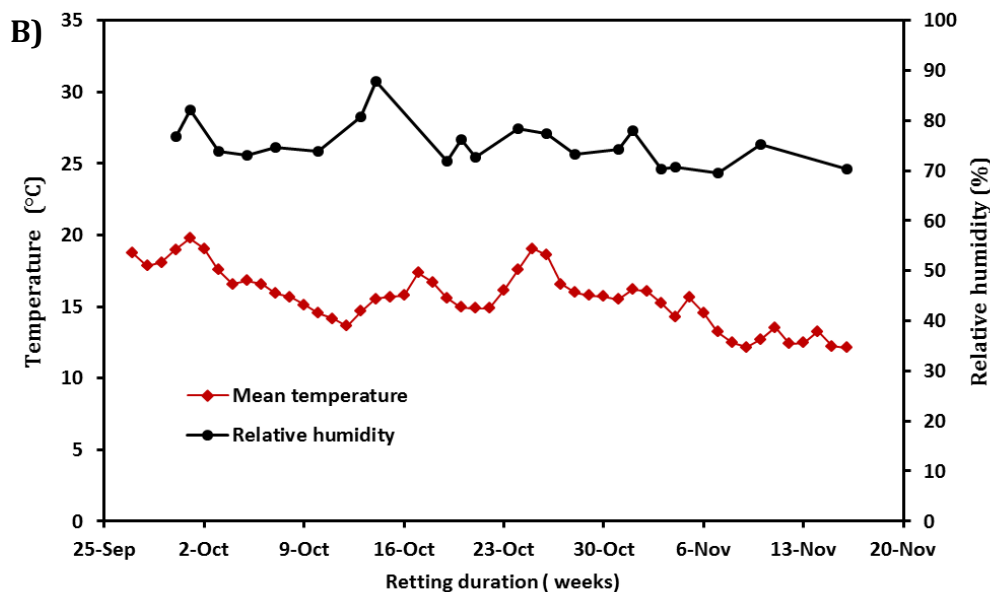


Figure V.4. Daily weather conditions (minimum and maximum temperature, relative humidity and precipitation) (A) during field retting of stems harvested at EF and (B) during artificially/controlled retted stems harvested at SM in lab-scale pilot unit

2.1.4. Matrix

The polymer used as a matrix for manufacturing of composite materials is a polypropylene (PP, grade H733-07) with a melt flow rate of 7.5g/10 min (230°C, 2.16kg) provided by Braskem (Brazil). In order to improve the compatibility between the matrix and the reinforcements, 1 wt% maleic anhydride grafted polypropylene (MA-g-PP, Orevac CA100) with 1wt% grafting rate purchased from Arkema (France), was added as coupling agent. A hemp fibres loading of 30 wt% was chosen.

2.1.5. Composite material processing

After a manual extraction of hemp fibres from the stems, the fibres and the coupling agent (MA-g-PP) have been dried before processing for 24h at 60°C in a vacuum to eliminate residual water. Granules of PP and MA-g-PP were mixed with hemp fibres using a twin-screw micro-compounder (DSM Xplore, microcompounder, Geleen, The Netherlands, 15cm³) with the temperatures profile of 180°C (feeder) – 180°C (middle screw) - 200°C (die) and a screw speed of 80rpm.

The extruded pellets were dried for 3 days at 60°C, then injected molded using IM15 Zamak Mercator machine (Skawina, Poland) with a barrel temperature of 195°C. Molded samples are tensile dogbones specimens corresponding to the ISO 527-2 type-1BA to obtain ISO ½

dogbone specimens. Table V.1 gives the different biocomposites for each selected growth stage. An additional biocomposite was elaborated without MA-g-PP in the case of hemp fibres harvested at SM period and unretted, so called later R0PPSMref.

Table V.1. Biocomposites used in the study

Retting time (day)	0	14	21	35	77
Retting time (week)	0	1	3	5	11
Samples name	ROPPEF	-	R3PPEF	R5PPEF	R11PPEF
	R0PPSM	R1PPSM	R3PPSM	R5PPSM	-

2.2. Experimental methods

2.2.1. Biocomposite thermal stability

The thermal stability of biocomposites was analyzed using a Perkin-Elmer Pyris-1 thermal analysis system. Samples of about 10 mg were heated in nitrogen from 30°C to 700°C at the rate of 10°C/min. The mass variation was recorded as a function of temperature. A differential thermogravimetric analysis (DTGA) curve was collected from the TGA analysis.

2.2.2. Mechanical characterization of biocomposites

Before mechanical test, biocomposites were conditioned for 3 days at 23 ± 2 °C and $50 \pm 10\%$ RH. Then, tensile test characterization was performed in the same hygrothermal conditions on ISO 1A dog-bone samples. A Zwick TH 0101 apparatus machine equipped with an extensometer Zwick “clip-on” for the determination of the Young's modulus was used. The displacement speed was set to 1mm/min for the tensile modulus measurements, and 20 mm/min for the break property measurements. The tests were carried out at least four times for each specimen to evaluate the reproducibility.

2.2.3. Microstructure characterization of biocomposites

The crystallinity behavior of biocomposites was assessed through differential scanning calorimetry (DSC, Perkin Elmer) using a Q100 TA Instruments® equipped with a cooling attachment, under a nitrogen atmosphere. The measurements were performed under nitrogen atmosphere at a 20 mL.min⁻¹ flow. Two heating steps from 30°C to 220°C at 10°C/min with an intermediate cooling step at 10°C/min were carried out. Samples of about 10 mg were analyzed in standard aluminum DSC pans. Melting enthalpy was determined from the 1st and 2nd heating steps.

The crystallinity ratio was calculated according to the equation below:

$$x = \frac{\Delta H_{m1}}{W \times \Delta H_{m100\%}} \times 100 \quad Eq. (1)$$

$$x = \frac{\Delta H_{m2}}{W \times \Delta H_{m100\%}} \times 100 \quad Eq. (2)$$

Where ΔH_{m1} and ΔH_{m2} are the melting enthalpy obtained from the 1st and 2nd heating steps, respectively. W is the PP content by weight and ΔH_{m100} is the estimated melting enthalpy of a fully crystalline PP (209 J.g⁻¹) [31].

2.2.4. Microscopic observations

After the mechanical tests, microscopic observations of the tensile fracture surfaces were carried out. The samples were sputter-coated with a thin layer of gold, and then analyzed through environmental scanning electron microscope (ESEM) Quanta FEG 200 (FEI Co.).

3. Results and discussion

3.1. Color of stems after different types of retting

The visual assessment of the stems and fibres color has been carried out during field retting and lab-scale pilot retting of the stems harvested at the end of flowering and seed maturity, respectively. It can be observed in the photograph (figure V.5), that the color of stems and fibres changes during plant growth from light green to yellow. This variation is related to decomposition of the chlorophyll that is responsible of green color was decomposed with the partial retention of carotenoids that emit yellow color [32–34].

During field retting of hemp stems harvested at EF, the color of fibres and stems change gradually and slowly from light green for unretted samples (R0EF), yellow for low retted samples (R1EF to R3EF), yellow with the presence of grey and black spot for medium retted samples (R4EF and R5EF) and black for highly retted samples (R9EF and R11EF). In contrast, for the samples of SM, the color changes rapidly from yellow (R0SM) to black after one week of retting. This indicates that the retting at the SM in lab-scale pilot was fast due to the homogeneous distribution of the temperature and relative humidity which are favorable conditions for a rapid development of microorganisms at the stems surface [6,35].

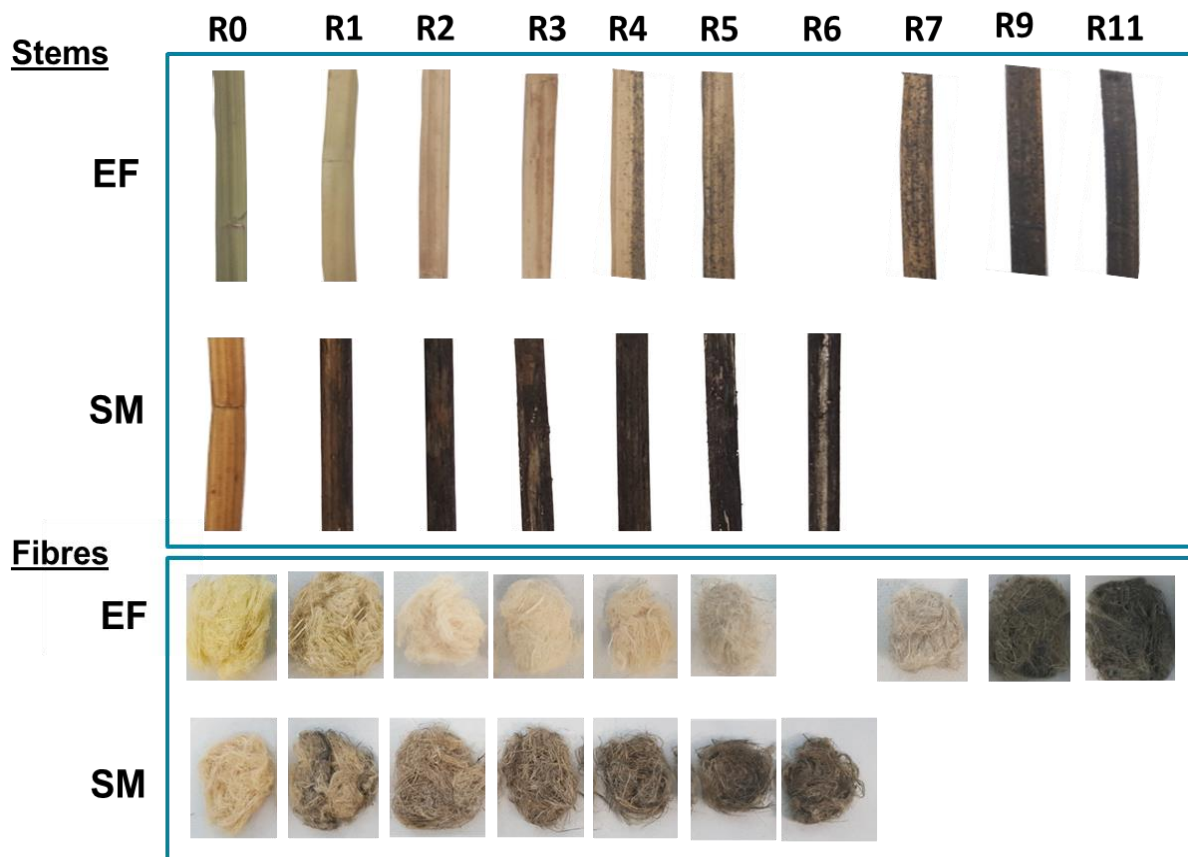


Figure V.5. Color change of the stems during field retting of the stems harvested at EF and during lab-scale retting of the stem harvested at SM. Corresponding color change of the fibres

3.2. Evolution of biocomposite thermal stability with hemp fibre retting

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out in order to assess the influence of field retting duration on the thermal performance of biocomposite. Figures V.6 and V.7 present the curves of TGA and corresponding DTGA respectively of neat PP and of biocomposites with fibres harvested at the EF period and then field retted and with fibres harvested at SM period and artificially retted in the lab-scale pilot unit.

The thermal degradation curve of neat PP gives evidence of a single weight-loss region located at 460°C. However, the degradation of the biocomposites occurs in three stages process, where the first one at about 200-280°C is associated to degradation of non-cellulosic components (pectins and hemicelluloses), the second stage at 340-380°C is attributed to decomposition of major component of fibres (cellulose) and the third stage at around 460-470°C is related to decomposition of polymer matrix.

As concerns the fibres harvested at EF period and field retted (figure V.6), TGA curves show different thermal behavior for biocomposites according to retting duration. From the derivative of the weight loss as a function of temperature, it can be seen on one hand that the increase of retting duration leads to an increase of thermal stability in the 200–400 °C temperature range corresponding to both non-cellulosic (pectins and hemicelluloses) and cellulose decompositions. On the other hand, it can be observed that, the portion of the pectins and hemicelluloses gradually decreased (peak intensity) with the retting duration owing to the microorganisms activity [6,29,35] which leads to an increase of cellulose degradation temperature until reaching the same temperature of the degradation of pure cellulose. Indeed, the removal of non-cellulosic components induces a higher structural order of cellulose that contains strong intramolecular and molecular hydrogen bonds that requires a higher degradation temperature to be broken-down [36,37]. The cellulose degradation temperature shifts from 335°C for R0PPEF to 342°C for R3PPEF , 350°C for R5PPEF and then to 360°C for R11PPEF. It can be concluded that biocomposite thermal behavior follows similar trends than fibres, since it was already observed in a previous study [6] and by Placet et al. [29] that an increased retting duration led to an improvement of fibres thermal stability.

As concerns fibres harvested at SM period and retted in the lab-scale pilot unit (figure V.7), the same behavior is observed. The cellulose degradation temperature increases from 352°C for R0PPSM, to 364°C for R3PPSM and 368°C for R5PPSM. Consequently, the thermal stability for the biocomposites is improved with increasing of retting duration in the lab-scale pilot unit.

Besides the thermal stability changes with retting duration, these results also allowed to highlight that the initial state according to plant growth is not similar. The fibres harvested at the seed maturity had fewer portions of non-cellulosic components and present higher temperature degradation of cellulose (352°C for R0PPSM) compared to the fibres harvested at end of flowering (335°C for R0PPEF). This means that at the seed maturity, the cellulose fraction of fibres is higher than that of fibres harvested at end of flowering. This initial difference is remaining all along the retting process (342°C for R3PPEF compared to 364°C for R3PPSM and 350°C for R5PPEF compared to 368°C for R5PPSM)

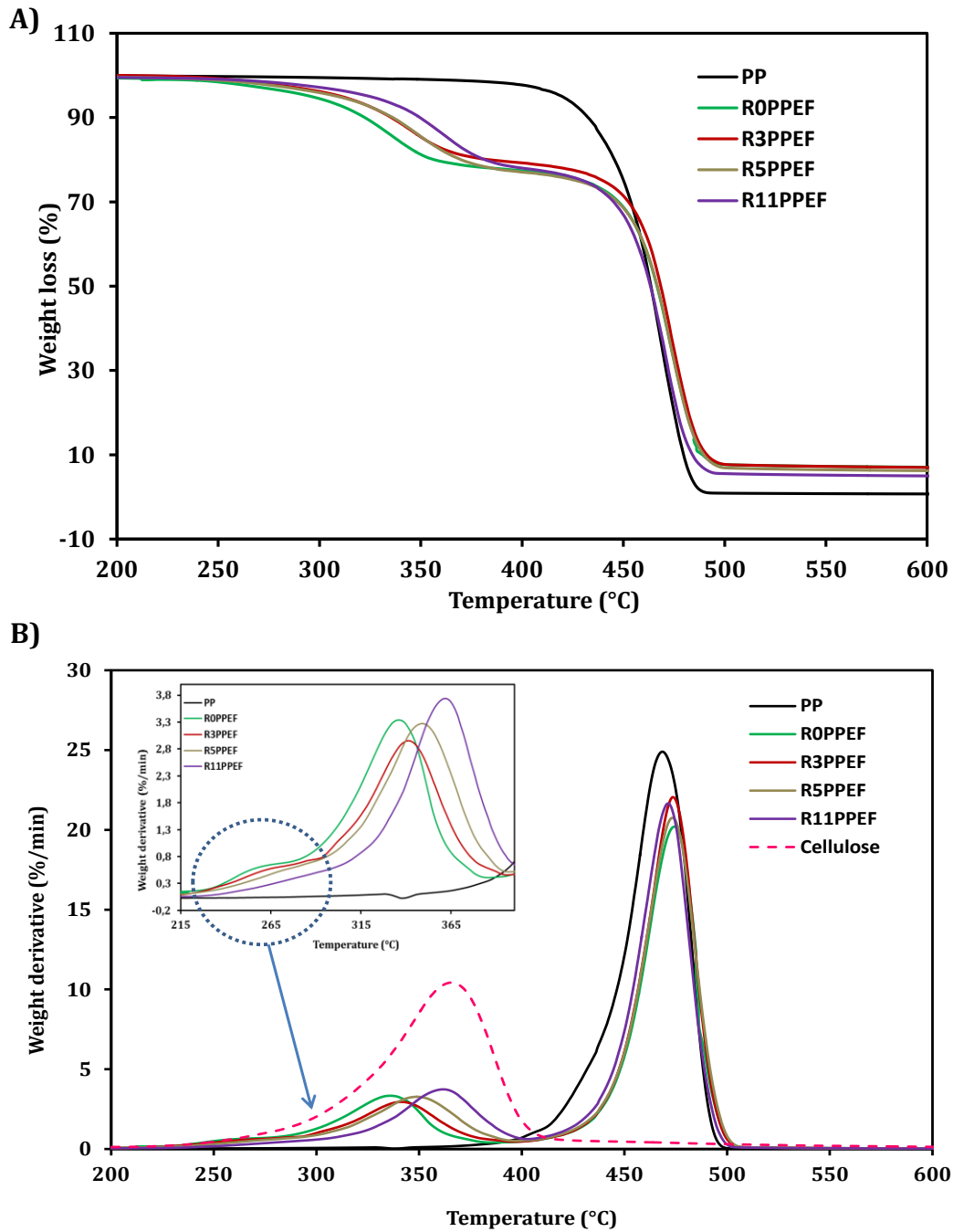


Figure V.6. TGA (A) and DTGA (B) curves of neat PP and biocomposites with fibres harvested at EF (ROPPEF) and field retted at different times (R3PPEF, R5PPEF and R9PPEF).

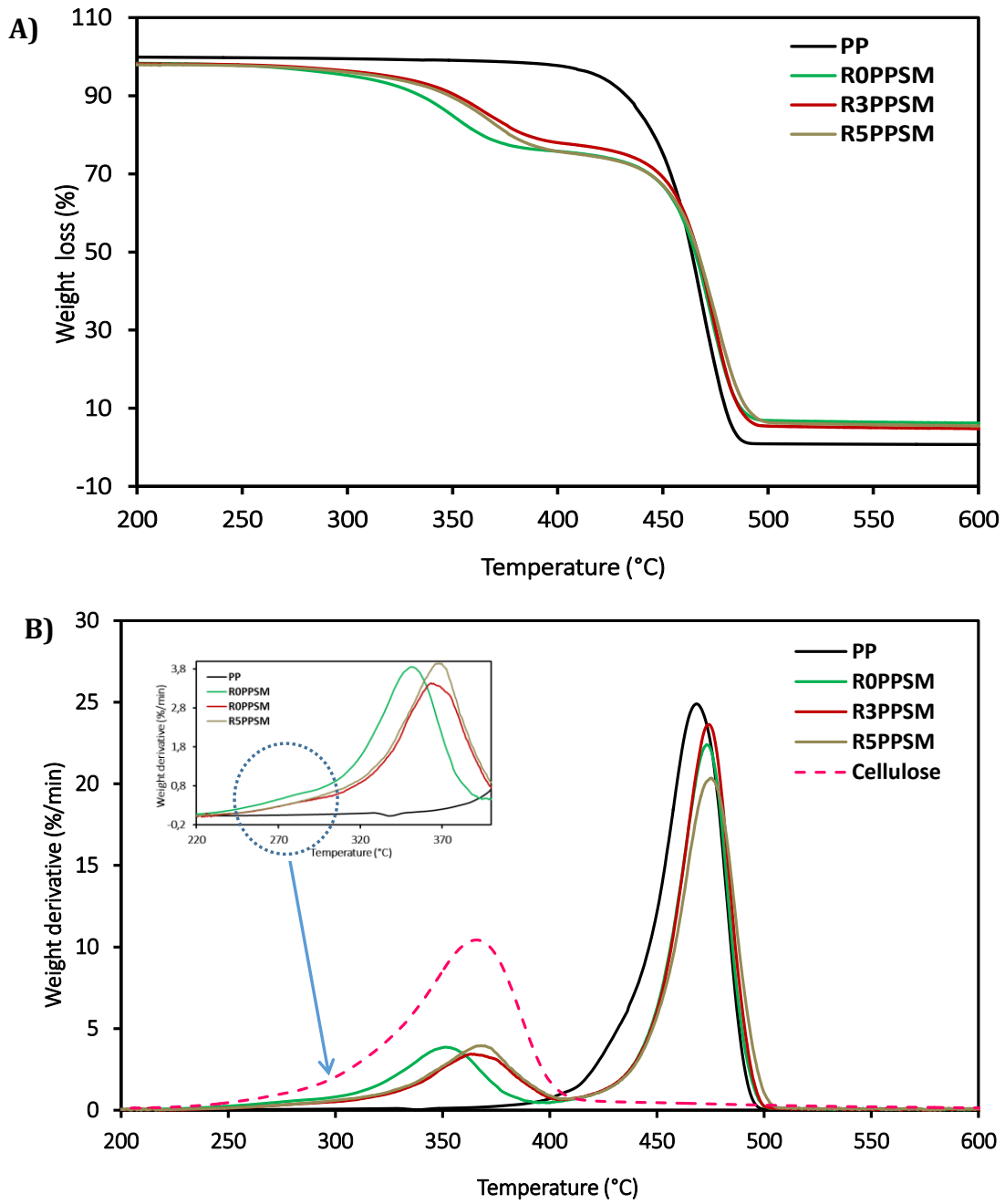


Figure V.7. TGA (A) and DTGA (B) of neat PP and biocomposite with fibres harvested at SM (R0PPSM) and accelerated retted in the lab-scale pilot unit at different times (R3PPSM and R5PPSM)

3.3. Change in biocomposite microstructure with hemp fibre retting

The crystallinity degree and the melting temperature for neat PP and the biocomposites were determined from the first and the second heating ramps (figure V.8). The melting enthalpy measured at first heat ramp is linked to the initial crystallinity which depends on the thermal background of the sample i.e. the processing steps. In the second ramp, the thermal background of the sample does not furthermore significantly influence the crystallization and retting treatment could only have an impact on the melting enthalpy measured in this ramp.

It can be observed that whatever retting duration, the type of retting and the harvest period, the addition of hemp fibres has a negligible influence on the melting temperature that remains stable at around of 168°C. In addition, the values of ΔH_{m1} and ΔH_{m2} decreased with addition of fibres to PP matrix, since fibres act as a diluent in the PP matrix [38,39]. Nevertheless, a comparison of crystallinity ratio for neat PP with that of PP in biocomposite show clearly higher values for the samples with fibres. This observation can explain that the fibres act also as a nucleating agent for the crystallization and the partial crystalline growth of PP, as already shown in the literature [38,39].

As concern the effect of retting on the crystallinity ratio, no trend could be observed either for composites with retted fibres harvested at EF or for composites with retted fibres harvested at SM. Indeed, for the first run, the crystallinity ratio of R0PPEF, R3PPEF, R5PPEF and R11PPEF are 49%, 44%, 45% and 45% respectively. The crystallinity ratio of R0PPSM, R1PPSM, R3PPSM, and R5PPSM are 43%, 44%, 39% and 46%, respectively. Results show also that crystallinity ratio is significantly higher in the second run than first one. Indeed, it varies from 54% for R0PPEF, to 49% for R3PPEF, 51% for R5PPEF, 48% for R11PPEF. As concern the composites reinforced with fibres retted in lab-scale pilot unit, their crystallinity ratio are 48% for R0PPSM, 48% for R1PPSM, 44% for R3PPSM and 51% R5PPSM. The results reveal also that the crystallinity ratio of composite reinforced with the fibres harvested at the end of flowering (R0PPEF) is slightly higher than that of composite with fibres harvested at the seed maturity (R0PPSM).

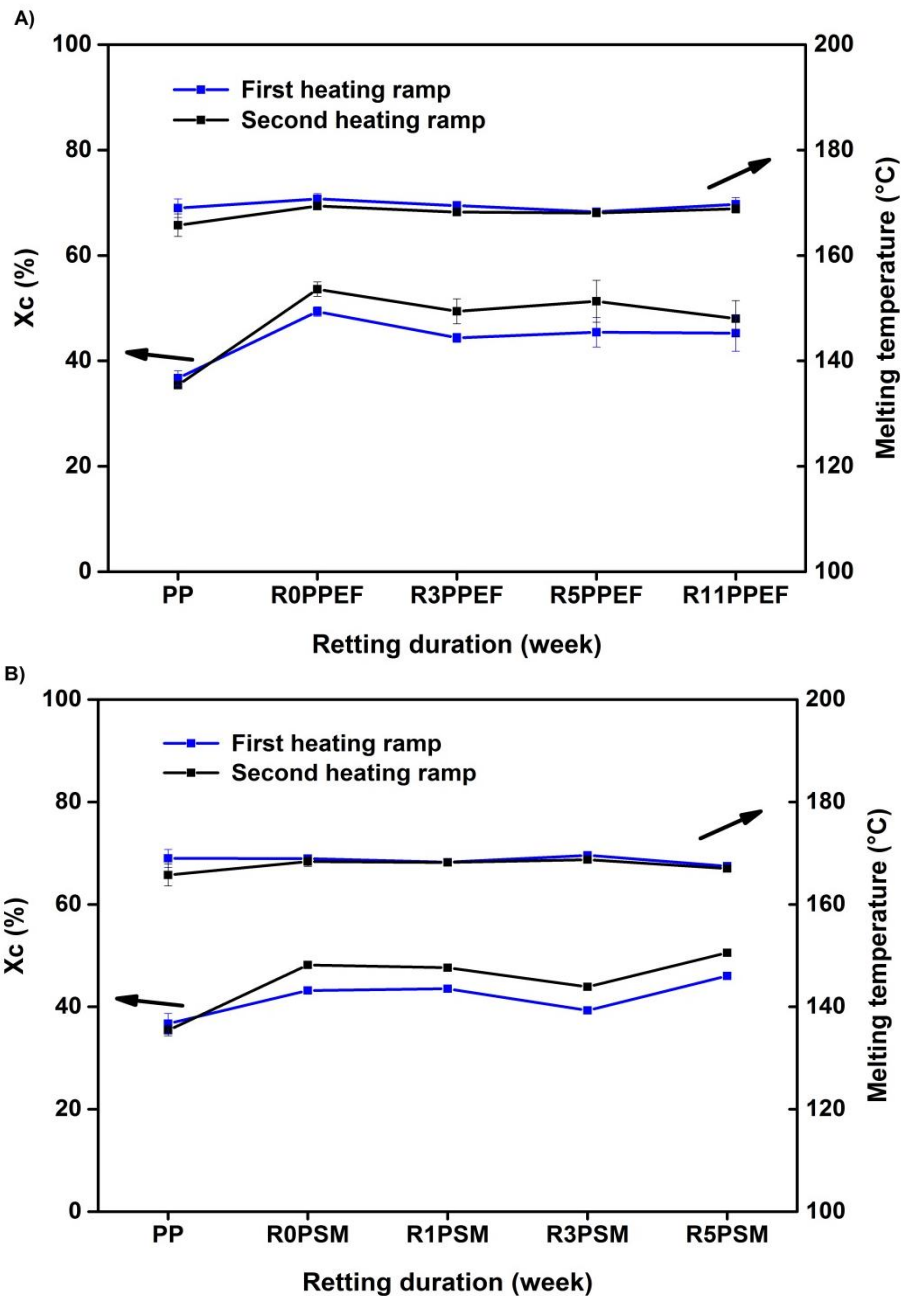


Figure V.8. A) Evolution of the crystallinity degree and the melting temperature A) of neat PP and biocomposites with fibres harvested at EF (R0PPEF) and field retted at different times (R3PPEF, R5PPEF and R11PPEF), B) of neat PP and biocomposites with fibres harvested at SM (R0PPSM) and retted in the lab-scale pilot unit at different times (R1PPSM, R3PPSM and R5PPSM)

3.4. Evolution of biocomposite mechanical properties with the hemp retting

Tensile properties (figure V.9 and V.10) have been analyzed for neat PP and biocomposites. Whatever the retting duration, the type of retting and the harvest period, the addition of hemp fibers to PP always has a positive effect, conferring a mechanical reinforcement to the polymer matrix with an increase in tensile strength and Young's modulus and a decrease in elongation at break. This highlights the capacity of hemp fibres reinforcement as largely exposed in literature [7,40].

As concerns the influence of MA-g-PP coupling agent, figure V.10 reveals that the addition of the coupling agent has also a significant positive effect on the mechanical performance of biocomposite with an increase in tensile strength and Young's modulus and a decrease in elongation at break by comparing R0PPSMref (without MA-g-PP) and R0PPSM (with MA-g-PP) as already presented in literature [5,41,42].

Regarding the fibres harvested at the end of flowering (figure V.9), results show that mechanical properties of the biocomposites increased slightly at the first stage of field retting (up to 5 weeks) and then decreased with an extended field retting (11 weeks). Indeed, the Young's modulus (figure V.9B) increased gradually from 38 GPa (mean value) for R0PPEF to 40 GPa for R5PPEF, and then decreased to 36 GPa for R11PPEF. A similar trend could be observed for the tensile strength (figure V.9A), with a slight increase from 44.8 MPa (mean value) for R0PPEF to 46.2 MPa for R3PPEF, and then a decrease with a prolonged retting duration to 42.9 MPa for R11PPEF. At the same time, the strain at break (figure V.9C) decreased with increasing of retting duration from 6.2 %, (R0PPEF) to 5.8 %, (R3PPEF) and 5.6 % (R5PPEF).

As concerns the fibres harvested at seed maturity and retted under controlled conditions in the lab-scale pilot unit (figure V.10), results show that the Young's modulus remain stable after one week of retting (37 GPa for R0PPSM and R1PPSM), then reduced to 36 GPa and 33 GPa after 3 weeks and 5 weeks of retting (R3PPSM and R5PPSM), respectively. The tensile strength decreased gradually during retting, from 44.8 MPa for R0PPSM, to 43.0 MPa, 41.9 MPa, and 40.6 MPa for R1PPSM, R3PPSM R5PPSM, respectively. The strain at break decreased with increasing of retting duration from 5.8 % (R0PPSM) to 5.6 %, 5.4 %, and 5.3 % for R1PPSM, R3PPSM and R5PPSM, respectively.

Therefore, it can be seen that the evolution of mechanical properties of biocomposites is different according to the harvest period and the type of retting. The mechanical properties

of biocomposites with fibres harvested at SM decreased rapidly after 1 week of controlled retting, whereas they decreased only at the end of field retting for the biocomposites with fibres harvested at EF. This could be explained by the retting types performed for each harvest period. Indeed, the stems harvested at EF were field retted under dry weather conditions which leads to a slow variation of fibres characteristics, while the stems harvested at SM and retted under wet conditions in laboratory result a rapid change of fibres characteristics. Indeed in a previous study [6] in agreement with literature [30], it has been demonstrated that intrinsic properties of the fibres (e.g. fibres mechanical properties) change during retting. The first stage of retting treatment results an improvement of the mechanical properties of fibres due to the removal of non-cellulosic compounds which leads to an increase of the cellulose fraction and of the cellulose crystallinity. However, when the fibres are highly retted (over-retted), their structure changes by a high degradation of non-cellulosic compounds or even by microbial degradation of cellulose. Therefore, in this case, the mechanical properties of the fibres decreased which results in lower tensile properties of the composites [29,43].

The behavior of mechanical properties of the biocomposites during retting pursue to mechanical properties of the fibres. This has also been reported by Martin et al. [7]. These authors studied different retting durations of flax fibres and the impact on the tensile properties of biocomposites (Polypropylene/flax) and show an equivalent trend to those of fibres.

It can be concluded that the mechanical properties of the biocomposite are governed by the quality of hemp fibre which depends also on retting duration and the weather conditions. In dry weather conditions, a long period of retting (5 weeks) is required for obtaining the highest mechanical properties. In contrast, under wet conditions and homogeneous distribution of humidity (75%), the prolonged field retting must be avoided.

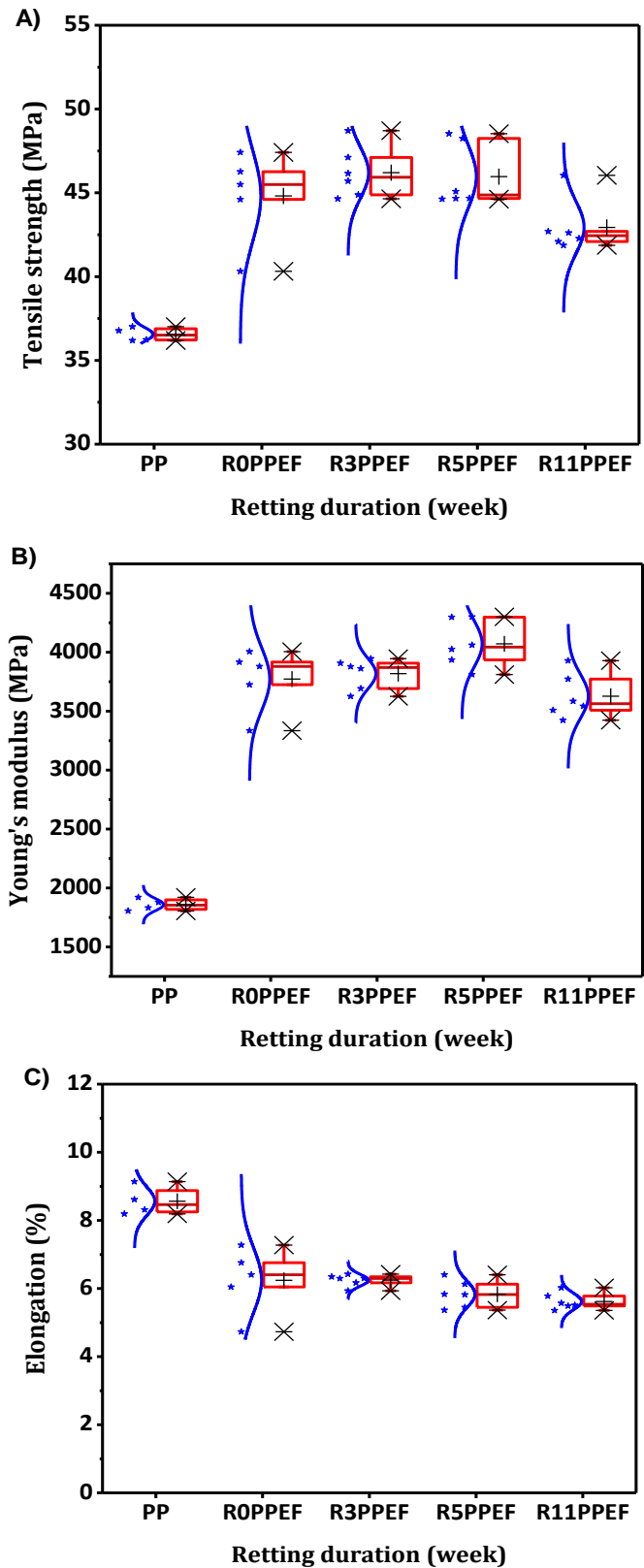


Figure V.9. Results of tensile strength (A), Young's modulus (B), and elongation at break (C) for neat PP and the biocomposites with fibres harvested at end of flowering (ROPPEF) and field retted at different retting durations (R3PPEF, R5PPEF and R11PPEF). The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively

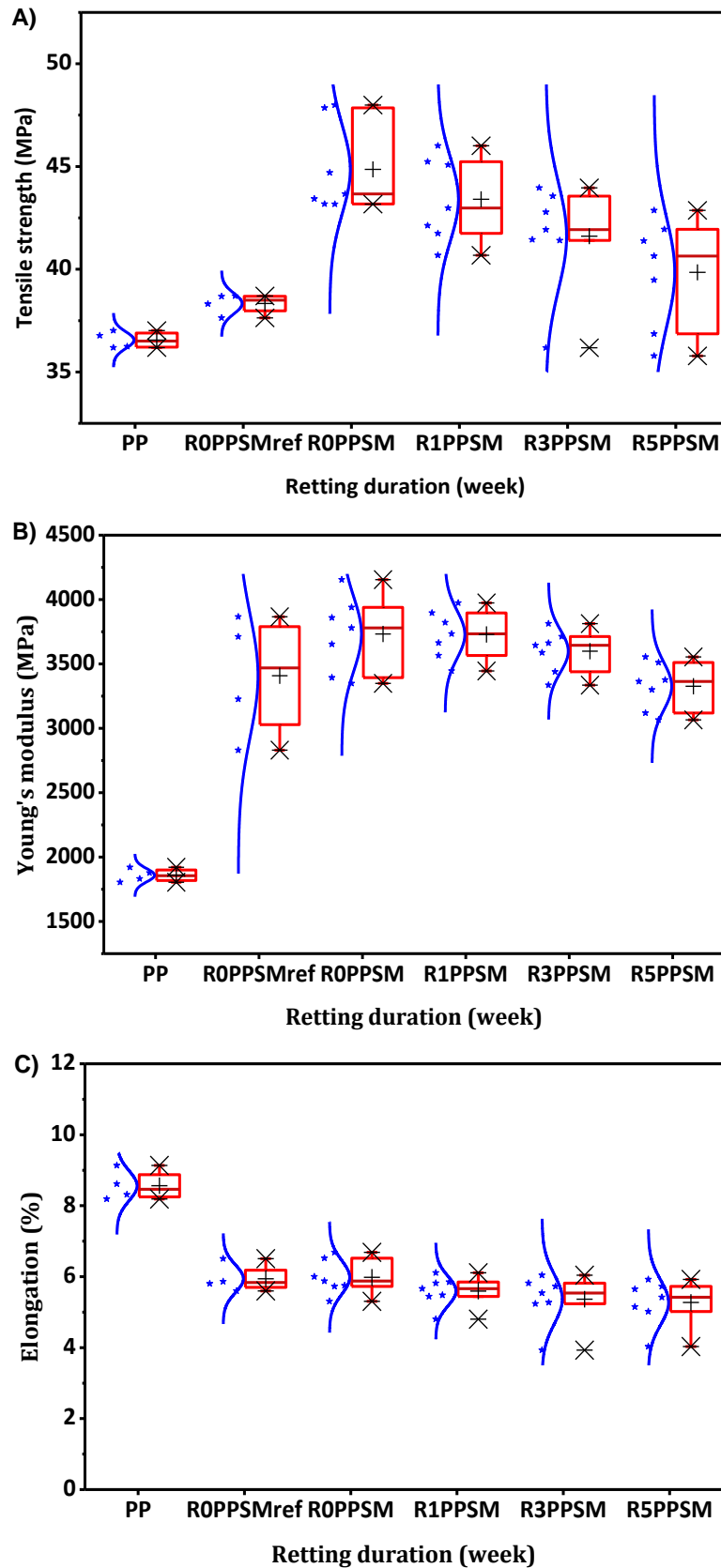


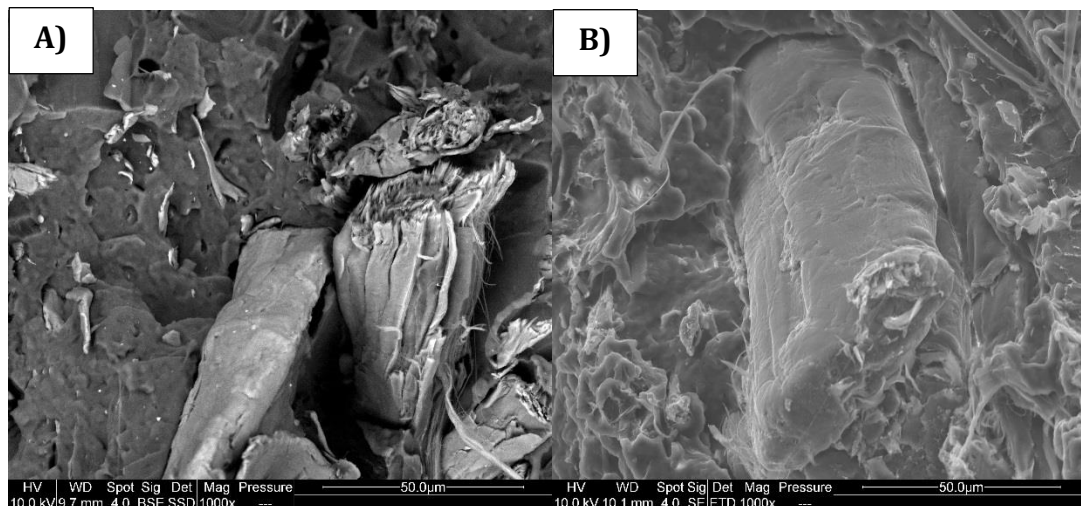
Figure V.10. Results of tensile strength (A), Young's modulus (B), and elongation at break (C) for neat PP and biocomposites with fibres harvested at seed maturity (R0PPSM with MA-g-PP and R0PPSMref without MA-g-PP) and retted in the lab-scale pilot unit at different retting durations (R1PPSM, R3PPSM, R5PPSM). The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively

3.5. Effect of retting on fibre/matrix interfacial adhesion

Figures V.11A and 11B show the fracture cross-sections of PP/unretted hemp fibre biocomposite without MA-g-PP and with MA-g-PP/respectively. Figures V.11C, D and E correspond to fracture cross-sections of PP/field retted hemp fibres biocomposites with different retting durations, i.e. 3, 5 and 11 weeks respectively.

Without MA-g-PP, micro spaces (voids) can be observed at the interfacial zone, indicating a poor adhesion between fibres and matrix. In contrast, by adding MA-g-PP, a better adhesion seems to be involved (ex. figure V.11B). These observations are agreement with the results of Ganster et al. [44], Wielage et al. [45], Pracella et al. [42] and Bourmaud and Baley [5].

As concerns the influence of retting on the adhesion of the fibres through the matrix, figures V. 11B, C, D and E show a significant adhesion of the fibres to the matrix and no pull out phenomena. This good adhesion of the fibres through the matrix could be not only related to coupling agent used, but also to degradation of interfibrillar cementing components (pectins) during retting. Li et al [12], have reported that removal of non-cellulosic compounds leads to a separation of the fibres which bring a better adhesion between fibre and matrix because of higher surface contact and increased rugosity and an increase of mechanical properties of final material.



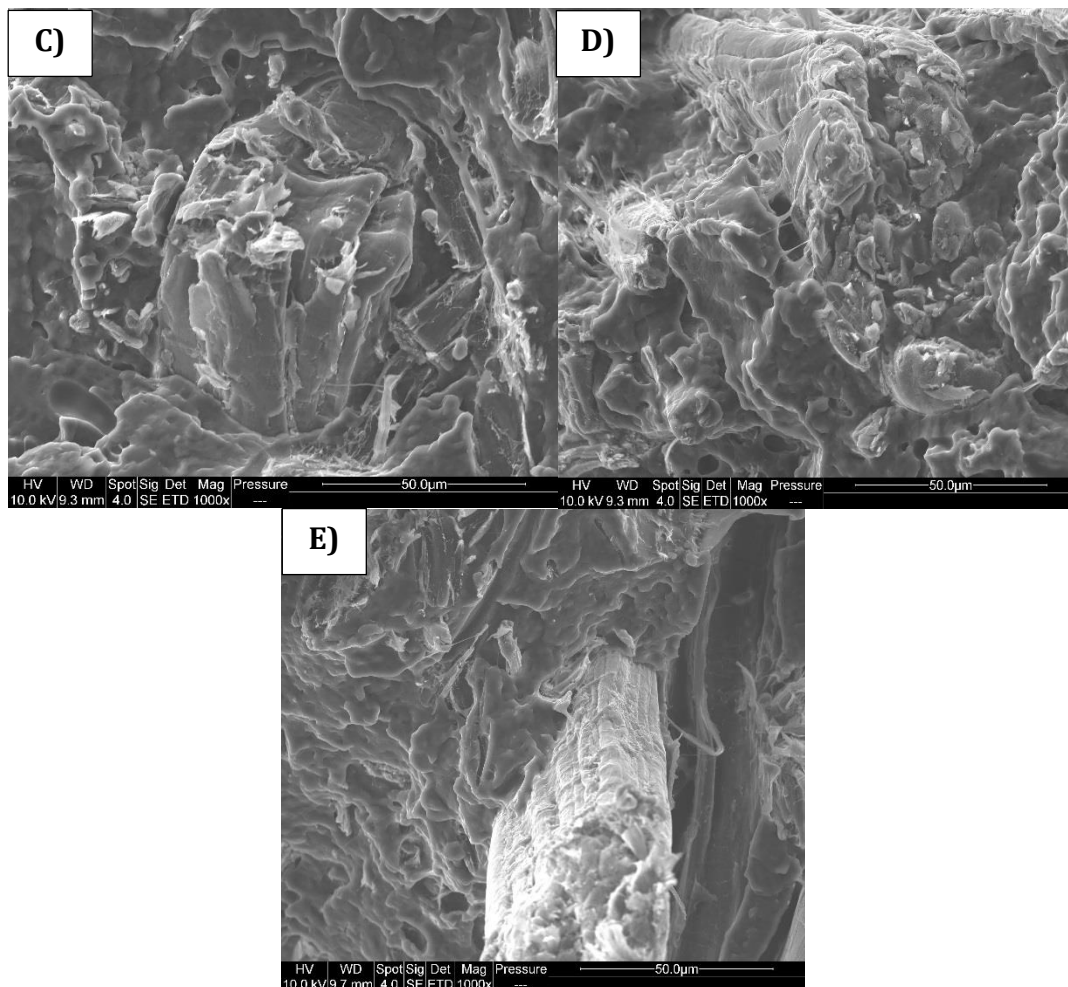


Figure V.11. Tensile fracture cross-sections of A) PP/unretted hemp fibres biocomposite without MA-g-PP, B) PP/unretted hemp fibres biocomposite with MA-g-PP, C) PP/field retted hemp fibre biocomposite with different retting durations: 3 weeks, D) 5 weeks, E) 11 weeks.

4. Conclusion

The objective of this work is to study the influence of the retting on PP/hemp fibres biocomposites properties such as thermal, microstructural and mechanical properties. Two types of retting were carried out under different weather conditions. The stems harvested at end of flowering (EF) were subjected to field retting, and the stems harvested at seed maturity (SM) undergone a controlled lab-scale retting. Whatever the harvest period and retting type, the thermal stability of the biocomposites improves with retting duration due the enhancement of thermal stability of fibres. Indeed, increasing of retting duration induces a removal of non-cellulosic materials (pectins and hemicellulose) leading to a progressive increase of the degradation temperature of cellulose that is a major compound of the fibre. The fibres harvested at SM exhibit a better thermal stability compared to that of the fibres

harvested at EF, due to the high cellulose fraction present in the fibres at plant maturity. The retting has no effect on the crystallinity of biocomposites, since no trend has been clearly observed.

In the case of field retted fibres, the tensile properties of biocomposites (tensile strength and Young's modulus) increased during retting to a threshold value (after 5 weeks) and decreased at the end of retting. As concerns the accelerated retted fibres in the lab-scale pilot unit, the tensile properties decreased rapidly with increasing of retting duration. The removal of non-cellulosic materials and increasing of cellulose fraction at beginning of retting bring better tensile performances of the biocomposite. However, increasing of retting duration leads to a high degradation of non-cellulosic materials, or even to the cellulose degradation which result in lower tensile properties.

In summary, the intrinsic properties of the fibres (biochemical composition, mechanical properties) are important parameters that influence the properties of biocomposites. Therefore, it is necessary to have an improved understanding of involved retting mechanisms to avoid an under- and over-retting treatment in order to optimize biocomposites properties.

Acknowledgements

The authors would like to thank the "CIVAM Chanvre Gardois (Le Bouquet, France)" for making available for us a plot of land to conduct this study.

Résultats supplémentaires et discussion

Lors de la campagne de 2016, les tiges récoltées à la période de semence (chapitre II) ont été également rouies au laboratoire dans les mêmes conditions que les tiges récoltées à la période de semence de la campagne de 2017 (chapitre V). Les propriétés mécaniques des fibres ont été caractérisées en suivant la méthode décrite dans le chapitre II (§2.2.6) afin d'évaluer l'impact du rouissage accéléré. Ces résultats n'ont pas été inclus dans la publication, néanmoins, ils pourraient expliquer la variation des propriétés mécaniques des composites renforcés par des fibres rouies au laboratoire.

Propriétés mécaniques des fibres de chanvre rouies au laboratoire

La Figure V.13 montre les résultats des essais de traction du faisceau de fibres de chanvre non-rouies (R0SM) et des fibres rouies pendant une semaine, 2 semaines et 3 semaines (R1SM, R3SM et R5SM, respectivement). Puisque la résistance à la rupture et le module d'Young dépendent du diamètre de la fibre [46,47], les diamètres des faisceaux de fibres sélectionnées pour chaque lot pour l'essai de traction sont compris entre 100 et 240 μm avec une valeur médiane de $\sim 155 \mu\text{m}$ (figure V.12).

La résistance à la rupture des fibres diminue progressivement de 351 MPa pour R0SM à 282 MPa pour R1SM, puis à 124 MPa pour R3SM, et à 113 MPa pour R5SM (valeurs médianes). Le module d'Young des fibres reste stable au début de rouissage (13 GPa) et diminue ensuite respectivement à 11 GPa et 9 GPa après 3 semaines et 5 semaines de rouissage. Concernant la déformation à la rupture, ce paramètre suit la même tendance que la résistance à la rupture. Une diminution a été observée pendant le rouissage de 3.5% pour les fibres non-rouies (R0SM) à 2.5%, 1.4% et 1.5% pour les fibres rouies R1SM, R3SM et R5SM, respectivement.

Comme cela a été déjà mentionné dans le chapitre II, au cours du rouissage, la matière non-cellulosique est dégradée par les microorganismes et la fraction de la cellulose et son degré de cristallinité augmentent, ce qui pourrait apporter de meilleures performances mécaniques [3,4,8,47]. Toutefois, les propriétés mécaniques des fibres ne sont pas uniquement gouvernées par la fraction de cellulose et son taux de cristallinité, mais également par la cohésion entre les microfibrilles de cellulose et la matière non-cellulosique. En effet, les fibres peuvent être considérées comme un composite naturel de microfibrilles

de cellulose et de matrice de matières non-cellulosiques (hémicelluloses et pectines). Une prolongation importante de la durée du rouissage ou des conditions météorologiques sévères (par exemple en enceinte de laboratoire) conduit à une forte dégradation de la matière non-cellulosique, qui joue un rôle important dans la cohésion de la structure des fibres. Par conséquent, cela conduit à une forte diminution des propriétés mécaniques. En outre, cette altération des propriétés mécaniques lors d'un sur-rouissage peut être liée également à la dégradation accélérée de la cellulose, comme cela a été rapporté par Placet et al. [29] et Liu et al. [43].

Ces résultats indiquent clairement que les propriétés mécaniques des biocomposites fabriqués à partir des fibres rouies au laboratoire suivent la même tendance que les propriétés mécaniques des fibres de chanvre. Un sur-rouissage des fibres de chanvre impacte donc négativement les propriétés mécaniques du matériau final.

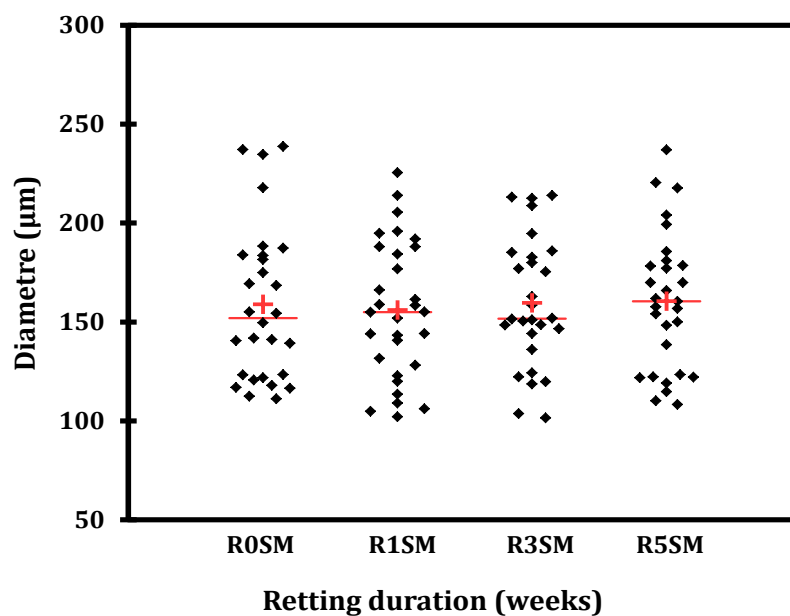


Figure V.12. Scattergrammes des diamètres mesurés des fibres non rouies (R0SM) et rouies au laboratoire (R3SM, R5SM et R9SM). La croix et les lignes rouges correspondent aux moyennes et médianes, respectivement.

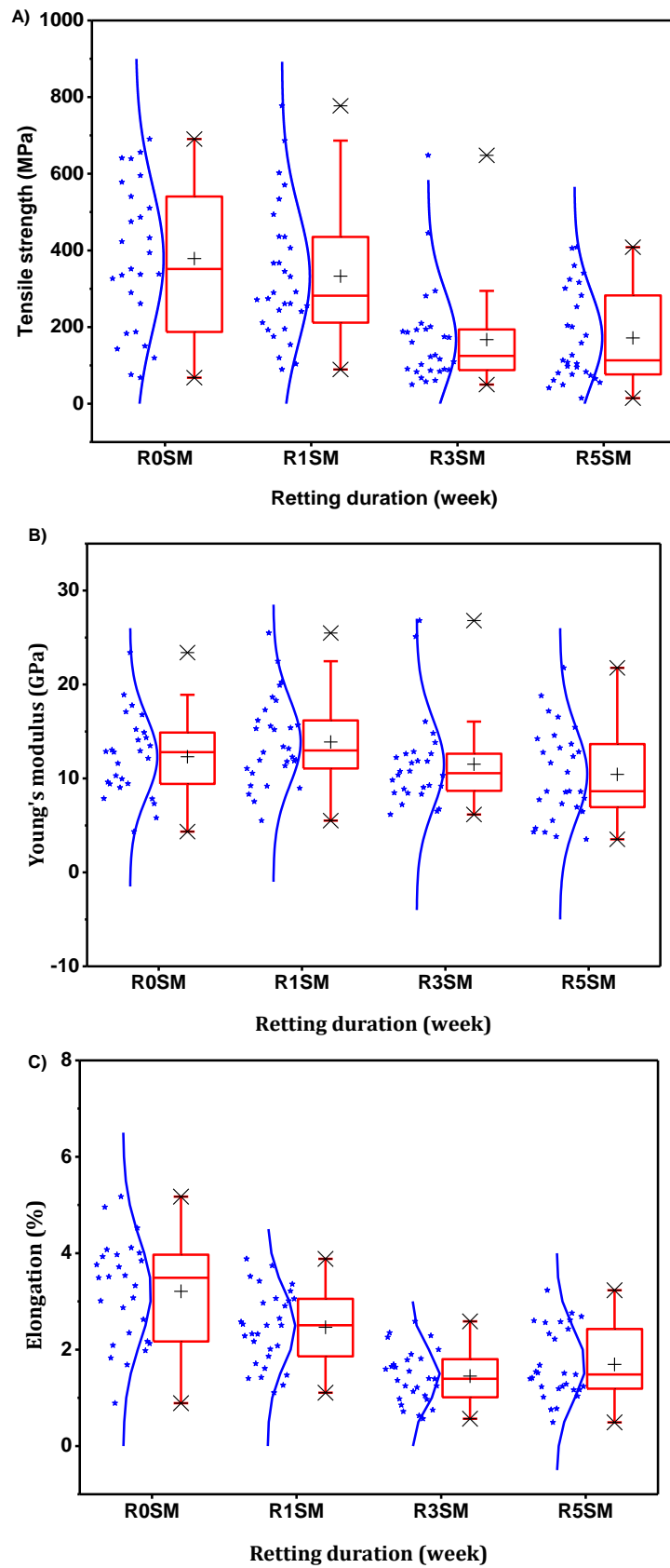


Figure V.13. Résultats de résistance à la rupture (A), module Young (B) et déformation (C) pour les fibres non rouies (R0SM) et rouies au laboratoire (R1SM, R3SM et R5SM). Les croix noires et les lignes rouges correspondent aux moyennes et médianes, respectivement.

References

- [1] Wambua P, Ivens J, Verpoest I. Natural fibres: Can they replace glass in fibre reinforced plastics? *Compos Sci Technol* 2003;63:1259–64.
- [2] Joshi S V., Drzal LT, Mohanty AK, Arora S. Are natural fiber composites environmentally superior to glass fiber reinforced composites? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2004;35:371–6.
- [3] Bourmaud A, Beaugrand J, Shah DU, Placet V, Baley C. Towards the design of high-performance plant fibre composites: How can we best define the diversity and specificities of plant cell walls? *Prog Mater Sci* 2018;97:347–408.
- [4] Bledzki A, Gassan J. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog Polym Sci* 1999;24:221–74.
- [5] Bourmaud A, Baley C. Investigations on the recycling of hemp and sisal fibre reinforced polypropylene composites. *Polym Degrad Stab* 2007;92:1034–45.
- [6] Mazian B, Bergeret A, Benezet J-C, Malhautier L. Influence of field retting duration on the biochemical, microstructural, thermal and mechanical properties of hemp fibres harvested at the beginning of flowering. *Ind Crops Prod* 2018;116:170–81.
- [7] Martin N, Mouret N, Davies P, Baley C. Influence of the degree of retting of flax fibers on the tensile properties of single fibers and short fiber/polypropylene composites. *Ind Crops Prod* 2013;49:755–67. .
- [8] Marrot L, Lefeuvre A, Pontoire B, Bourmaud A, Baley C. Analysis of the hemp fiber mechanical properties and their scattering (Fedora 17). *Ind Crops Prod* 2013;51:317–27.
- [9] Crônier D, Monties B, CHabbert BR. Structure and Chemical Composition of Bast Fibers Isolated from Developing Hemp Stem. *J Agric Food Chem* 2005;53:8279–89.
- [10] Hearle JW. The Fine Structure of Fibers and Crystalline. *J Appl Polym Sci* 1963;7:1175–92.
- [11] Bourmaud A, Morvan C, Bouali A, Placet V, Perré P, Baley C. Relationships between micro-fibrillar angle, mechanical properties and biochemical composition of flax fibers. *Ind Crops Prod* 2013;44:343–51.
- [12] Li Y, Pickering KL, Farrell RL. Analysis of green hemp fibre reinforced composites using bag retting and white rot fungal treatments. *Ind Crops Prod* 2009;29:420–6..
- [13] Sisti L, Totaro G, Vannini M, Fabbri P, Kalia S, Zatta A, et al. Evaluation of the retting process as a pre-treatment of vegetable fibers for the preparation of high-performance polymer biocomposites. *Ind Crops Prod* 2016; 56-65
- [14] El Mechtali FZ, Essabir H, Nekhlaoui S, Bensalah MO, Jawaid M, Bouhfid R, et al. Mechanical and Thermal Properties of Polypropylene Reinforced with Almond Shells Particles: Impact of Chemical Treatments. *J Bionic Eng* 2015;12:483–94.

- [15] Bledzki AK, Mamun AA, Lucka-Gabor M, Gutowski VS. The effects of acetylation on properties of flax fibre and its polypropylene composites. *Express Polym Lett* 2008;2:413–22.
- [16] Cantero G, Arbelaiz A, Llano-Ponte R, Mondragon I. Effects of fibre treatment on wettability and mechanical behaviour of flax/polypropylene composites. *Compos Sci Technol* 2003;63:1247–54.
- [17] Liu M, Meyer AS, Fernando D, Silva DAS, Daniel G, Thygesen A. Effect of pectin and hemicellulose removal from hemp fibres on the mechanical properties of unidirectional hemp/epoxy composites. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2016;90:724–35.
- [18] Islam MS, Kim L P, Nic J F. Influence of Alkali Fiber Treatment and Fiber Processing on the Mechanical Properties of Hemp/Epoxy Composites Mohammad. *J Appl Polym Sci* 2010;21:449–56.
- [19] Nykter M, Kyma H, Belinda A, Lilholt H, Thygesen A. Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa L.*). *Biomass and Bioenergy* 2008;32:392–9.
- [20] Vignon, M.R., Dupeyre, D., Garcia-Jaldon, C. Morphological characterization of steam-exploded hemp fibers and their utilization in polypropylene-based composites. *Bioresource Techno.* 1997; 58, 203–215.
- [21] Thomsen AB, Thygesen A, Bohn V, Nielsen KV, Pallesen B, Jørgensen MS. Effects of chemical-physical pre-treatment processes on hemp fibres for reinforcement of composites and for textiles. *Ind Crops Prod* 2006;24:113–8.
- [22] Kukle S, Gravitis J, Putnina A, Stikute A. The effect of steam explosion treatment on technical hemp fibers. *Proc 8th Int Sci Pract Conf* 2011;1:230–7.
- [23] Sisti L, Totaro G, Vannini M, Celli A. Retting Process as a Pretreatment of Natural Fibers for the Development of Polymer Composites. *Lignocellulosic Composite Materials* 2018, 27-135
- [24] Djemiel C, Grec S, Hawkins S. Characterization of bacterial and fungal community dynamics by high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding during flax dew-retting. *Front Microbiol* 2017;8:1–16.
- [25] Ribeiro A, Pochart P, Day A, Mennuni S, Bono P, Baret J, et al. Microbial diversity observed during hemp retting. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015:4471–84.
- [26] Akin DE, Condon B, Sohn M, Foulk JA, Dodd RB, Rigsby LL. Optimization for enzyme-retting of flax with pectate lyase. *Ind Crops Prod* 2006 2007;25:136–46.
- [27] Henriksson G, Akin DE, Hanlin RT, Rodriguez C, Archibald DD, Rigsby LL, et al. Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the United States and Europe. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3950–6.
- [28] Réquillé S, Le Duigou A, Bourmaud A, Baley C. Peeling experiments for hemp retting characterization targeting biocomposites. *Ind Crops Prod* 2018;123:573–80.

- [29] Placet V, Day A, Beaugrand J. The influence of unintended field retting on the physicochemical and mechanical properties of industrial hemp bast fibres. *J Mater Sci* 2017;52:5759–77.
- [30] Placet V, François C, Day A, Beaugrand J, Ouagne P. Industrial Hemp Transformation for Composite Applications: Influence of Processing Parameters on the Fibre Properties. *Adv Nat Fibre Compos* 2018:13–25.
- [31] Sperling LH. *Introduction to Physical Polymer Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
- [32] Hörtensteiner S. The loss of green color during chlorophyll degradation - A prerequisite to prevent cell death? *Planta* 2004;219:191–4.
- [33] Merzlyak MN, Gitelson A. Why and What for the Leaves Are Yellow in Autumn? On the Interpretation of Optical Spectra of Senescing Leaves (*Acer platanoides* L.). *J Plant Physiol* 1995;145:315–20.
- [34] Matile P. Biochemistry of Indian summer: Physiology of autumnal leaf coloration. *Exp Gerontol* 2000;35:145–58.
- [35] Bleuze L, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chabbert B. Tracking the dynamics of hemp dew retting under controlled environmental conditions. *Ind Crops Prod* 2018;123:55–63.
- [36] Kabir MM, Wang H, Lau KT, Cardona F. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. *Appl Surf Sci* 2013;276:13–23.
- [37] Ouajai S, Shanks RA. Composition, structure and thermal degradation of hemp cellulose after chemical treatments. *Polym Degrad Stab* 2005;89:327–35.
- [38] Amash A, Zugenmaier P. Morphology and properties of isotropic and oriented samples of cellulose fibre-polypropylene composites. *Polymer (Guildf)* 2000;41:1589–96.
- [39] Arbelaiz A, Fernández B, Ramos JA, Mondragon I. Thermal and crystallization studies of short flax fibre reinforced polypropylene matrix composites: Effect of treatments. *Thermochim Acta* 2006;440:111–21.
- [40] Badji C, Beigbeder J, Garay H, Bergeret A, Bénézet J-C, Desauziers V. Natural weathering of hemp fibers reinforced polypropylene biocomposites: Relationships between visual and surface aspects, mechanical properties and microstructure based on statistical approach. *Compos Sci Technol* 2018;167:440–7.
- [41] Sullins T, Pillay S, Komus A, Ning H. Hemp fiber reinforced polypropylene composites: The effects of material treatments. *Compos Part B Eng* 2017;114:15–22.
- [42] Pracella M, Chionna D, Anguillesi I, Kulinski Z, Piorkowska E. Functionalization, compatibilization and properties of polypropylene composites with Hemp fibres. *Compos Sci Technol* 2006;66:2218–30.
- [43] Liu M, Fernando D, Daniel G, Madsen B, Meyer AS, Ale MT, et al. Effect of harvest time and field retting duration on the chemical composition, morphology and mechanical

properties of hemp fibers. *Ind Crops Prod* 2015;69:29–39.

- [44] Ganster J, Fink H-P, Pinnow M. High-tenacity man-made cellulose fibre reinforced thermoplastics – Injection moulding compounds with polypropylene and alternative matrices. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2006;37:1796–804.
- [45] Wielage B, Lampke T, Utschick H, Soergel F. Processing of natural-fibre reinforced polymers and the resulting dynamic–mechanical properties. *J Mater Process Technol* 2003;139:140–6.
- [46] Duval A, Bourmaud A, Augier L, Baley C. Influence of the sampling area of the stem on the mechanical properties of hemp fibers. *Mater Lett* 2011;65:797–800..
- [47] Placet V, Trivaudey F, Cisse O, Gucheret-Retel V, Boubakar ML. Diameter dependence of the apparent tensile modulus of hemp fibres: A morphological, structural or ultrastructural effect? *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2012;43:275–87.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En raison de la prise de conscience croissante des facteurs environnementaux, les principes de durabilité, d'écologie industrielle, d'éco-efficacité sont appliqués au développement d'une nouvelle génération de matériaux, produits et processus à l'origine de l'essor de la chimie verte. L'épuisement des ressources pétrolières, associé à une réglementation de plus en plus restrictive, agissent en synergie pour encourager le développement de nouveaux matériaux et produits compatibles avec l'environnement et limitant l'utilisation de combustibles fossiles. Les matériaux composites renforcés de fibres végétales s'inscrivent bien dans ce changement de paradigme. Aujourd'hui, ces composites à base de fibres végétales connaissent une forte expansion dans différents domaines, allant de l'automobile au secteur de la construction. Cependant, bien que les propriétés mécaniques des fibres végétales confèrent aux biocomposites une tenue mécanique compétitive vis-à-vis des composites renforcés de fibres conventionnelles, leur développement est limité due à l'hétérogénéité des propriétés des fibres végétales qui dépendent en grande partie de l'efficacité du processus de traitement de ces fibres mettant en œuvre différentes étapes d'extraction et de transformation des fibres. L'objectif principal de cette thèse est la compréhension du traitement de rouissage qui est le premier processus de transformation que les tiges subissent après la récolte. Dans le cadre de ce travail de thèse, le chanvre a fait l'objet d'une attention particulière.

La première partie du second chapitre a concerné l'étude de l'influence de différents temps de rouissage sur les propriétés intrinsèques des fibres de chanvre récoltées au début de la floraison. Le rouissage a été réalisé dans des conditions estivales, ce qui a nécessité un suivi de longue durée (9 semaines). Les résultats ont mis en évidence que la durée du rouissage entraîne un changement de la couleur des fibres du vert clair au gris foncé en raison d'un développement d'une communauté microbienne (micromycètes/champignons et bactéries) à la surface de la tige. Une séparation des faisceaux de fibres en fibres élémentaires se produit avec la dégradation des composés présents dans la lamelle mitoyenne (à savoir les pectines). Le taux de cellulose et son degré de cristallinité augmentent parallèlement à une diminution de la matière non-cellulosique, ce qui conduit à une amélioration de la stabilité thermique des fibres après rouissage. Ce travail a révélé que l'augmentation de la fraction de cellulose et la cristallinité semblent induire une augmentation des propriétés mécaniques des faisceaux de fibres de chanvre.

Ensuite, dans la deuxième partie de ce second chapitre, une étude comparative de l'impact du rouissage au champ sur les propriétés de fibres de chanvre récoltées à différents stades de croissance de la plante (début de floraison, fin de la floraison, et semence) a été réalisée. Le rouissage des tiges récoltées à ces différents temps de récolte a été effectué dans des conditions météorologiques dont les caractéristiques en termes de taux d'humidité relative, précipitations, températures maximale et minimale diffèrent. Les résultats ont révélé que, quelle que soit la période de récolte, on observe une évolution identique des propriétés des fibres lors du rouissage. Cependant, la principale différence réside sur la cinétique de cette évolution, qui dépend des conditions météorologiques et de l'état initial des fibres après la récolte. En effet, le temps nécessaire au rouissage des tiges coupées en début et fin de floraison est important (7-9 semaines) contrairement à celui nécessaire pour obtenir des fibres rouies de manière équivalente pour des tiges récoltées pendant la période de semence (3 semaines). La variation de la couleur des fibres est identique, quelle que soit la période de récolte des tiges : du vert clair pour les fibres non-rouies, jaune pour les fibres peu rouies, jaune avec la présence de fibres grises pour les fibres moyennement rouies et gris foncé pour les fibres fortement rouies. Comme pour les tiges coupées en début de floraison, la fraction de cellulose et son degré de cristallinité augmentent pendant le rouissage de fibres récoltées en fin de floraison et pendant la période de semence. Comme pour le changement de couleur, la cinétique de cette évolution diffère selon les conditions météorologiques et la période de récolte. Il convient de souligner que les fibres récoltées à la période de semence présentent une proportion élevée de cellulose ce qui leur confère une meilleure stabilité thermique par rapport aux fibres récoltées en début et fin de floraison. Les propriétés mécaniques de fibres récoltées en début et fin de floraison augmentent pour atteindre une valeur maximum (après 5 semaines de rouissage) et ensuite diminuent avec un rouissage prolongé. En ce qui concerne les fibres récoltées en période de semence, les propriétés de traction diminuent progressivement et légèrement. Les résultats de ce chapitre révèlent clairement que les propriétés intrinsèques des fibres dépendent de la durée du rouissage et de la récolte des tiges pendant le cycle de vie de la plante. Il est donc primordial de contrôler ces deux paramètres pour améliorer la qualité des fibres pour l'application visée.

En plus de la caractérisation des fibres, il nous a semblé pertinent de mieux comprendre ce procédé de rouissage en examinant la dynamique temporelle des émissions de COV et des émissions odorantes par les tiges de chanvre. Pour cela, un protocole non destructif a été mis en œuvre directement sur les tiges de chanvre prélevées à différents temps de rouissage. Les résultats du chapitre 3 ont mis en évidence, qu'indépendamment de la

période de récolte, les concentrations de COV émis par les tiges diminuent progressivement et que certaines familles (alcools, aldéhydes) ne sont plus identifiées après 7-9 semaines de rouissage. De plus, concernant la qualité de l'odeur, l'odeur de plante verte dominante au début du traitement disparaît alors qu'une odeur de plantes sèches puis d'une odeur en lien avec les processus fermentaires deviennent émergentes en fin de rouissage. Ainsi, ces premiers résultats sont prometteurs et pourraient être utilisés dans le cadre de la résolution de cette problématique du rouissage des fibres de chanvre.

Le quatrième chapitre rassemble quelques résultats obtenus dans le cadre d'une approche microbiologique du rouissage. Une analyse plus approfondie des mécanismes biologiques s'impose toutefois. Néanmoins, ces résultats semblent mettre en évidence que la microflore localisée dans différents compartiments (sol, tige, système racinaire) a la capacité à dégrader la pectine. L'étude de la dynamique temporelle des densités de peuplement des communautés bactériennes, archées et fongiques extraites des tiges de chanvre à différents temps de rouissage semblent indiquer une augmentation des niveaux de densités de peuplement de la communauté fongique en fin de période de rouissage, quelle que soit la période de récolte des tiges. Concernant la communauté bactérienne, une évolution semblable est observée pour les tiges récoltées en fin de floraison alors que les niveaux de densité restent stables pour les tiges coupées en période de semence. Ces résultats semblent corroborer l'importance des micromycètes et de groupes bactériens dans ce processus de rouissage par la production d'exoenzymes pectinolytiques. Il est probable que la mise en œuvre du rouissage pendant cette étude (dépôt des tiges en tas nommés andains sur une hauteur de 20 cm et retournement une fois par semaine) ait une influence sur le développement des communautés microbiennes à la surface des tiges.

Pour terminer, l'impact du rouissage des fibres de chanvre sur les propriétés fonctionnelles de biocomposites polypropylène/fibres de chanvre (30% en masse) a été déterminé. Des fibres obtenues à partir de tiges coupées en fin de floraison et rouies en champ (rouissage lent) et des fibres obtenues à partir de tiges coupées en période de semence et rouies en conditions contrôlées (rouissage accéléré) ont été incorporées dans une matrice polypropylène. Les résultats ont mis en évidence que, quelle que soit la période de récolte et les conditions de rouissage, la stabilité thermique du biocomposite augmente progressivement avec la durée du rouissage, en lien direct avec l'amélioration de la stabilité thermique des fibres elles-mêmes. La résistance à la traction et le module de Young des biocomposites réalisés avec des fibres récoltées en fin de floraison et rouies en champ

augmentent progressivement jusqu'à un maximum (5 semaines), puis diminuent avec un rouissage prolongé. En revanche, les propriétés mécaniques des biocomposites réalisés avec des fibres récoltées à la période de semence et rouies dans des conditions accélérées, diminuent rapidement en raison du sur-rouissage. Les propriétés mécaniques des biocomposites sont similaires à celles observées pour les fibres seules (chapitre 2 et données complémentaires du chapitre 5). Cette analyse comparative met clairement en évidence que les propriétés intrinsèques des fibres sont des paramètres primordiaux qui gouvernent les propriétés du biocomposite.

Ce travail de thèse, s'est focalisé sur la compréhension de la pratique de rouissage en champ en considérant différents items. A l'issue de ce travail, les résultats obtenus sont prometteurs et permettent d'envisager des perspectives pertinentes dans l'objectif de maîtriser cette étape d'extraction des fibres de chanvre et à terme de répondre aux attentes à la fois des agriculteurs et des industriels producteurs de biocomposites.

- Les résultats obtenus suite à l'étude préliminaire des mécanismes biologiques associés au rouissage sont prometteurs et nous encouragent à approfondir ce travail par une caractérisation fine de la structure des communautés microbiennes totales au cours du rouissage en champ. L'approche fonctionnelle est également à développer afin de cibler les populations directement impliquées dans la dégradation des composés pectiques et d'examiner la dynamique temporelle de celles-ci pendant le rouissage.
- Dans le cadre de cette étude, les fibres ont été extraites manuellement de la tige. Afin de se placer dans des conditions expérimentales les plus représentatives de celles rencontrées en industrie, il serait intéressant d'étudier le poids de la décortication mécanique des fibres de la tige sur les propriétés des biocomposites et de réaliser une analyse comparative avec les résultats obtenus après extraction manuelle des fibres.
- Enfin, ces résultats ouvrent des pistes d'étude visant à corrélérer les données obtenues (couleur, émissions de COV, odeurs, caractéristiques intrinsèques des fibres, propriétés des biocomposites, données microbiologiques) avec des outils statistiques et mathématiques adaptés. Cette analyse de type « big data » pourrait être une voie intéressante pour la détermination d'indicateurs du degré de rouissage fiables, faciles à mettre en œuvre par les agriculteurs, indépendamment des conditions météorologiques et de la période de récolte des tiges.

Liste des figures et des tableaux

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure I.1. La plante du chanvre	16
Figure I.2. Le travail du chanvre en Chine continentale [5].....	17
Figure I.3. Le travail du chanvre au XVIIème siècle [4]	17
Figure I.4. Frégate L'Hermione [6].....	18
Figure I.5. La culture de chanvre en Europe [7]	19
Figure I.6. Croissance du chanvre, exemple d'un semis réalisé début mai [8]	20
Figure I.7. Type de sols où le chanvre est cultivé en France en 2016 [9].....	20
Figure I.8. Diagramme des produits potentiels à base de chanvre [14]	24
Figure I.9. Chênevis de chanvre [17].....	25
Figure I.10. Pièces intérieures de véhicules de constructeurs allemands (Mercedes E-class (a)[21] Panneau de porte en composites à fibres naturelles b)[22], c) Plaque de bord de Smart	26
Figure I.11. La laine de chanvre [23].....	27
Figure I.12. Application du chanvre dans le bâtiment [24]	27
Figure I.13. Section transversale d'une tige de chanvre (epidermis layer EL : couche d'épiderme ; PFL(Primary Fiber Layer) : couche de fibres primaires ; SFL (Secondary Fiber Layer): couche des fibres secondaires; central void : lacune ;Xylem : Xylème	30
Figure I.14. Faisceaux de fibres [35]	30
Figure I.15. Différentes couches concentriques de la fibre élémentaire de chanvre [43]	31
Figure I.16. Structure de la cellulose : polymère de cellobiose.....	33
Figure I.17. Structure de la microfibrille de cellulose [62]	34
Figure I.18. Structure moléculaire des principales unités disaccharidiques récurrentes des hémicelluloses [67].....	35
Figure I.19. Monomères de lignine (1 : alcool paracoumarylique. 2: alcool coniférylique.3: alcool sinapylique) [71].....	36
Figure I.20. (A) Acide D-galacturonique sous forme de chaîne ouverte en projection de Fisher, (B) Acide D-galacturonique sous forme de cycle (α -pyranose), (C) D- et L-rhamnose en chaîne ouverte dans la projection de Fisher et (D) D- et L-galactose en tant que chaîne ouverte dans la projection de Fisher [76].....	37
Figure I.21. Structure chimique des composés représentant les principales classes des extraits lipophiles présents dans les fibres lignocellulosiques: (I) pentacosane; (II) octacosanol; (III) octacosanal; (IV) acide palmitique; (V) sitostérol; (VI) linoléate de sitostéryle; (VII) sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside; (VIII) b-amyrine [79].....	38
Figure I.22. Courbes typique charge-déplacement d'un essai de traction sur une fibre chanvre [80].....	39
Figure I.23. Exemple de composition d'un matériau composite	41
Figure I.24. Structure de PP	42
Figure I.25. Rouissage à l'eau au sein (a) d'une rivière [127] (b) d'un réservoir [128]	47
Figure I.26. Rouissage en champ de fibres de lin [134]	49
Figure I.27. Changement de la couleur des tiges de chanvre pendant le rouissage [136].....	50
Figure I.28. Distribution dans des classe de largeur des fibres de chanvre rouies et non rouies [89].....	53

Figure I.29. Observation au MEB de section de tige de lin (a) non-rouie (b) après rouissage enzymatique ; F : Fibres [146].	53
Figure I.30. Quelques exemples de terpénoïdes.	57
Figure I.31. Schéma des interactions des plantes avec leur environnement via les COV (modifié d'après Dudareva, Negre et al.2006)	58

CHAPITRE II

Figure II.1. Daily weather conditions (Minimum and maximum temperature, relative humidity and precipitation) during different retting durations in July to September 2016	84
Figure II.2. Locations of the fibres on the stem (bottom, middle and top)	85
Figure II.3. Schema of successive solvent extractions used to analyze the biochemical composition of unretted and retted hemp fibres	87
Figure II.4. Method used to analyze pectins content of unretted and retted fibres	88
Figure II.5. Photographs of color change of the stems and fibre bundles after different retting durations	90
Figure II.6. ESEM images of unretted stem surface (R0), 3 weeks-retted stem surface (R3), 5 weeks retted stem surface (R5) and 9 weeks retted surface (R9)	91
Figure II.7. Ash, lignin, hemicellulose, lipophilic extractives, hemicelluloses, cellulose (solvent extractions) and lignin (spectrophotometer) contents as a function of field retting times	92
Figure II.8. A) Diffractograms for unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9) B) Example of curves of deconvolution method used for determining the crystalline order index (CI)	94
Figure II.9. Optical microscope micrographs showing cross sections of unretted hemp stem R0 (A), 3 weeks retted hemp stem R3 (B); 5 weeks retted hemp stems R5 (C) ; 9 weeks retted hemp stem R9 (D) E: epidermis; PC: parenchyma cell; PFB: primary fibre bundles; SFB: secondary fibre bundles; ML: middle lamella; L: lumen; EF: elementary fibres; VS: void space ; X: xylem	96
Figure II.10. TGA (A) and DTGA (B) curves of unretted fibres (R0) compared to element constituents (commercial pectin and cellulose)	97
Figure II.11. TGA (A) and DTGA (B) curves of unretted fibres (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9)	99
Figure II.12. Correlation between degradation temperature of cellulose (TGA), cellulose fraction (biochemical analysis) and cellulose crystallinity (DRX experiments)	99
Figure II.13. Box plots of tensile strength (A), Young's modulus (B), and ultimate strain (C) of unretted and retted fibres (R3, R5 and R9)	101
Figure II.14. Scattergrams of measured diameters of unretted (R0) and retted fibres (R3, R5 and R9). The red crosses correspond to the means)	102
Figure II.15. Hemp plant growth from May 6th, 2016 to September 23th, 2016.	109
Figure II.16. Daily weather conditions (minimum and maximum temperature, relative humidity and rainfall) during retting of fibres harvested at different growth stages (BF, EF and SM)	111
Figure II.17. Cross section of hemp stem (EL: epidermis, PFL: Primary fibres layer, SFL: secondary fibres layer)	112
Figure II.18. Photographs of color changes during retting of hemp harvested at different periods (BF, EF and SM).	115
Figure II.19. ESEM images of the surface change during retting of the stems harvested at SM	116
Figure II.20. Ash, lignin, hemicellulose, lipophilic extractives, hemicelluloses, cellulose and lignin, pectins contents as a function of field retting duration for fibres harvested at a) end of flowering (EF) and b) at seed maturity (SM)	118
Figure II.21. Diffractograms of fibres harvested at EF and SM, and retted at different durations	120

Figure II.22. TGA (A) and DTGA (B) curves of fibres harvested at EF (R0EF) and retted at different times (R3EF, R5EF and R9EF). TGA (C) and DTGA (D) of fibres harvested at SM (R0SM) and retted at different times (R3SM and R5SM).....	122
Figure II.23. Morphological features (bast fibres, xylem, and central void). EL: Epidermis layer, PFL: primary fibres layer, SFL: secondary fibres layer) of hemp stem depending on harvest period before retting.....	124
Figure II.24. Optical microscope micrographs of cross sections of R0EF, R3EF, R5EF, R9EF; E: epidermis; PFB: primary fibre bundles; SFB: secondary fibre bundles; ML: middle lamella; L: lumen; EF: elementary fibres; X: xylem.....	125
Figure II.25. Scattegram of measured bundle fibres diameters for each batch (A) ; Box plots of tensile strength (B), young modulus (C) , and stain at break (D) for unretted and retted fibres harvested at BF, EF and SM. The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively.....	129

CHAPITRE III

Figure III.1. Hemp plant growth (May 10th, 2017.....	141
Figure III.2. Daily weather conditions (minimum and maximum temperatures, relative humidity and precipitation) during retting of stems harvested at EF and SM.....	142
Figure III.3. Example of prepared Nalophan® bags.....	144
Figure III.4. VOC equilibrium in Nalophan® bags by using ppbRAE 3000 (RAE Systems Inc). 144	
Figure III.5. Photograph of color changes of the stems during retting of hemp harvested at different periods (EF and SM)	147
Figure III.6. Most abundant chemical families emitted by stems harvested at EF and SM	148
Figure III.7. Temporal dynamic of VOCs of hemp stems during field retting A) stems harvested at EF B) stems harvested at SM.....	152
Figure III.8. Concentration variation of the terpenes during retting of stems harvested at EF	155
Figure III.9. Concentration variation of the terpenes during retting of stems harvested at SM	156
Figure III.10. Concentration variation of the alcohols during retting of stems harvested at EF	157
Figure III.11. Concentration variation of the alcohols during retting of stems harvested at SM	158
Figure III.12. Concentration variation of the aldehydes during retting of stems harvested at EF	159
Figure III.13. Concentration variation of the aldehydes during retting of stems harvested at SM	160
Figure III.14. Odor quality of retted stems previously harvested at EF.....	163
Figure III.15. Odor quality of retted-stems previously harvested at SM.....	164

CHAPITRE IV

Figure IV.1. Parcelle cultivée par du chanvre à proximité du Mas la Valus (12/07/2016).....	175
Figure IV.2. Développement de la plante de chanvre cultivée pendant la culture de 2016 ; et 2017.....	175
Figure IV.3. Courbe d'étalonnage de l'acide galacturonique obtenue à partir de pectine du commerce (Coprle, Ales, France).....	177
Figure IV.4. Exemple de courbes de fusion permettant de vérifier l'unicité du produit d'amplification (ADNr18S)	179
Figure IV.5. Exemple de courbes d'amplifications obtenues pour la qPCR ADNr18S permettant de déterminer le cycle seuil (trait horizontal rouge).....	181
Figure IV.6. Exemple de gamme standard pour la qPCR ADNr18S, permettant de relier le nombre seuil de cycles (C_T) au nombre de copies d'ADNr18S.....	181

Figure IV.7. Cinétique de dégradation de la pectine par les communautés microbiennes extraites de différents compartiments : sol cultivé, système racinaire, tige (50-150 cm de hauteur), sol non cultivé. A : Essai réalisé à 27°C ; B. Essai réalisé à 37°C..... 183

Figure IV.8. Evolution des densités de peuplement des communautés archées, bactériennes et fongiques déterminées à partir des tiges et du sol cultivé pendant le rouissage des tiges récoltées en fin de floraison (FF) ou lors de la période de semence(PS). A. Tige ; B. Sol cultivé..... 184

CHAPITRE V

Figure V.1. Hemp plant growth..... 196

Figure V.2. Field retting (left : non-retted stems ; middle : 3 weeks retted stems ; right : 9 weeks retted stems)..... 197

Figure V.3. Lab-scale pilot units used for a controlled and accelerated retting..... 197

Figure V.4. Daily weather conditions (minimum and maximum temperature, relative humidity and precipitation) (A) during field retting of stems harvested at EF and (B) during artificially/controlled retted stems harvested at SM in lab-scale pilot unit..... 199

Figure V.5. Color change of the stems during field retting of the stems harvested at EF and during lab-scale retting of the stem harvested at SM. Corresponding color change of the fibres 202

Figure V.6. TGA (A) and DTGA (B) curves of neat PP and biocomposites with fibres harvested at EF (R0PPEF) and field retted at different times (R3PPEF, R5PPEF and R9PPEF). 204

Figure V.7. TGA (A) and DTGA (B) of neat PP and biocomposite with fibres harvested at SM (R0PPSM) and accelerated retted in the lab-scale pilot unit at different times (R3PPSM and R5PPSM) 205

Figure V.8. A) Evolution of the crystallinity degree and the melting temperature A) of neat PP and biocomposites with fibres harvested at EF (R0PPEF) and field retted at different times (R3PPEF, R5PPEF and R11PPEF), B) of neat PP and biocomposites with fibres harvested at SM (R0PPSM) and retted in the lab-scale pilot unit at different times (R1PPSM, R3PPSM and R5PPSM) 207

Figure V.9. Results of tensile strength (A), Young's modulus (B), and elongation at break (C) for neat PP and the biocomposites with fibres harvested at end of flowering (R0PPEF) and field retted at different retting durations (R3PPEF, R5PPEF and R11PPEF). The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively 210

Figure V.10. Results of tensile strength (A), Young's modulus (B), and elongation at break (C) for neat PP and biocomposites with fibres harvested at seed maturity (R0PPSM with MA-g-PP and R0PPSMref without MA-g-PP) and retted in the lab-scale pilot unit at different retting durations (R1PPSM, R3PPSM, R5PPSM). The back crosses and red line correspond to the means and medians, respectively 211

Figure V.11. Tensile fracture cross-sections of A) PP/unretted hemp fibres biocomposite without MA-g-PP, B) PP/unretted hemp fibres biocomposite with MA-g-PP, C) PP/field retted hemp fibre biocomposite with different retting durations: 3 weeks, D) 5 weeks, E) 11 weeks. 213

Figure V.12. Scattergrammes des diamètres mesurés des fibres non rouies (R0SM) et rouies au laboratoire (R3SM, R5SM et R9SM). La croix et les lignes rouges correspondent aux moyennes et médianes, respectivement. 216

Figure V.13. Résultats de résistance à la rupture (A), module Young (B) et déformation (C) pour les fibres non rouies (R0SM) et rouies au laboratoire (R1SM, R3SM et R5SM). Les croix noires et les lignes rouges correspondent aux moyennes et médianes, respectivement. 217

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.1. Variétés de chanvre inscrites aux catalogues français	21
Tableau I.2. Stades de croissance du chanvre.....	23
Tableau I.3. Composition chimique des fibres de chanvre de différentes variétés d'après la littérature	32
Tableau I.4. Propriétés mécaniques des fibres de chanvre d'après la littérature.....	40
Tableau I.5. Caractéristiques morphologiques de quelques fibres végétales (intervalles et moyennes) [96-98]	41
Tableau I.6. Comparaison entre les fibres végétales et les fibres de verre	43
Tableau I.7. Caractéristiques mécaniques des composites polypropylène/fibres végétales. Méthode de fabrication par compression à 180°C (5 bars), à 40% en masse de fibres aléatoirement dispersées [35].....	44

CHAPITRE II

Table II.1. Name of samples collected during different retting times	83
Table II.2. Crystallinity order index of unretted (R0) and retted hemp fibres (R3, R5 and R9) ..	94
Table II.3. Name of samples collected during different retting times for different harvest periods	109
Table II.4. Evolution of crystallinity order index during retting of fibres harvested at EF and SM	120

CHAPITRE III

Table III.1. Name of samples collected during different retting times.....	141
Table III.2. Odor intensity assessment	145
Table III.3. List of identified compounds and their concentrations (μg toluene equivalent m^{-3}) N.B : Not identified.	149
Table III.4. Olfactometric analyses and intensity evaluation of the stems harvested at the end of flowering.....	161
Table III.5. Olfactometric analyses and intensity evaluation of the stems harvested at the seed maturity	162

CHAPITRE IV

Tableau IV.1. Nomenclature des prélèvements réalisés pendant la culture de chanvre de 2017. FF : Fin de floraison ; PS : Période de semence.....	174
Tableau IV.2. Conditions réactionnelles des qPCR permettant de cibler les communautés archée, bactérienne et fongique.....	179
Tableau IV.3. Estimation de $t_{1/2}$ et $t_{1/4}$ (jours) pour chaque compartiment et à chaque température testée. SC : Sol cultivé ; SR : Système racinaire ; SNC : Sol Non Cultivé.....	182

CHAPITRE V

Table V.1. Biocomposites used in the study.....	200
--	-----

Approche intégrée du procédé de rouissage des fibres de chanvre : Vers une amélioration de la qualité des intrants pour la fabrication des matériaux biocomposites

Les réelles opportunités de croissance dont bénéficient les marchés liés à l'utilisation de fibres végétales en tant que renfort dans les matériaux composites sont intimement liées aux performances concurrentielles de ces fibres par rapport à celles de fibres de verre en particulier l'allègement, l'amortissement et l'isolation thermique. Dans l'industrie de la fibre de chanvre, le rouissage est le premier traitement appliqué aux plantes afin de faciliter la séparation des fibres de la partie ligneuse centrale de la tige. Ce traitement est actuellement réalisé de manière empirique en champ conduisant à l'obtention de fibres de qualité variable (couleur, morphologie, microstructure, composition biochimique, propriétés thermiques et mécaniques) ce qui constitue un frein à leur utilisation plus large dans des composites hautes performances. Par conséquent, la maîtrise du rouissage est primordiale. L'objectif de ce travail de thèse est de développer une approche globale de cette étape-clé de la production des fibres de chanvre en combinant à la fois l'étude du mécanisme biologique du rouissage, celle des caractéristiques intrinsèques des fibres et celle des émissions gazeuses et des odeurs associées à l'étape de rouissage. Différents items ont été particulièrement examinés :

- L'influence de la durée du rouissage et de la période de récolte sur les caractéristiques intrinsèques des fibres de chanvre (couleur, morphologie, composition biochimique, microstructure, propriétés mécaniques, propriétés thermiques).
- L'évolution des émissions de Composés Organiques Volatils (COV) et de l'odeur lors du rouissage en champ.
- La dynamique temporelle des densités de population des communautés bactériennes et fongiques pendant le rouissage
- L'impact du rouissage en champ (climat méditerranéen) et du rouissage accéléré (conditions contrôlées en laboratoire) sur les propriétés microstructurales, thermiques et mécaniques d'un biocomposite polypropylène/fibre de chanvre

Mots-clés : fibre de chanvre, rouissage en champ, rouissage contrôlé, mécanismes biologiques, période de récolte, propriétés mécaniques, propriétés thermiques, morphologie, composition biochimique, composés organiques volatils, odeurs, biocomposite

Integrated approach to the retting process of hemp fibers: Towards an improvement of the quality of inputs for the manufacture of biocomposite materials

The natural fibres are increasingly used as reinforcements in polymer composites due to their challenging performances compared to conventional fibres in term of good specific mechanical properties, damping and thermal insulation. In the hemp industry, the retting is an upstream processing applied to the plants in order to facilitate the separation of fibres from the central woody part of the stem. This treatment is currently carried out in an empirical way in the fields that leads to a large variability in the hemp fibres intrinsic characteristics (color, morphology, biochemical composition, microstructure, thermal and mechanical properties) which limit their large use in high-performance composites. Therefore, controlling retting treatment is a crucial step. The aim of this thesis is to develop a global approach to this key step in the production of hemp fibers by combining the study of the biological mechanism of retting, the intrinsic characteristics of fibers and that of emissions volatile organic compounds and odors associated with the retting step. Different items were particularly examined:

- The influence of retting duration and harvest period on the intrinsic characteristics of hemp fibers (color, morphology, biochemical composition, microstructure, mechanical and thermal properties).
- The evolution of Volatile Organic Compounds (VOCs) and odors of hemp stems during field retting
- Temporal dynamics of population densities of bacterial and fungal communities during retting
- The impact of field retting (Mediterranean climate) and accelerated retting (controlled conditions in the laboratory) on the microstructural, thermal and mechanical properties of a polypropylene / hemp fibers biocomposite

Key words: hemp fibre, field retting, controlled retting, biological mechanisms, harvest period, mechanical properties, thermal properties, morphology, biochemical composition, volatile organic compounds, odors, biocomposite