



HAL
open science

La biomasse lignocellulosique, un milieu poreux particulier : étude expérimentale de sa dégradation par hydrolyse enzymatique

Sarah Blosse

► To cite this version:

Sarah Blosse. La biomasse lignocellulosique, un milieu poreux particulier : étude expérimentale de sa dégradation par hydrolyse enzymatique. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2023. Français. NNT : 2023INPT0026 . tel-04166349

HAL Id: tel-04166349

<https://theses.hal.science/tel-04166349v1>

Submitted on 19 Jul 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme SARAH BLOSSE

le mercredi 25 janvier 2023

Titre :

La biomasse lignocellulosique, un milieu poreux particulier : étude expérimentale de sa dégradation par hydrolyse enzymatique.

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT)

Directeur(s) de Thèse :

M. PAUL DURU

M. CÉDRIC MONTANIER

Rapporteurs :

M. LAURENT OXARANGO, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

MME CECILE HERVE, UNIVERSITE SORBONNE

Membre(s) du jury :

M. VINCENT BURLAT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. ANTOINE BOUCHOUX, INRA TOULOUSE, Invité(e)

M. CÉDRIC MONTANIER, INRA TOULOUSE, Membre

M. JOHNNY BEAUGRAND, INRA NANTES, Membre

M. PAUL DURU, TOULOUSE INP, Membre

Résumé

La valorisation de la biomasse végétale représente un enjeu environnemental et industriel considérable au regard de notre demande croissante en énergie renouvelable et en molécules d'intérêt pour l'industrie chimique. Accéder à cette ressource nécessite de déconstruire cette biomasse particulièrement récalcitrante de manière contrôlée. Cette étape reste à ce jour un verrou majeur au développement de procédés viable et économiquement pertinents. Dans la Nature, bactéries et champignons ont développé tout un panel d'enzymes à la modularité très variable, permettant de métaboliser les molécules carbonées présentes dans les parois végétales. Ce travail de thèse a pour ambition d'améliorer notre compréhension des mécanismes biochimiques et biophysiques mis en œuvre lors de cette dégradation enzymatique de la biomasse végétale. Son originalité est d'étudier l'action enzymatique par l'utilisation de métrologies et techniques issues de l'étude des milieux poreux. Ces techniques sont particulièrement bien adaptées au type d'échantillons qui nous intéresse (paille de blé) et permettent ainsi de considérer la paroi végétale dans toute sa complexité (un milieu poreux complexe et tridimensionnel).

Dans une première partie, nous montrons que la microtomographie à rayons X (μ CT) permet le suivi temporel, en 3 dimensions, de la dégradation enzymatique d'une biomasse lignocellulosique modèle, la paille de blé. Grâce à un traitement des images 3D spécifique, développé au cours de la thèse, nous observons en particulier la disparition progressive de certaines parois cellulaires riches en cellulose, au fur et à mesure de l'attaque enzymatique.

Dans un second temps, et dans le but de sonder les effets de l'action enzymatique à des échelles spatiales non résolues par la visualisation en μ CT (inférieures au micron), nous avons effectué des expériences d'élution d'un traceur radio-opacifiant saturant initialement la paille de blé, notamment par un suivi en radiographie X. Un modèle simple de transport diffusif au sein de la paille est utilisé pour extraire un coefficient de diffusion effectif des traceurs au sein de la paille. Des résultats préliminaires sont obtenus pour différents types de traceurs, pour des échantillons natifs ou ayant subi une attaque enzymatique.

En résumé, durant cette thèse nous nous sommes attelés à adapter des techniques et des méthodologies issues de l'étude des milieux poreux pour affiner notre compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la dégradation de la paille de blé par des enzymes.

Abstract

The valorisation of plant biomass represents a considerable environmental and industrial challenge in view of our growing demand for renewable energy and molecules of interest for the chemical industry. Access to this resource requires the controlled deconstruction of this particularly recalcitrant biomass. This step remains a major obstacle to the development of viable and economically relevant processes. In Nature, bacteria and fungi have developed a whole panel of enzymes with very variable modularity, allowing them to metabolise the carbonated molecules present in the plant cell walls. This thesis aims to improve our understanding of the biochemical and biophysical mechanisms involved in this enzymatic degradation of plant biomass. Its originality is to study the enzymatic attack by using metrology and techniques from the study of porous media. These techniques are particularly well adapted to the type of samples we are interested in (wheat straw) and thus make it possible to consider the plant cell wall in all its complexity (a complex and three-dimensional porous medium).

In the first part, we show that X-ray microtomography (μ CT) allows the temporal monitoring, in 3 dimensions, of the enzymatic degradation of a model lignocellulosic biomass, wheat straw. Thanks to a specific 3D image processing, developed during the thesis, we observe in particular the progressive disappearance of certain cell walls rich in cellulose, as the enzymatic attack progresses.

In a second step, and with the aim of probing the effects of the enzymatic action at spatial scales not resolved by μ CT visualisation (sub-micron), we carried out elution experiments of a radio-opacifying tracer initially saturating the wheat straw, notably by X-ray monitoring. A simple model of diffusive transport within the wheat straw is used to extract an effective diffusion coefficient of the tracers within the straw. Preliminary results are obtained for different types of tracers, for native and enzymatically degraded samples.

In summary, during this thesis we have adapted techniques and methodologies from the study of porous media to refine our understanding of the mechanisms involved in the enzymatic degradation of wheat straw.

Remerciements

Pour commencer je souhaiterais remercier sincèrement mes directeurs de thèse, Paul Duru, Cédric Montanier et Antoine Bouchoux, pour leur accompagnement, aide, soutien, encouragements et précieux conseils tout au long de cette thèse. Merci pour le temps que vous m'avez accordé et qui m'a permis de mener à bien cette thèse. Merci particulièrement pour votre présence durant la période du covid et des confinements ainsi pour votre soutien primordial durant la période de rédaction.

Je voudrais ensuite remercier les membres du jury Laurent Oxarango, Cécile Hervé, Vincent Burlat et Johnny Beaugrand d'avoir accepté d'évaluer ce travail, d'avoir consacré du temps à lire ce manuscrit et à me suggérer des pistes d'amélioration. Je souhaiterais aussi vous remercier pour la richesse des discussions menées lors de la soutenance de thèse.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes ayant collaborées et aidées à ce projet. Julien Lefort, Frédéric Bergame et Gianluca Cioci pour leur aide et conseils sur les dispositifs expérimentaux. Christophe Tenailau et Benjamin Duployer pour m'avoir formée et conseillée pour l'utilisation du tomographe à rayons X du CIRIMAT. Je souhaiterais aussi remercier toutes les personnes des plateformes TRI-Genotoul et FR-AIB pour m'avoir permis et aidé à utiliser le MEB ainsi que le microscope confocal. Merci aussi à Marie Faruch du CHU de Purpan de m'avoir donné accès à des agents de contraste médicaux.

Je souhaiterais aussi remercier toutes les personnes de l'IMFT, TBI et de la fondation FERMaT avec qui j'ai pu interagir pour les discussions scientifiques, leurs suggestions et idées.

Je voudrais aussi remercier Laurent Malaquin et Roberto Riesco qui m'ont encadré lors de mon stage de fin d'étude et qui m'ont permis de confirmer ma volonté de faire une thèse. Merci de m'avoir guidée et encouragée.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans toutes les personnes et ami.e.s rencontré.e.s grâce à cette thèse. Pour votre amitié et pour tous ces moments merci Nicolas, Dylan, Klervia, Bilal,

Cyril, Élise, TERENCE, Ahmed, Younes, Abi, Baptiste, Naomi, Benjamin, Victor, Aty, et ceux que je n'ai pas cités. Merci aussi à la Mécanique de Cuivres et à tous ces membres incroyables pour avoir permis de passer cette thèse en fanfare. Un merci particulier à Lylian pour ton amitié et ton soutien depuis mon premier jour toulousain. Merci à Lucas qui m'a épaulé au début de cette thèse et pendant les confinements. Merci Lou pour ton amitié depuis toutes ces années, pour ton soutien et ton écoute.

Merci Gabriel pour ta présence, tes mots, ta patience, ton amour, ton soutien moral et émotionnel durant cette thèse et en particulier sur la fin.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner ma famille. Merci à vous tou.te.s pour votre soutien sans faille, pour vos conseils et pour votre amour.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	5
Remerciements.....	7
Introduction générale	11
Références introduction générale	15
Partie 1 : Étude par tomographie à rayons X de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé	19
Table des matières détaillée - Partie 1	20
Chapitre 1. Étude bibliographique	25
Chapitre 2. Acquisition des données par tomographie à rayons X, préparation des échantillons et autres techniques d'imagerie.....	51
Chapitre 3. Traitement et exploitation des images de tomographie à rayons X.....	67
Chapitre 4. Résultats et discussion	103
Références de la partie 1	145
Partie 2 : Impact de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés effectives de la paille de blé : le cas du transport diffusif	157
Table des matières détaillée - Partie 2	158
Chapitre 1. Introduction et éléments bibliographiques	161
Chapitre 2. Dispositif expérimental	169
Chapitre 3. Modélisations : théorie et interprétation des données expérimentales ...	183
Chapitre 4. Résultats expérimentaux et discussion	205
Conclusion générale et perspectives	219
Annexe 1 : Rendus volumiques des échantillons digérés à différents temps d'exposition au cocktail enzymatique	224

Annexe 2 : Pré-étude par FPCL	227
Références de la partie 2	235

Introduction générale

À l'heure actuelle, la tendance mondiale est à l'augmentation de la population (le cap des huit milliards d'êtres humains ayant été dépassé en novembre 2022 [1]), à l'augmentation du niveau de vie et donc à l'augmentation de la demande en énergie et en ressources naturelles. L'énergie et les produits chimiques dérivés des ressources fossiles sont actuellement des piliers de ces augmentations et du développement qui en résulte. La combustion de ces ressources liée à leurs utilisations est par ailleurs un facteur aggravant des problèmes environnementaux actuels tels que le dérèglement climatique, à cause des émissions de gaz à effets de serre [2]. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives à cette dépendance aux ressources fossiles carbonées.

Heureusement, depuis plusieurs dizaines d'année, l'intérêt scientifique pour ces questions s'est accru et a permis le développement de méthodes de production d'énergie et de produits chimiques plus propres et plus durables, à partir de ressources non fossiles [3,4].

La biomasse lignocellulosique s'est imposée comme une des candidates parfaites pour tendre vers une émancipation vis-à-vis des ressources fossiles. Cette biomasse est une matière première dont le cycle de vie présente un bilan neutre en carbone, peu coûteuse, et abondante [4].

De nos jours, la production annuelle mondiale de déchets de biomasse végétale s'élève à environ 140 Gt par an et 66 % de ces déchets proviennent de l'agriculture céréalière (paille de céréales) [5]. La biomasse lignocellulosique est d'origine végétale et englobe une grande diversité de ressources comme par exemple les résidus/déchets de l'industrie forestière ou de l'agriculture (bagasse de canne à sucre, paille de céréales, déchets de scierie ou de papeterie, ...) [6]. À partir de cette dernière, une multitude de produits peuvent être obtenus [6]. Ces produits peuvent être utilisés dans de nombreuses industries telle que dans l'industrie pharmaceutique, agrochimique, aérospatiale, cosmétique ou encore biomédicale [7,8,9,10,11].

La biomasse lignocellulosique est composée principalement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Ces polymères sont organisés de manière à conférer, aux parois cellulaires qu'ils

composent, une résistance naturelle aux attaques chimiques et biologiques [12]. Cette récalcitrance naturelle représente un obstacle à la valorisation de cette biomasse.

Un des challenges de ces dernières années est donc la mise en œuvre des procédés pour extraire ces composants, pour ensuite les transformer. À l'échelle industrielle il existe deux grande famille de procédés de valorisation de la biomasse végétale : i) la conversion thermochimique incluant entre autre la pyrolyse, la torréfaction ou encore la liquéfaction thermique ; ii) la conversion biochimique comprenant la fermentation ou la digestion anaérobie. De par sa récalcitrance naturelle, la biomasse lignocellulosique ne peut être valorisée de façon optimale avec les technologies actuelles. Pour la production de méthane par exemple, le rendement n'est que de 50 % [13]. Pour pallier à ce problème, de nombreux prétraitements ont été développé pour faciliter la dégradation de la biomasse lignocellulosique et l'accessibilité aux polymères [6,12].

Dans la Nature, de nombreux microorganismes tels que des bactéries ou des champignons filamenteux mettent en œuvre des stratégies pour dégrader la biomasse lignocellulosique. Pour ce faire, ils produisent une large gamme d'enzymes, principalement de la famille des glycosides hydrolases (GHs) [14]. Ces enzymes sont des protéines qui agissent sur un substrat cible (un des polymères constitutifs de la biomasse) et permettent de rompre des liaisons covalentes, provoquant la dégradation progressive du substrat.

Il existe de nombreux travaux portant sur les GHs, en lien avec la dégradation enzymatique de la biomasse. Le travail présenté dans ce manuscrit a pour objectif de lever deux limitations de ces travaux, que nous allons aborder rapidement (elles seront précisées ultérieurement). Tout d'abord, ils sont généralement réalisés en utilisant des substrats modèles (substrat synthétiques et/ou des polysaccharides naturels purifiés) [15,16,17]. Cela conduit à une caractérisation de l'activité enzymatique dans des conditions éloignées de celles rencontrées lorsque les enzymes sont confrontées à un substrat naturel brut, en termes de reconnaissance et d'accessibilité de l'enzyme vers ses sites d'action au niveau du substrat. Si on souhaite lever cette limitation en travaillant sur un échantillon de biomasse plus réaliste, par exemple un fragment de biomasse brute, on est confronté à une difficulté métrologique : comment observer et quantifier l'action des enzymes sur un tel matériau, intrinsèquement tridimensionnel (3D), présentant une structure interne multi-échelle complexe ? Et ce sans préparation de l'échantillon pouvant perturber la dégradation enzymatique ?

C'est autour de cette problématique générale qu'est née une collaboration entre Cédric Montanier, de l'équipe Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatiques (CIMEs) du Toulouse Biotechnology Institute (TBI) et Paul Duru de l'équipe Milieux Poreux et Biologiques de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (MPB – IMFT). Le point de rencontre a été la technique de tomographie à rayons X, bien maîtrisée à l'IMFT, comme technique d'imagerie 3D permettant potentiellement de lever les limitations mentionnées ci-dessus. Ainsi, l'objectif premier de ce travail de thèse, qui faisait suite à des études préliminaires menées dans le cadre de 2 stages, était de questionner l'importance de l'aspect 3D dans la dégradation enzymatique d'une biomasse lignocellulosique réaliste, la paille de blé, pour tenter de contribuer à la compréhension des mécanismes de dégradation.

Cette problématique fait l'objet de la première partie de ce manuscrit. Elle porte donc sur l'étude par tomographie à rayons X de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé et comprend quatre chapitres. Après une introduction bibliographique (Chapitre 1) qui nous permettra de mieux comprendre le questionnement de fond de notre travail, nous présenterons dans le Chapitre 2 les matériels et techniques expérimentales employées. Nous y présenterons la technique de la tomographie à rayons X, puis nous introduirons nos échantillons et détaillerons leur préparation. Nous développerons la stratégie adoptée pour la dégradation enzymatique. Enfin, nous exposerons les techniques d'imagerie complémentaires que nous avons utilisées afin de compléter les observations faites par tomographie. Dans le Chapitre 3, nous entrerons dans les détails du traitement des images 3D obtenues par tomographie X. Nous développerons les différents traitements et méthodes mis en œuvre pour extraire des informations quantitatives de ces images. Enfin nous terminerons cette première partie par une présentation et une discussion des résultats obtenus grâce aux méthodes mises en place (Chapitre 4).

La seconde partie de ce manuscrit portera sur l'impact de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés effectives de la paille de blé et plus particulièrement le cas du transport diffusif d'une espèce en solution au sein d'un échantillon saturé en eau. Elle comporte quatre chapitres. Dans un premier temps, nous montrerons comment cette partie découle des travaux présentés dans la partie précédente, et de questions soulevées par les résultats. Nous

nous appuierons sur des éléments issus de la littérature. Dans le Chapitre 2, nous présenterons un dispositif expérimental original développé au cours de la thèse et les expériences dites d'élution qu'il permet de mener, tout en présentant la métrologie, basée sur la radiographie X. Ensuite nous développerons les modélisations théoriques et relevant de l'interprétation des données qui ont été utilisées avant de présenter les résultats (Chapitre 4). Pour finir nous clôturerons ce manuscrit avec une conclusion qui rapportera les points et résultats essentiels abordés au cours de ce travail exposé tout en ouvrant quelques perspectives.

Références introduction générale

1. Nations, U. La population mondiale atteindra 8 milliards d'habitants en novembre (ONU) | Nations Unies. *United Nations* <https://www.un.org/fr/https%3A//www.un.org/fr/desa-fr/la-population-mondiale-atteindra-8-milliards-dhabitants-en-novembre-onu>.
2. Devi, A. *et al.* Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach. *Bioenerg. Res.* **15**, 1820–1841 (2022).
3. Nanda, S. *et al.* Characterization of North American Lignocellulosic Biomass and Biochars in Terms of their Candidacy for Alternate Renewable Fuels. *Bioenerg. Res.* **6**, 663–677 (2013).
4. Shahzadi, T. *et al.* Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **5**, 246–251 (2014).
5. Tripathi, N., Hills, C. D., Singh, R. S. & Atkinson, C. J. Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *npj Clim Atmos Sci* **2**, 1–10 (2019).
6. Ning, P. *et al.* Recent advances in the valorization of plant biomass. *Biotechnol Biofuels* **14**, 102 (2021).
7. Francois JM, Alkim C, Morin N. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives. *Biotechnol Biofuels*. 2020;13:118.
8. Zhang L, Zhao R, Jia D, Jiang W, Gu Y. Engineering *Clostridium ljungdahlii* as the gas-fermenting cell factory for the production of biofuels and biochemicals. *Curr Opin Chem Biol*. 2020;59:54–61.
9. Curvello R, Raghuwanshi VS, Garnier G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2019;267:47–61.
10. Kwon G, Bhatnagar A, Wang H, Kwon EE, Song H. A review of recent advancements in utilization of biomass and industrial wastes into engineered biochar. *J Hazard Mater*. 2020;400:123242.
11. Guan W, Tsang CW, Lin CSK, Len C, Hu H, Liang C. A review on high catalytic efficiency of solid acid catalysts for lignin valorization. *Biore- sour Technol*. 2020;298:122432

12. Zoghalmi, A. & Paës, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front Chem* **7**, 874 (2019).
13. Azman, S., Khadem, A. F., van Lier, J. B., Zeeman, G. & Plugge, C. M. Presence and Role of Anaerobic Hydrolytic Microbes in Conversion of Lignocellulosic Biomass for Biogas Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **45**, 2523–2564 (2015).
14. Lopes, A. M., Ferreira Filho, E. X. & Moreira, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *J Appl Microbiol* **125**, 632–645 (2018).
15. Liberato, M. V. *et al.* Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an induced-fit enzymatic mechanism. *Sci Rep* **6**, 23473 (2016).
16. Gilmore, S. P., Lillington, S. P., Haitjema, C. H., de Groot, R. & O'Malley, M. A. Designing chimeric enzymes inspired by fungal cellulosomes. *Synthetic and Systems Biotechnology* **5**, 23–32 (2020).
17. Badruna, L. *et al.* The Jo-In protein welding system is a relevant tool to create CBM-containing plant cell wall degrading enzymes. *New Biotechnology* **65**, 31–41 (2021).

Partie 1 :

**Étude par tomographie à
rayons X de l'hydrolyse
enzymatique de la paille de
blé**

Table des matières détaillée - Partie 1

Chapitre 1. Étude bibliographique	25
1.1. Composition chimique de la biomasse lignocellulosique	25
1.1.1. Cellulose	26
1.1.2. Hémicelluloses.....	27
1.1.3. Pectines	29
1.1.4. Lignines.....	29
1.1.5. Protéines.....	30
1.1.6. Liaisons et assemblages des différents composants de la biomasse.....	31
1.2. Déconstruction de la biomasse lignocellulosique par des enzymes.....	32
1.2.1. Les cellulases	34
1.2.2. Les hémicellulases	35
1.2.3. Études sur les enzymes.....	35
1.3. La paille de blé.....	36
1.3.1. Anatomie de la paille de blé	37
1.3.2. Les parois végétales.....	39
1.3.1. La paille de blé : un milieu poreux ?	40
1.4. Imager des plantes	43
1.4.1. Un challenge à multi-échelle	44
1.4.2. Imagerie par microscopie	45
1.4.3. Imagerie 3D et non destructive par tomographie à rayons X.....	48
1.5. Retour sur les objectifs de ce travail.....	49
Chapitre 2. Acquisition des données par tomographie à rayons X, préparation des échantillons et autres techniques d'imagerie.....	51

2.1.	Acquisition d'images par tomographie à rayons X	51
2.1.1.	Présentation de la technique.....	51
2.1.1.i	Principes physiques	51
2.1.1.ii	Origine du contraste sur les images obtenues	54
2.1.1.iii	Tomographie en laboratoire vs tomographie synchrotron	54
2.1.1.iv	Résolution spatiale de la technique.....	55
2.1.2.	Protocole d'acquisition par tomographie X.....	56
2.2.	Échantillons de paille de blé pour la microtomographie : manipulation, préparation et hydrolyse enzymatique	60
2.2.1.	La paille de blé	60
2.2.2.	Test enzymatique	61
2.2.3.	Test DNS	61
2.2.4.	Préparation des échantillons pour la μ CT.....	63
2.3.	Autres approches d'imagerie.....	64
2.3.1.	Microscopie confocale.....	64
2.3.1.i	Marquage par calcofluor pour l'étude de la teneur en cellulose	64
2.3.1.ii	Premières indications sur la composition du PCL.....	65
2.3.2.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	66
2.4.	Conclusions.....	66
Chapitre 3.	Traitement et exploitation des images de tomographie à rayons X.....	67
3.1.	Traitement d'images (<i>denoising</i> , segmentation, ajustement d'histogrammes).....	67
3.1.1.	Débruitage	68
3.1.1.i	Choix des paramètres	69
3.1.1.ii	Effet de l'opération à l'échelle d'une coupe tomographique	75
3.1.2.	Segmentation / binarisation	76
3.1.2.i	Binarisation avec détermination d'un seuil « à l'œil nu »	77

3.1.2.ii	Binarisation par seuillage par hystérésis	80
3.1.2.iii	Détermination automatique du seuil dans le cas d'une binarisation simple 84	
3.1.3.	Ajustement des histogrammes (<i>histogram matching</i>)	85
3.2.	Exploitation des images : rendus volumiques 3D avec Avizo®	88
3.2.1.	Rendu volumique 3D	88
3.2.1.i	Application d'un masque	89
3.2.1.ii	Rendu volumique 3D	90
3.3.	Exploitation des images : analyse avec Matlab	92
3.3.1.	Ajustement spatial des images 3D, avant et après traitement enzymatique.	93
3.3.1.i	Recalage en z	93
3.3.1.ii	Recalage en θ	94
3.3.1.iii	Limites de l'ajustement spatial	96
3.3.2.	Positionnement de régions d'intérêt.....	97
3.3.3.	Données extraites des ROIs - Marqueurs de dégradation	100
3.3.4.	Des coupes tomographiques à des cartographies 2D du PCL de la paille de blé 101	
3.4.	Conclusions.....	102
Chapitre 4.	Résultats et discussion	103
4.1.	Vérification de l'activité enzymatique	103
4.1.1.	Contrôle de la stabilité du cocktail enzymatique.....	103
4.1.2.	Suivi DNS sur les échantillons tomographiés.....	105
4.2.	Résultats obtenus par tomographie à rayons X.....	108
4.2.1.	Paille de blé brute.....	108
4.2.1.i	Anatomie de la paille de blé brute : éléments connus	108
4.2.1.ii	Anatomie de la paille de blé brute : nouveaux éléments	111

	Plus grande densité effective du PCL.....	111
	Motif caractéristique en « treillis », au niveau du PCL	113
4.3.	Dégradation enzymatique de la paille de blé imagée par microtomographie à rayons X	116
4.3.1.	Première discussion générale des images 3D.....	120
4.3.2.	Marqueurs de la dégradation enzymatique : approche statistique	121
4.3.2.i	Étude statistique sur un ensemble de régions d'intérêt : principe.....	121
4.3.2.ii	Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : distribution de niveau de gris.....	123
4.3.2.iii	Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : valeur moyenne et nombre de voxels appartenant au matériau PCW	127
4.3.2.iv	Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : discussion des résultats	129
4.3.3.	Approche locale : un moyen de questionner l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique aux temps courts	135
4.3.3.i	Une représentation 2D du PCL : observations qualitatives	135
4.3.3.ii	Représentation 2D du PCL : analyse des corrélations entre les images obtenues avant et après attaque enzymatique.....	139
4.4.	Conclusion	142
	Références de la partie 1	145

Chapitre 1. Étude bibliographique

Dans ce Chapitre, nous introduisons les éléments bibliographiques nécessaires pour mieux comprendre le cadre de ce travail, avant de conclure en précisant les grands objectifs de cette première partie, abordés rapidement dans l'Introduction Générale.

La biomasse végétale désigne la masse totale d'organismes végétaux vivants contenue dans un environnement et à un temps donné [1]. La biomasse lignocellulosique est une biomasse végétale terrestre et est principalement composée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et parfois de pectine) et d'un polymère aromatique (lignine) [2].

Lors de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés en particulier au blé tendre (*Triticum aestivum*). Le blé est une céréale à la base de l'alimentation d'une partie conséquente de la population mondiale. La production mondiale de blé sur l'exercice 2020/2021 est d'environ 775 millions de tonne d'après la Food and Agriculture Organization (FAO) [3]. Le blé est depuis très longtemps un aliment de base de notre alimentation, les historiens s'accordent pour dire que cette céréale a été domestiquée entre 7500 et 6500 av. J.-C. dans le croissant fertile [4]. Dans la suite de cette section, nous décrirons dans un premier temps les composants chimiques de la biomasse lignocellulosique, puis nous discuterons des voies enzymatiques de dégradation de la biomasse lignocellulosique. Nous aborderons ensuite notre sujet d'étude qu'est la paille de blé. Nous décrirons son anatomie, son caractère multi-échelle et pourquoi peut-on la considérer comme un milieu poreux..

1.1. Composition chimique de la biomasse lignocellulosique

Nous allons commencer par une description générique des différents composés présents dans les parois végétales de la biomasse lignocellulosique. Ces dernières sont majoritairement constituées de polymères de type polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et parfois de pectines), de lignine (également un polymère) et de protéines. Hormis ces dernières, ces composants sont associés par des forces non covalentes et des liaisons

transversales covalentes [4]. La proportion entre ces différents composés varie en fonction de l'espèce végétale considérée et de ses conditions de croissance [6].

Avant de commencer, il est important de faire un point de définition sur les hydrates de carbone dont la cellulose, les hémicelluloses et les pectines font partie. Les hydrates de carbone sont composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et respectent la formule empirique $C_x(H_2O)_y$ où x et y sont supérieurs ou égaux à 3 [7]. Ils peuvent être séparés en trois classes : i) les monosaccharides ; ii) les oligosaccharides ; iii) les polysaccharides.

Les monosaccharides sont les hydrates de carbone les plus simples, ils sont aussi appelés sucres simples. Ces sucres simples peuvent être organisés sous la forme de chaînes ouvertes majoritairement lorsqu'ils possèdent 3 ou 4 carbones, mais lorsqu'ils en possèdent plus ils forment une structure en cycle. Les sucres pouvant ouvrir leur structure cyclique sont appelés sucres réducteurs, ils peuvent alors agir comme agent réducteur i.e. ils sont capables de céder un électron à un récepteur (agent d'oxydation) [7]. Les oligosaccharides désignent de courts polymères qui comptent au maximum 10 monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques [7]. Les polysaccharides quant à eux sont des oligomères beaucoup plus longs, pouvant compter plusieurs centaines à plusieurs milliers de sucres [7].

1.1.1. Cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant sur Terre et est l'un des composants majeurs de la biomasse lignocellulosique [8]. La cellulose est un polymère linéaire composé d'unités de glucose liées entre elles par des liaisons β -(1,4), c'est-à-dire des liaisons covalentes entre le carbone 1 d'une première unité et le carbone 4 d'une seconde. La liaison entre ces unités porte la dénomination β car les unités de glucose ont leur groupement hydroxyle qui présente une stéréochimie différente.

La cellulose est présente dans la Nature majoritairement sous sa forme cristalline et organisée en fibrilles [9]. C'est cette même cellulose qui constitue le squelette des parois cellulaires. Les unités de glucose par molécule (i.e. le degré de polymérisation) peuvent aller de 15 jusqu'à 10 000-16 000 [10] et ces glucoses sont organisés de façon antiparallèle, ce qui signifie que les chaînes adjacentes vont dans des directions opposées. La cohésion entre les différentes chaînes est assurée par des liaisons hydrogènes. Les chaînes liées entre elles forment des feuillets. Les différents feuillets sont liés par des liaisons hydrophobes. C'est l'agrégation

entre différents feuillets qui forme les microfibrilles [10]. Ces fibrilles présentent des zones cristallines (ordonnées) et des zones amorphes (désordonnées), Figure 1 [5, 10].

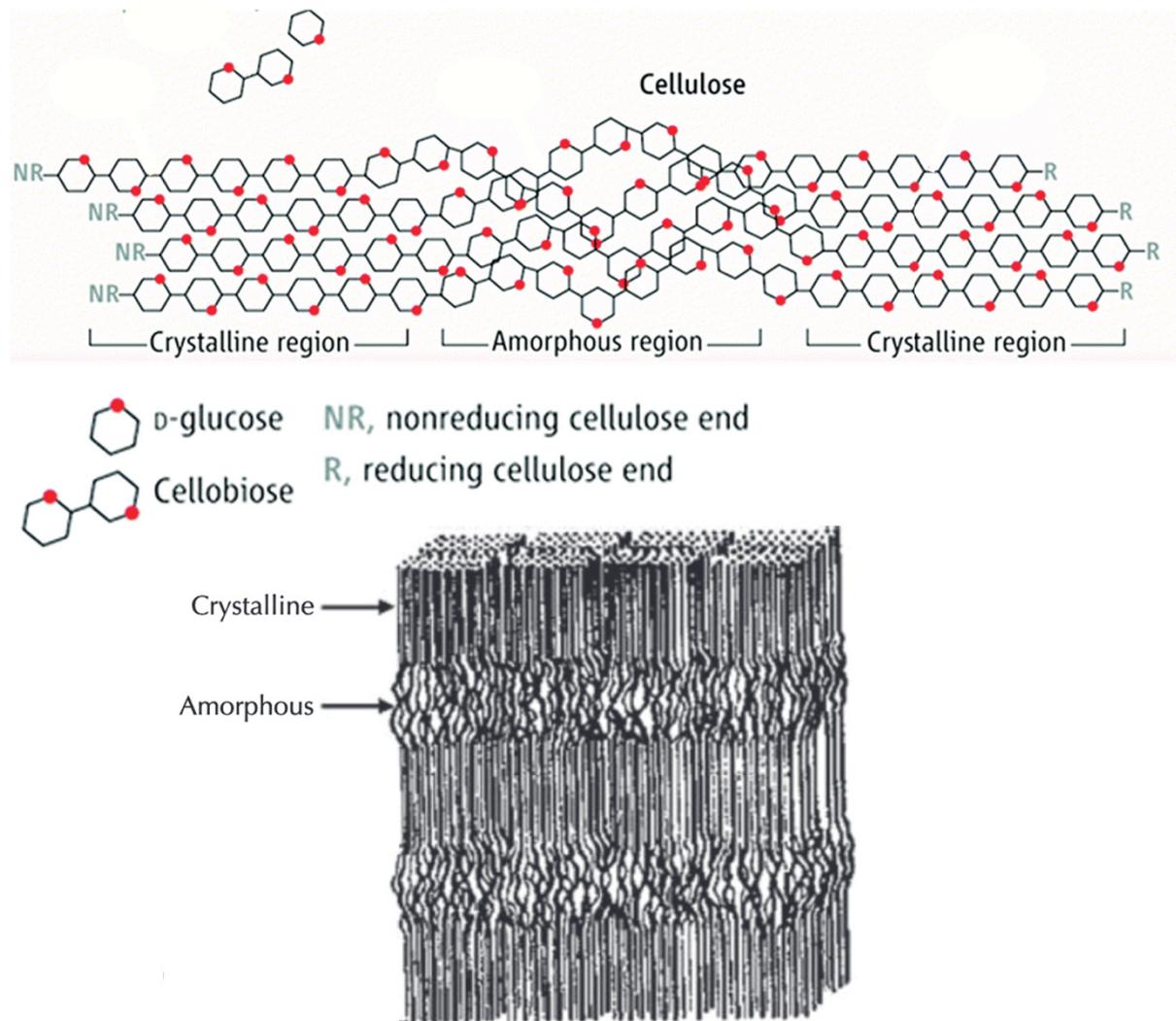


Figure 1 : Haut : Schéma de fibre de cellulose formant une microfibrille avec l'alternance de zones cristallines et amorphes [5]. Bas : Représentation de fibre de cellulose formant une microfibrille avec l'alternance de zones cristallines et amorphes. Figure composée à partir de figures issues du chapitre 5 du livre de *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* [10].

1.1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une famille de polymères plus complexes que la cellulose, dont la chaîne principale est constituée de pyranose (i.e. xylose ou mannose) avec des substitutions qui peuvent être des sucres (i.e. arabinose) ou des groupements chimiques. La Figure 2 est

un schéma représentant une hémicellulose dont la chaîne principale est composée de xylose (en vert) et nous montre des substitutions possibles (en gris).

Il existe quatre classes d'hémicelluloses en fonction de leur structure : i) les xylanes ; ii) les xyloglucanes ; iii) les mannanes et iv) les β -glucanes à liaisons multiples.

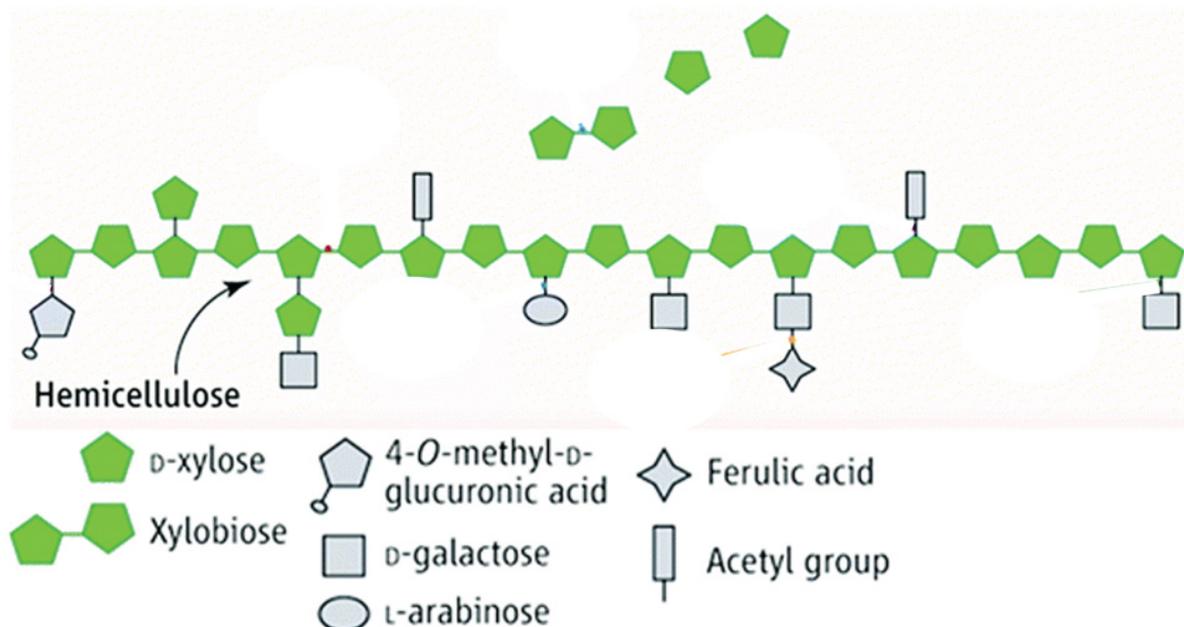


Figure 2 : Schéma générique d'une hémicellulose dont la chaîne principale est composée d'unités de xylose. [11].

Dans la paille de blé, les hémicelluloses appartiennent à la famille des xylanes, et plus précisément sont de l'arabinoxylane [12].

Les xylanes sont des hémicelluloses linéaires composant les parois cellulaires végétales.

Ils possèdent une chaîne principale composée de résidus de xylose reliés entre eux par des liaisons β -(1,4) [13]. Cette chaîne principale est souvent substituée par une variété de petites molécules d'hydrates de carbone, comme de l'arabinose auquel cas on parle d'arabinoxylane.

De plus, d'autres petits groupes chimiques tels que l'acétyle, les acides phénoliques, féruliques ou coumariques sont parfois liés à la chaîne principale ou aux sucres en position latérale [14].

Les xyloglucanes sont des polysaccharides présents dans les parois cellulaires végétales [15].

Leur chaîne principale est constituée de résidus β -D-glucopyranosyle [16]. Ils sont parfois substitués par des polysaccharides ou des oligosaccharides courts composés d'arabinose ou de galactose [17]. Près de vingt-quatre types différents de xyloglucanes ont été identifiés dans

différents groupes de plantes sur la base de leurs chaînes latérales et de leurs substitutions de chaînes latérales [16]

Les mannanes sont des hétéroglycanes hémicellulosiques structurellement complexes impliqués dans le maintien du stockage et de la structure de la paroi cellulaire chez les plantes [18,19,20]. Structurellement, les mannanes sont de quatre types, les homomannanes, les galactomannanes, les glucomannanes et les galactoglucomannanes [20]. Le squelette des homomannanes et des galactomannanes sont constitués exclusivement de résidus de mannose liés entre eux par des liaisons β -(1,4). D'autre part, les glucomannanes et les galactoglucomannanes ont un squelette de mannose qui est interrompu par des motifs non répétés de glucose [18].

Pour finir les β -glucanes à liaisons multiples sont des constituant des parois cellulaires de la paille de blé. Généralement constitués de chaînes de glucose reliées par des liaisons β -(1-4) et interrompues par des liaisons β -(1-3) [21].

1.1.3. Pectines

Les pectines sont, au même titre que la cellulose et les hémicelluloses, des polysaccharides. Elles se caractérisent par une grande quantité d'acide galacturonique. Il existe un grand nombre de pectines différentes dont les chaînes principales peuvent être composées de 17 monosaccharides différents, dont on peut citer par exemple le rhamnose. Les pectines sont composées de sous-structures qui sont elles-mêmes des polysaccharides. Elles sont liées entre elles de façon covalente afin de former le complexe macromoléculaire que l'on nomme pectine [22].

1.1.4. Lignines

La lignine est un polymère structurel qui ajoute de la force et de la rigidité aux parois cellulaires de la paille. Elle est composée d'unités de phényle propane qui forment un réseau complexe. Le haut de la Figure 3 présente les trois monomères principaux qui constituent la lignine : l'alcool coniférique, l'alcool sinapique et l'alcool p-coumarique [23,24]. Le bas de cette même figure propose un exemple d'une lignine.

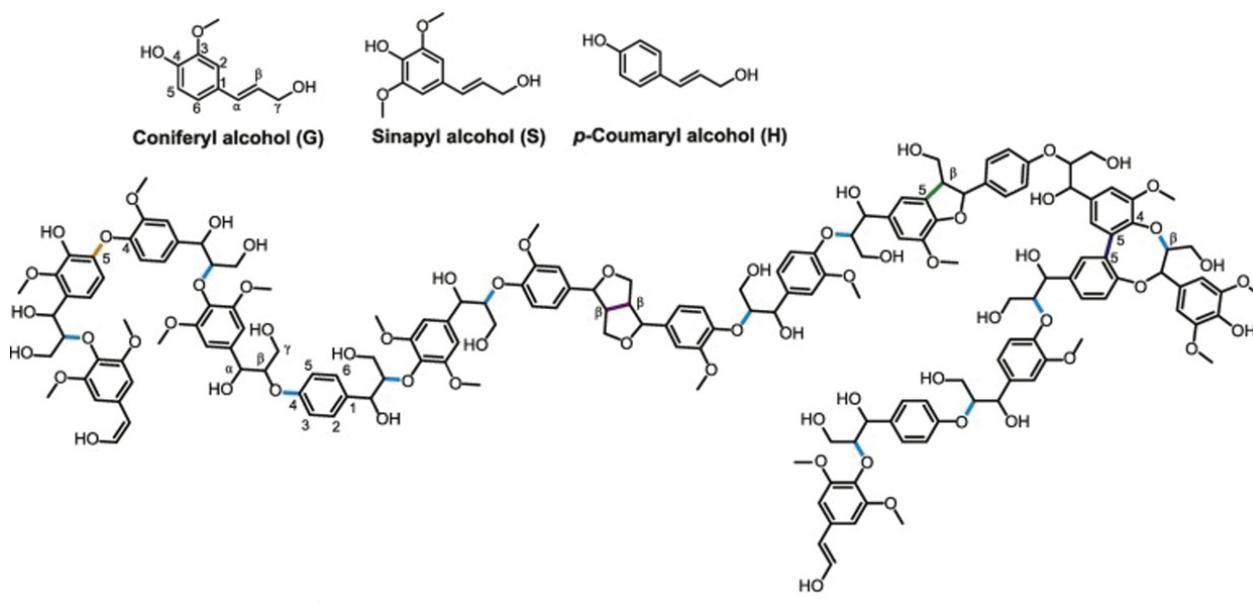


Figure 3 : Haut : Structure des trois principaux composants des lignines (l'alcool coniférique, l'alcool sinapique et l'alcool p-coumarique). Bas : exemple de lignine [25].

La lignine est liée de façon covalente à l'hémicellulose. Elle assure aussi l'hydrophobicité des faisceaux vasculaires. Au cours du temps de vie de la biomasse lignocellulosique les parois cellulaires ont une tendance à se lignifier [24].

1.1.5. Protéines

Une grande variété de protéine est présente dans les parois cellulaires végétales : les études protéomiques actuelles en relèvent environ 1000 différentes [26] ! La quantité et la diversité des protéines dépendent de l'espèce étudiée. Les travaux menés sur ce sujet ont permis de classer les protéines en 9 classes [27] :

- Les protéines agissant sur les hydrates de carbone de la paroi cellulaire [28,29].
- Les oxydoréductases [30].
- Les protéases [31,32].
- Les protéines liées au métabolisme lipidique comprennent les protéines de transfert des lipides [33].
- Les protéines susceptibles d'être impliquées dans la signalisation [34].
- Les protéines avec des domaines d'interaction comprennent les protéines qui interagissent avec d'autres protéines, comme les inhibiteurs d'enzymes, ou avec les glucides de la paroi cellulaire [35].

- Les protéines structurelles [36].
- Les protéines diverses comprennent les protéines qui ne peuvent pas être classées dans les autres groupes [37].
- Les protéines dont la fonction encore inconnue [26].

1.1.6. Liaisons et assemblages des différents composants de la biomasse

Les hémicelluloses et les pectines lient entre elles les fibrilles de cellulose. Certaines hémicelluloses, notamment les xylanes et les arabinoxylanes, sont liées voire intriquées avec les fibrilles de cellulose grâce à des liaisons hydrogènes [38, 39, 40]. D'autres hémicelluloses, en particulier celles portant des substitutions par des acides glucuroniques, aident à la stabilisation des liaisons entre cellulose et hémicelluloses. Les hémicelluloses auraient un rôle de protection de la cellulose ce qui limiterait la dégradation de la cellulose notamment par les enzymes [38]. La lignine a elle aussi un rôle de protection des fibrilles de cellulose. Elle les protège de l'hydrolyse enzymatique [41]. La lignine est aussi liée aux hémicelluloses, elles peuvent former des liaisons covalentes entre elles. Les interactions entre les xylanes et les lignines peuvent créer un réseau [42]. Toutes ces liaisons et intrications entre les différents composés confèrent une structure complexe aux parois cellulaires de la biomasse lignocellulosique. La complexité de cet entremêlas est illustrée par le schéma de la Figure 4. Cette complexité est aussi amplifiée par la diversité des composés et des liaisons entre eux.

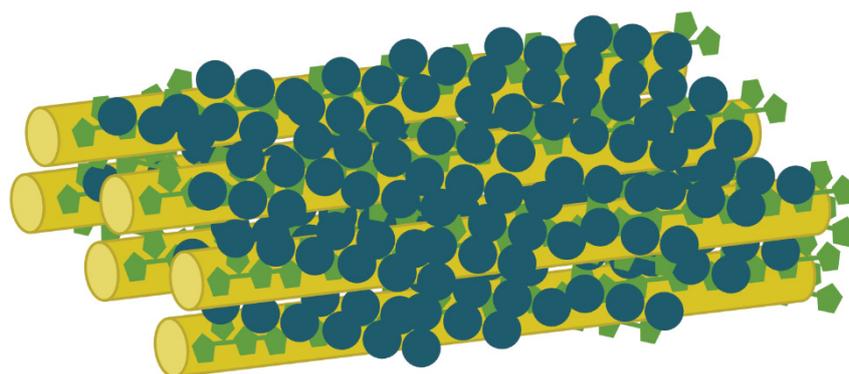


Figure 4 : Schéma de la structure complexe des différents composés liés entre eux pour former la paroi cellulaire. Cylindre jaune : fibrille de cellulose ; Pentagone vert : hémicelluloses ; Rond bleu : lignines. Inspiré de Loqué et al. 2015 [43].

La complexité des parois leur permet d'être récalcitrantes aux dégradations chimiques et biologiques. Afin de valoriser cette biomasse lignocellulosique il est donc nécessaire d'avoir une voie de dégradation efficace et optimisée. La dégradation à l'aide d'enzymes est l'une des voies possibles. Elle est largement étudiée et décrite dans la littérature et nous allons maintenant en discuter.

1.2. Déconstruction de la biomasse lignocellulosique par des enzymes

Comme nous venons de le décrire, les parois cellulaires végétales (on utilisera ci-dessous l'acronyme PCW, pour Plant Cell Wall) sont constituées d'une matrice composite complexe de cellulose, d'hémicelluloses, de protéines et de lignine dont tous les composants sont liés les uns aux autres [45]. Ce matériau est très récalcitrant à la dégradation chimique ou biologique. Cependant, les microorganismes cellulolytiques tels que les bactéries et les champignons filamenteux sont capables d'utiliser la biomasse du PCW comme source de carbone [46]. La base de données CAZy répertorie tous les gènes connus codant des enzymes actives sur les sucres. Ces enzymes et gènes sont catégorisés en différents groupes et familles : les glycosides hydrolases, les glycosyle transférases, les carbohydrates estérases, les polysaccharide lyases et les carbohydrate binding module [29]. La diversité d'enzymes étant importante nous allons nous concentrer pour la suite de cette étude sur la plus grande famille d'enzymes : les glycosides hydrolases (GHs).

Les glycosides hydrolases sont un groupe large et diversifié d'enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques entre les hydrates de carbone. Les GHs constituent un groupe très répandu d'enzymes et comprennent notamment les cellulases et les hémicellulases [47].

Une enzyme, tout comme les protéines, est composée d'acides aminés organisés en éléments structuraux, conférant à la molécule une structure générale caractéristique de sa fonction biologique. Sa taille caractéristique varie généralement entre 5 et 20 nm. Mais contrairement aux protéines, une enzyme présente en plus une activité chimique. Elle agit comme un catalyseur chimique renouvelable, qui facilite les réactions biochimiques. L'hydrolyse enzymatique est une réaction au cours de laquelle un type liaison covalente présente dans le substrat est rompu à l'aide l'action d'une molécule d'eau. C'est la réaction

catalytique des GHs qui permet de couper les polymères présents dans le PCW en sucres simples. L'agencement des différents éléments structuraux crée au sein de l'enzyme une cavité, ou poche, dans laquelle se trouvent des acides aminés qui vont permettre la réaction chimique, une hydrolyse dans le cas des GHs. C'est dans cette poche ou site catalytique (Figure 5) que le substrat va venir se loger. Le site catalytique présente une topologie très spécifique au substrat reconnu par une enzyme, à l'origine de la très grande diversité d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la biomasse végétale. Une enzyme est donc capable de démontrer une spécificité considérable dans son activité catalytique [48].

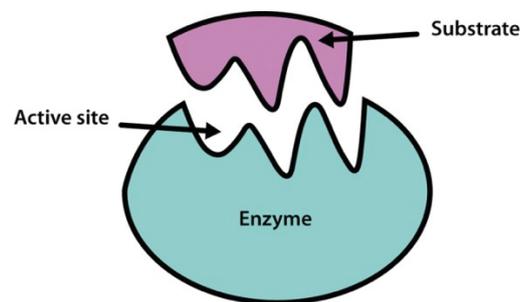


Figure 5 : Représentation schématique de la liaison entre le site catalytique d'une enzyme et le substrat [48].

La topologie du site catalytique a un réel impact sur la reconnaissance du substrat, sur la fixation de l'enzyme à ce dernier et donc sur l'activité enzymatique. Les enzymes de la famille des GHs présentent trois types de topologies : la forme poche (ou cratère), la forme canyon et la forme tunnel (ou fente) comme le montre la Figure ci-dessous [44].

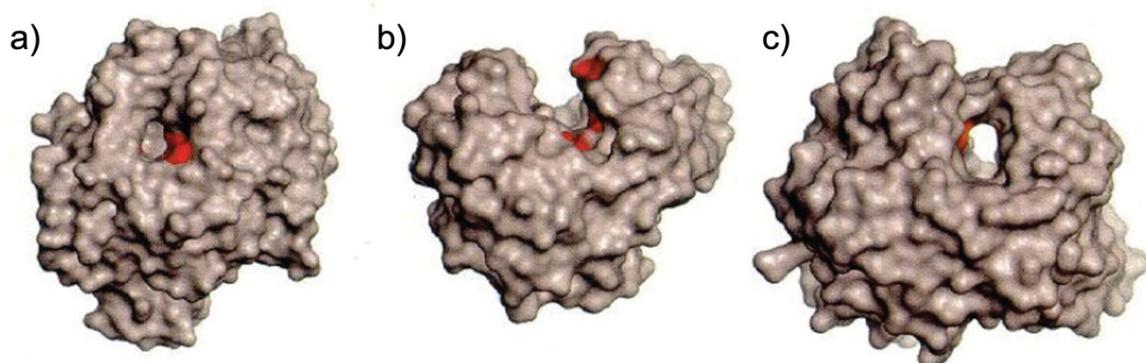


Figure 6 : Exemple de structure 3D de trois GHs différentes présentant chacune une des topologies présentes dans cette famille d'enzymes. a) topologie de type poche, b) topologie de type canyon, c) topologie de type fente. Figure issu des travaux de Davies et Henrissat, 1995 [44].

Les enzymes présentant une topologie en forme de poche vont reconnaître leur substrat grâce à une extrémité réductrice alors que les enzymes présentant une topologie en forme de canyon pourront se fixer au milieu de la chaîne principale du polysaccharide qu'elles hydrolysent. La topologie de type fente est une évolution de la topologie de type canyon [44]. L'accessibilité de l'enzyme au substrat est donc un point crucial pour permettre son activité. Comme nous l'avons dit précédemment la structure complexe des PCW rend difficile l'accessibilité au substrat et donc complique la dégradation enzymatique. De plus la géométrie et la taille de l'enzyme impactent sa capacité de déplacement au sein de la paille et donc sa capacité à accéder au substrat. Il faut que l'enzyme puisse se déplacer à l'intérieur du PCW. Par ailleurs, il est aussi crucial de combiner l'action de plusieurs enzymes spécifiques à chacun des composants de la paroi végétale afin de dégrader la paroi dans son intégralité.

1.2.1. Les cellulases

Les cellulases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons β -(1-4) présentes dans la cellulose. Elles jouent un rôle majeur autant au niveau industriel que dans la Nature car elle participe au cycle global du carbone en dégradant la cellulose insoluble en sucres solubles. Les cellulases peuvent être produites par des plantes, des champignons, des bactéries et parfois même par des animaux [49].

Il existe trois classes de cellulases qui interviennent dans l'hydrolyse complète de la cellulose. Les endoglucanases agissent sur la cellulose dans des zones amorphes : elles hydrolysent les liaisons glycosidiques entre deux résidus de glucose interne à la cellulose [Lombard et al. 2014]. Ce sont des endoglucanases progressives, ce qui signifie qu'elles vont hydrolyser successivement les sucres le long du substrat. Leur site actif est un site ouvert, elles sont alors capables de se positionner à l'intérieur d'un long substrat [51].

Les exoglucanases, elles, vont hydrolyser les zones cristallines de la cellulose. Ces glucanases vont libérer des gluco-oligosaccharides dont du cellobiose au cours de l'hydrolyse [29].

Enfin les β -glucosidases vont hydrolyser les oligosaccharides produits par les glucanases en unités simples de glucose [50]. Leur site actif est en tunnel. Elles ont une activité processive au cours de laquelle elles coupent de façon séquentielle les résidus de cellobiose issus d'une fibrille de cellulose [52].

1.2.2. Les hémicellulases

Les hémicellulases sont un groupe d'enzymes impliquées dans l'hydrolyse des hémicelluloses. En raison de la complexité et de l'hétérogénéité de la structure des hémicelluloses (section 1.1.2), leur dégradation complète nécessite l'action de plusieurs types d'hémicellulases [53]. Les endoxylanases (ou xylanases) hydrolysent les liaisons glycosidiques entre les résidus xylose qui constituent la chaîne principale des xylane en libérant des petits oligosaccharides de 2 à 6 résidus. Le site catalytique de ces enzymes est souvent lié à un ou plusieurs sites non catalytiques. Les xylanases se retrouvent dans plusieurs familles de la base de données CAZy principalement dans les familles GH10 et GH11 [29].

Les xylosidases quant à elles hydrolysent les liaisons β -(1-4) au niveau de xylooligosaccharides et libère du xylose [46, 54, 55]. Ces enzymes se retrouvent aussi dans plusieurs familles de la base de données CAZy mais une majorité d'entre elles se retrouvent dans la famille GH43 [29].

Les β -mannanases pour leur part hydrolysent les hémicelluloses composées principalement de mannanes et libère des mannoooligomères courts. Ils peuvent être à leur tour hydrolysés par des β -mannosidases pour libérer du mannose [56, 57].

Dans les hémicellulases, il existe aussi des enzymes de débranchement qui clivent les groupes latéraux ou les substitués, comme des arabinofuranosidases ou des acétyl estérases [54,58].

1.2.3. Études sur les enzymes

La littérature regorge de nombreuses études sur ces enzymes. Ces études ont pour but d'approfondir la compréhension du fonctionnement de ces enzymes.

Certaines études utilisent des substrats modèles tel que le 4nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (pNP) ou encore la carboxyméthylcellulose (CMC). L'utilisation de ces substrats permet de se focaliser sur l'étude de l'activité enzymatique. Ces travaux caractérisent expérimentalement l'activité enzymatique afin de trouver les conditions de travail optimales (en terme de conditions réactives, température et pH par exemple), tout en recherchant les mutations permettant d'accroître l'activité enzymatique [59, 60, 61]. On peut par exemple citer les travaux de Liberato et collaborateurs en 2016 qui à l'aide de carboxyméthylcellulose ont

mené une étude sur l'activité enzymatique et sur la détermination des conditions optimales de travail d'une cellulase (BICel5B).

Ces études mettent de côté la complexité d'un substrat réel afin de se concentrer sur les enzymes et leurs activités. D'autres études quant à elles prennent en compte la complexité des substrats réels et se focalisent sur l'étude de la dégradation enzymatique de ces substrats. Ces travaux se concentrent sur l'impact de la dégradation sur la structure du substrat, la variation ou le réarrangement des polymères au sein des parois. Ces études sont souvent menées à l'aide des techniques de microscopies [62, 63, 64, 65, 66, 67]. Pour ce faire les échantillons doivent, le plus souvent, subir une lourde préparation en étant par exemple coupés en tranches quasi-2D (épaisseur très fine, de l'ordre de quelques microns). Les tranches sont alors surexposées aux enzymes et l'accessibilité au substrat est modifiée vis-à-vis du substrat brut [62, 63, 64, 65, 66, 67]. On peut par exemple citer les travaux de Badruna et collaborateurs qui à l'aide de techniques d'immunocytochimie sur des coupes sériées de de paille de blé ont pu caractériser la variation de présence de polymères (xylane entre autres) au cours de la dégradation enzymatique [67].

La question de la dégradation d'un substrat réel intact par des enzymes est encore en suspens. Au cours de ce travail de thèse nous avons voulu aborder la question suivante : comment les enzymes agissent sur un substrat complexe ?

Afin d'essayer de répondre à ces questions nous avons dû choisir le substrat d'étude, qui va maintenant être présenté.

1.3. La paille de blé

Après une description générale des composés des parois cellulaires de la biomasse lignocellulosique et un aperçu de leur déconstruction par des enzymes, nous allons nous atteler à décrire l'objet utilisé lors de ce travail de thèse : la paille de blé. Nous utiliserons de la paille de blé ayant été récoltée une fois mature, puis qui a été séchée.

1.3.1. Anatomie de la paille de blé

Le blé est composé de quatre parties principales : la tête, la tige, les feuilles et les racines (Figure 7.A). La partie de la feuille (Figure 7.B) contient la feuille et sa base. La tige (i.e. paille de blé) (Figure 7.C) est composée des nœuds et des entrenœuds.

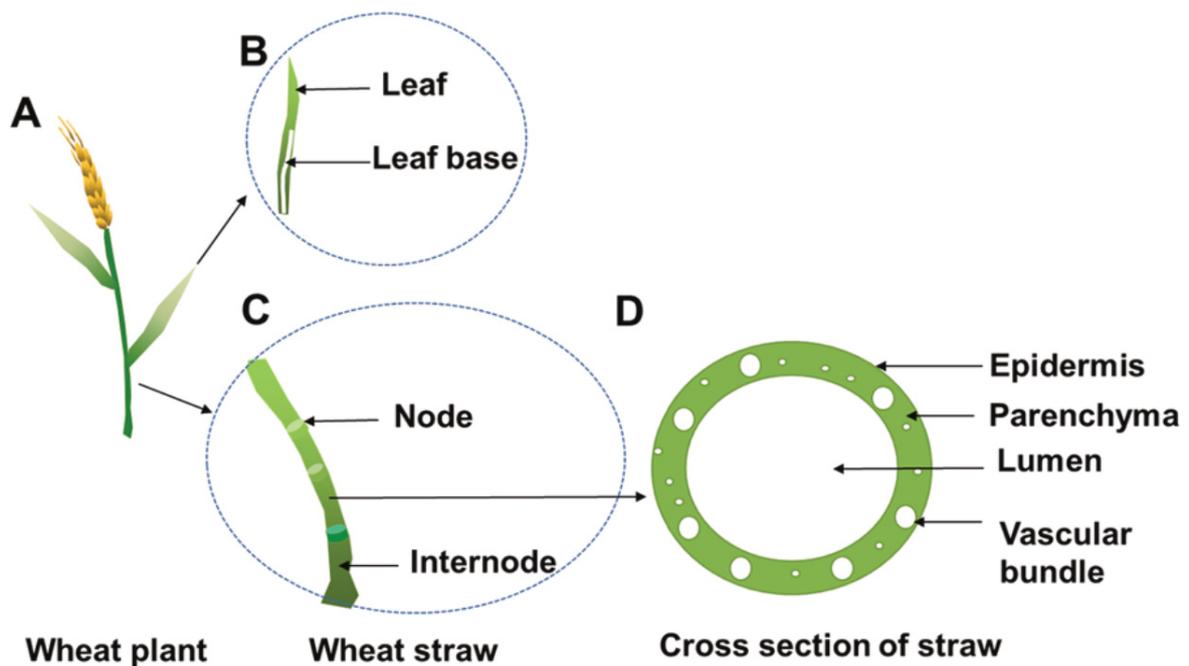


Figure 7 : Représentation de la paille de blé. Schéma de (A) du blé (tête, tige et feuilles), (B, C) la paille de blé (feuille, base de la feuille, nœud et entre-nœud), et (D) section transversale de la paille de blé (épiderme, parenchyme, lumière et faisceaux vasculaires) [68].

La composition varie en fonction de quel élément de la paille de blé est étudié [6, 69, 70]

Il est important de noter que ces compositions varient à la fois en fonction de la variété de blé mais aussi en fonction du type de sol, des traitements par engrais et des autres conditions de croissance. Une étude menée en 2014 par Collins et al. sur 6 variétés de blés différents a montré des différences de composition en lignine, en cellulose et en hémicellulose en fonction des variétés [6].

Dans ce travail de thèse nous nous sommes concentrés sur la paille de blé et plus précisément sur les entrenœuds. C'est donc cette partie que nous allons décrire plus en détails. Comme schématisé sur la partie D de la Figure 7 et visualisé sur la Figure 8 l'entrenœud est un cylindre creux qui se compose notamment du parenchyme ou tissu parenchymateux, de faisceaux

vasculaires et de l'épiderme [12,71,72]. Le parenchyme est composé de cellules séparées généralement par des fines parois primaires.

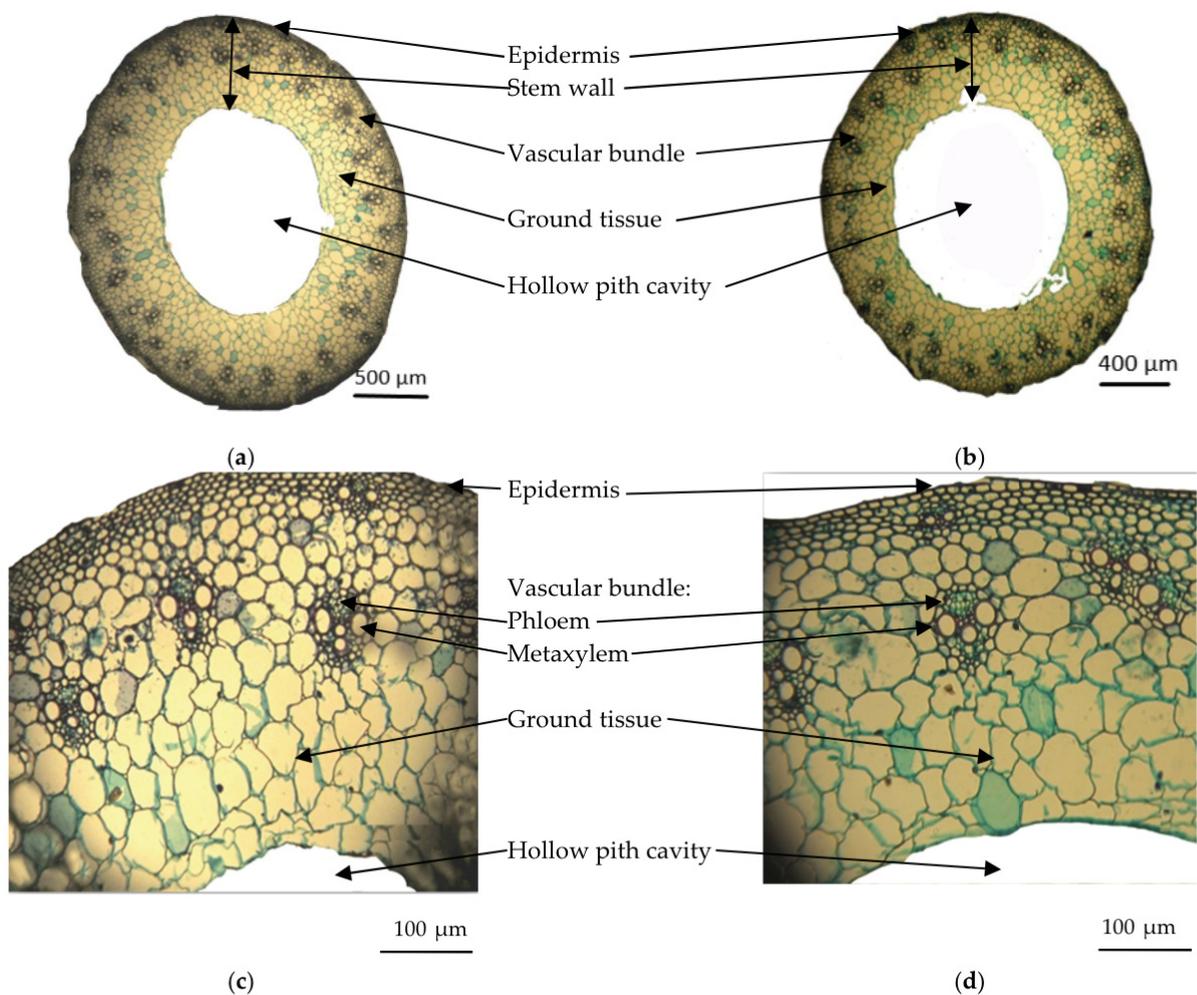


Figure 8 : Détails anatomiques d'entre-nœud de paille de blé. Coupes transversales visualisées par microscopie. Images tirées de [73].

Le rôle du parenchyme est de renforcer la structure de la tige du blé [74]. Les cellules du parenchyme restent vivantes au cours de la vie du plant et peuvent permettre de stocker de l'eau et d'autres molécules [75]. On observe un gradient de taille croissante de l'extérieur vers le centre de la paille de blé comme observable sur la Figure 8. Leurs tailles moyennes varient entre 58 et 142 μm [76, 77]. a paroi à la frontière entre la cavité centrale de la paille (ou cavité médullaire - hollow pith cavity sur la Figure 8 -) et la structure de la paille sera nommée selon la terminologie anglaise, Pith Cavity Lining (l'acronyme PCL sera utilisé à de nombreuses reprises dans cette partie.

Les faisceaux vasculaires sont constitués de phloème, de xylème et de sclérenchyme [77]. Les xylèmes permettent le transport de l'eau et des solutés (notamment les minéraux). Les phloèmes acheminent les produits de la photosynthèse comme les sucres. Ils sont tous deux entourés par le sclérenchyme. Le sclérenchyme contient des fibres et des scléréides, il assure le maintien des tissus vasculaires [79].

L'épiderme contrôle l'équilibre aqueux et les échanges gazeux [74]. C'est une couche très riche en cellulose qui protège le plant de l'extérieur [80, 81]. À la surface de l'épiderme, les stomates, petits orifices, sont présents afin de permettre la respiration des cellules végétales [82].

1.3.2. Les parois végétales

Les parois végétales peuvent être composées de plusieurs types de parois : la lamelle moyenne (LM), la paroi primaire (P) et la paroi secondaire (S) comme schématisé sur la Figure 9.

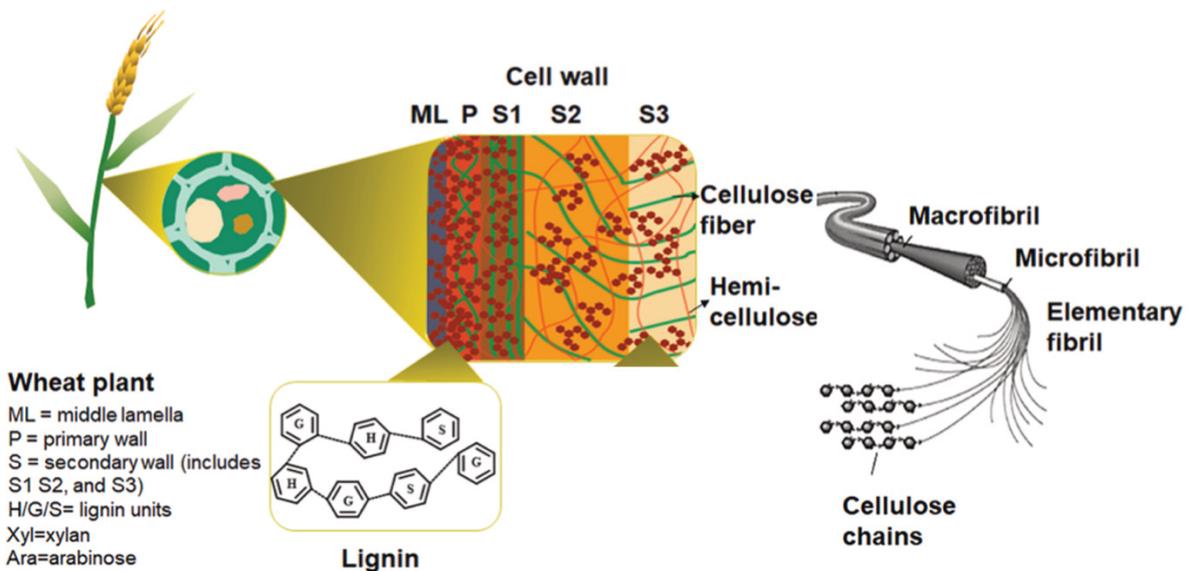


Figure 9 : Schéma de la matrice de la paille de blé. Les lignes vertes représentent les fibres de cellulose, les lignes orange les hémicelluloses et les lignes rouges en pointillés la lignine. Inspiré de [68].

Les parois primaires et secondaires sont composées d'une diversité de polysaccharides dont les natures et les proportions changent en fonction des espèces, du type de cellule et de la fonction des cellules entre autres [83, 84, 85].

La paroi primaire est généralement fine et est constituée de microfibrilles de cellulose comme mentionné dans la section 1.1.1, ces microfibrilles sont entourées d'une matrice de polysaccharides non-cellulosiques [86]. La paroi cellulaire primaire a une résistance mécanique suffisante pour permettre l'expansion cellulaire et assurer l'adhésion cellulaire tout au long de la croissance [87]. Généralement la paroi primaire a une épaisseur de 0,1 à 10 μm [88]. Certaines cellules possèdent uniquement une paroi cellulaire primaire, alors que d'autres sont aussi constituées d'une paroi secondaire qui apparaît après l'arrêt de la croissance cellulaire. La paroi cellulaire secondaire, parfois divisée en S1, S2, S3 comme illustré sur la Figure 9, a une importance toute particulière dans les cellules spécialisées assurant le soutien de la plante ou encore le transport d'eau, comme les xylèmes par exemple [89]. Les parois secondaires sont composées de cellulose (40%-80%), d'hémicellulose (10%-40%), de lignine (5%-25%), et de protéines de paroi cellulaire [90]. La paroi secondaire peut être schématisée par la Figure 4 présentée précédemment.

1.3.1. La paille de blé : un milieu poreux ?

Un milieu poreux est généralement défini comme une structure solide au sein de laquelle des cavités connectées entre elles permettent l'écoulement d'un fluide, lorsqu'une différence de pression est appliquée de part et d'autre du milieu poreux [91]. On rencontre des milieux poreux dans notre environnement immédiat et dans de nombreux procédés industriels. Par exemple un empilement de sable, les roches, les sols sont des exemples de milieux poreux naturels. Les milieux fibreux (utilisés par exemple pour les masques respiratoires), les textiles, ou encore les mousses sont des matériaux poreux manufacturés industriellement.

La Figure 10 montre un exemple de visualisations d'un milieu poreux classique (une mousse faite d'alliages métalliques) imagé par tomographie à rayons X : en noir on visualise les pores et en blanc la structure métallique. Il est tentant de faire une analogie visuelle entre l'échantillon de mousse ainsi visualisé et la paille de blé (Figure 8).

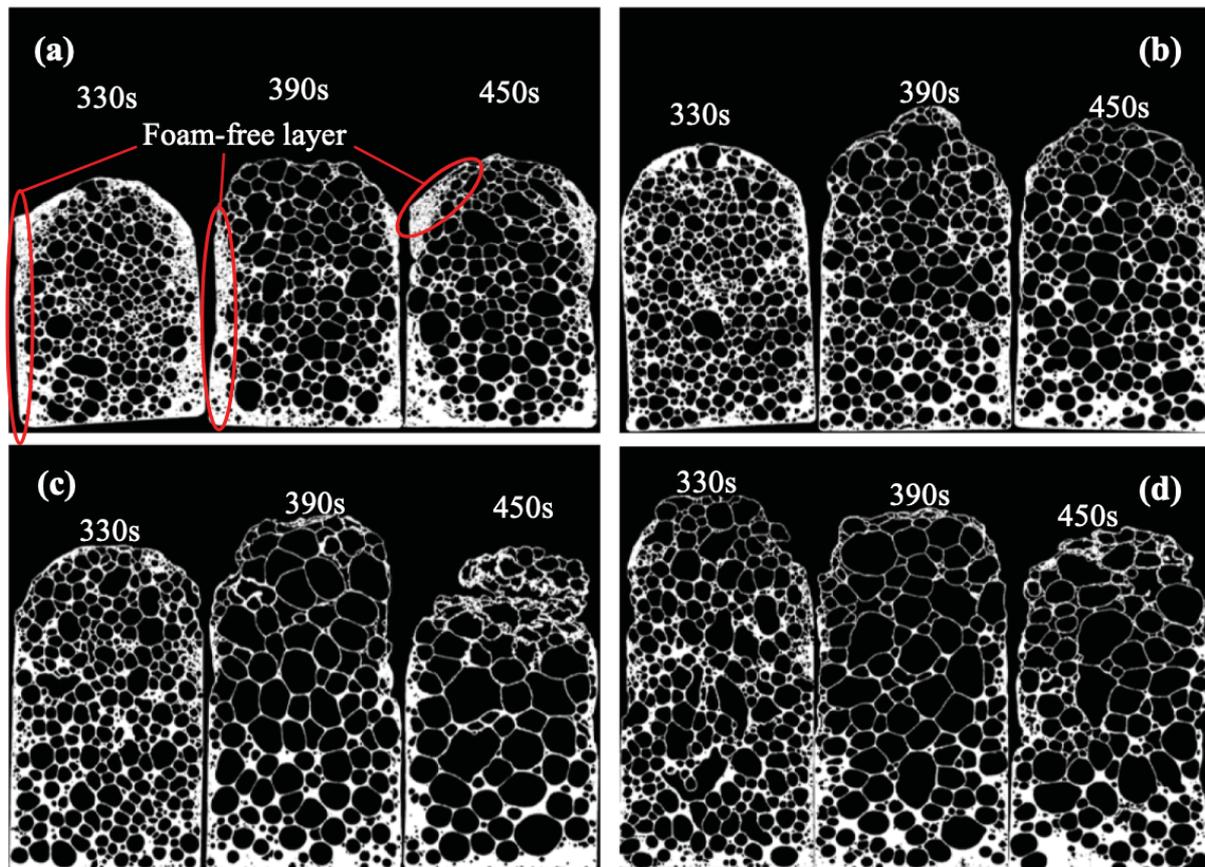


Figure 10 : Diagramme en coupe tomographique verticale d'échantillons de mousses de différents alliages a) AlSi9; b) AlSi9Cu2; c) AlSi9Cu4; d) AlSi9Cu6 au cours du temps de pousse [92].

Dans notre travail, nous allons traiter la paille de blé comme un matériau poreux. Il est plus complexe que la mousse visualisée sur la Figure 5. Nous allons travailler avec des échantillons secs. Les cellules végétales sont donc remplies d'air. Elles forment des espaces isolés les uns des autres -les pores de notre milieu poreux-, dont les parois sont elles-mêmes poreuses. En effet, la porosité des parois cellulaires végétales est étudiée et caractérisée depuis longtemps, pour comprendre les mécanismes pilotant les échanges entre les cellules (perméation directe à travers le réseau de polymère constitutif des parois végétales, transport via des micro/nano trous reliant des cellules voisines, etc.) [93].

La paille de blé peut donc être vue comme un matériau poreux cellulaire, la paroi des cellules étant elle-même poreuse. En milieu poreux, on ajoute qu'il s'agit d'un matériau multi-échelle, car présentant plusieurs échelles caractéristiques. Il y a l'échelle de la cellule / d'un ensemble de cellule. A cette échelle, on peut définir une porosité comme le rapport entre le volume interne des cellules et le volume total du matériau. Il y a également l'échelle de la paroi végétale, et on peut introduire une porosité de la paroi végétale. Cet aspect multi-échelle,

est illustré sur la Figure 11, issue de l'article [94]. Nous verrons que nous nous intéresserons dans notre travail à une échelle intermédiaire entre la macro-échelle et la micro-échelle (telles que définies sur la Figure 11), de par la technique de visualisation que nous utiliserons (la tomographie à rayons X) tout obtenant par ailleurs, de manière indirecte, des informations sur le transport de traceurs moléculaires à la micro-échelle et à l'échelle moléculaire (dans la seconde partie du manuscrit).

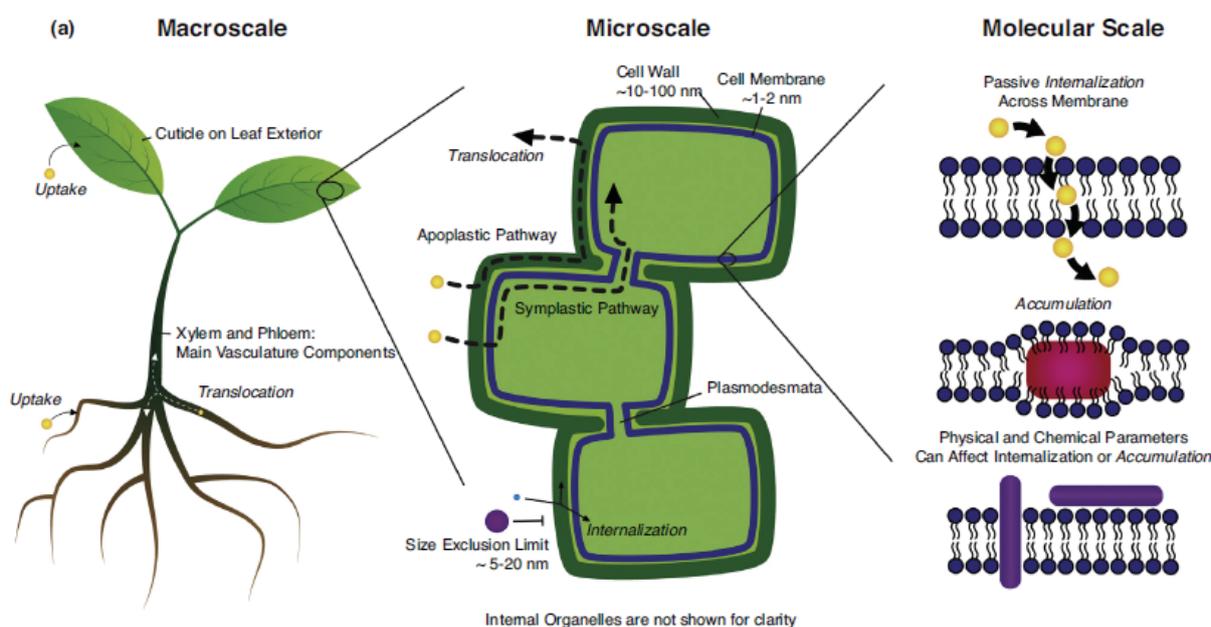


Figure 11 : Approche multi-échelle pour le transport de nanoparticules dans les plantes, schéma extrait de la Figure 1 de [94] Les différents modes de transport de nanoparticules au travers des parois cellulaires sont explicités sur ce schéma : au travers de pores présents dans les parois (plasmodesmata), ou par transport à travers les membranes (internalization)

Il existe plusieurs domaines bibliographiques illustrant la prise en compte d'un matériau végétal comme un matériau poreux, avec le déploiement de méthodologies d'analyse et de modélisation provenant de la physique des milieux poreux. Un domaine important concerne le bois, en lien avec la problématique du séchage de ce matériau. La littérature sur ce domaine comporte de nombreux articles mettant en œuvre les outils d'analyse typique des milieux poreux, sur le plan expérimental ou en modélisation : utilisation de modèles dits en réseau de pores, changement d'échelle, recours à des propriétés effectives, etc. [95, 96, 97]

Le même genre de problématique est rencontrée dans l'étude du séchage d'autres matériaux d'origine biologique, dans l'agroalimentaire notamment [98].

Comme expliqué dans l'Introduction générale, c'est cette prise en compte de la paille de blé comme un milieu poreux qui a initié la collaboration ayant donné lieu à ce travail, où la paille de blé est étudiée à l'aide de techniques et de méthodologies utilisées pour l'étude des milieux poreux.

1.4. Imager des plantes

Dès les prémices de la microscopie, au milieu du XVII^{ème} siècle, les plantes ont été un objet d'intérêt à imager [99]. L'une des premières images de végétaux, du liège, est délivrée par Robert Hooke dans son ouvrage *Micrographia* en 1665 [100] et la Figure 12 reproduit une de ses observations.

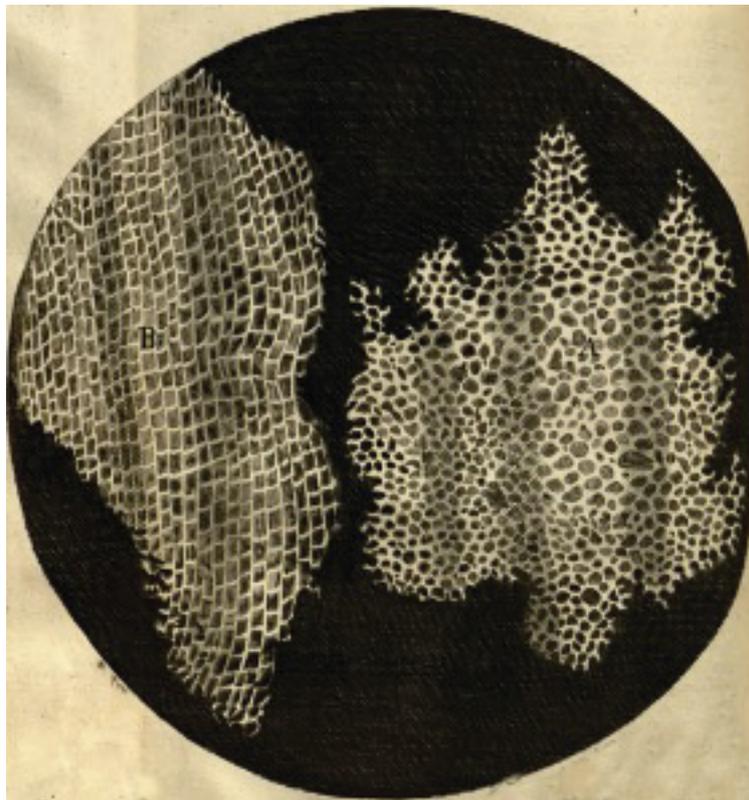


Figure 12 : Image microscopique d'un morceau de liège, obtenue par Robert Hooke en 1665 [100].

On peut aussi noter les travaux fondateurs de Nehemiah Grew en 1682 [101] qui a décrit anatomiquement et morphologiquement un grand nombre de plantes, avec notamment des illustrations de l'ensemble des organes, des agrandissements et des coupes transversales, voir une reproduction sur la Figure 13.a. Ces travaux ont permis entre autres de mettre en exergue

la structure interne complexe des plantes. Plus tard d'autres travaux pionniers, tels que ceux de Charles-François Brisseau de Mirbel au début du XIX^{ème} siècle (Figure 13.b), ont permis de comprendre que les plantes vertes étaient constituées d'une seule membrane continue, qui enveloppe et relie les différents organes et cellules. D'après lui, les cellules individuelles sont constituées de parenchyme et se développent à partir, entre ou à l'intérieur de cellules plus anciennes [102, 103, 104].

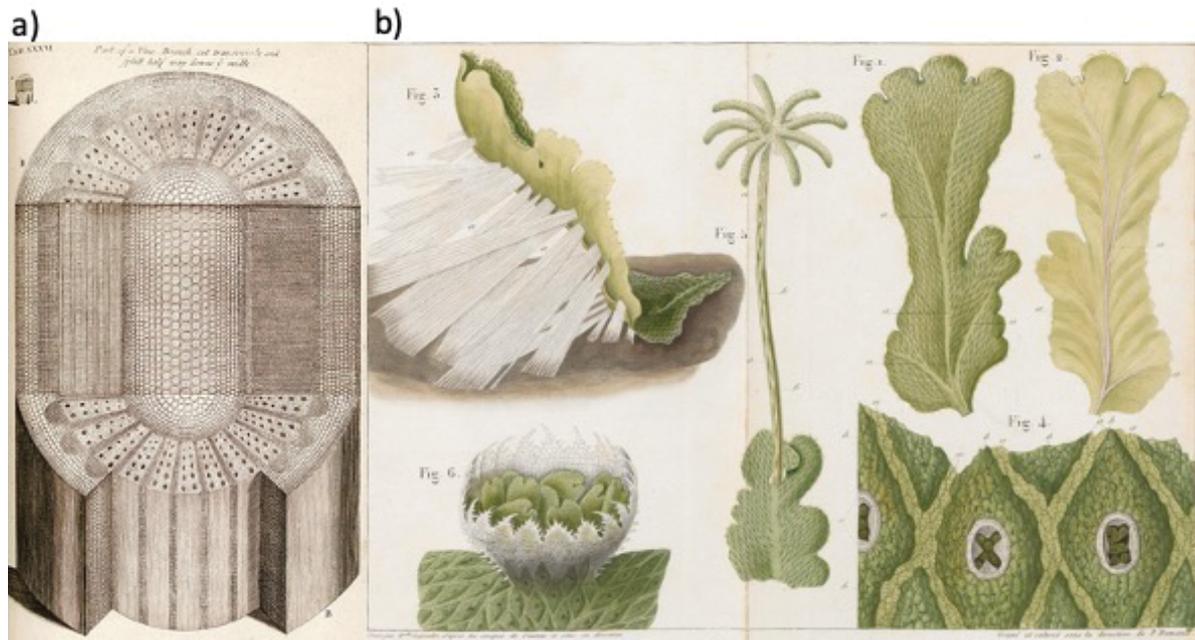


Figure 13 : a) Illustration d'une branche de vigne, coupé transversalement et ensuite fendu au milieu issue de l'ouvrage de Grew, 1682 [101] b) Illustration de Marcanthia Polymorpha (hépathique des fontaines) issue de l'ouvrage de Brisseau de Mirbel en 1835 [104].

Depuis toujours observer et imager les plantes a permis de mieux les étudier. Dans la suite de cette section, nous allons nous atteler à décrire différentes techniques d'imagerie utilisées pour l'étude des plantes. Cette description ne se veut pas exhaustive mais inclura les principales techniques utilisées.

1.4.1. Un challenge à multi-échelle

L'aspect multi-échelle des plantes est un challenge pour les imager. Chaque technique d'imagerie permet de travailler à une échelle spatiale qui lui est propre (même si certaines techniques ont des gammes de résolution plus large que d'autres). Chaque échelle spatiale donne accès à des informations différentes sur la plante. Dans la littérature, on peut trouver

la définition de quatre échelle différentes pour les plantes, de la plus grande à la plus petite :
i) l'échelle de la plante/de l'organe (feuille, tige,...) ; ii) l'échelle du tissu ; iii) l'échelle de la cellule et liv) l'échelle de la paroi cellulaire [105].

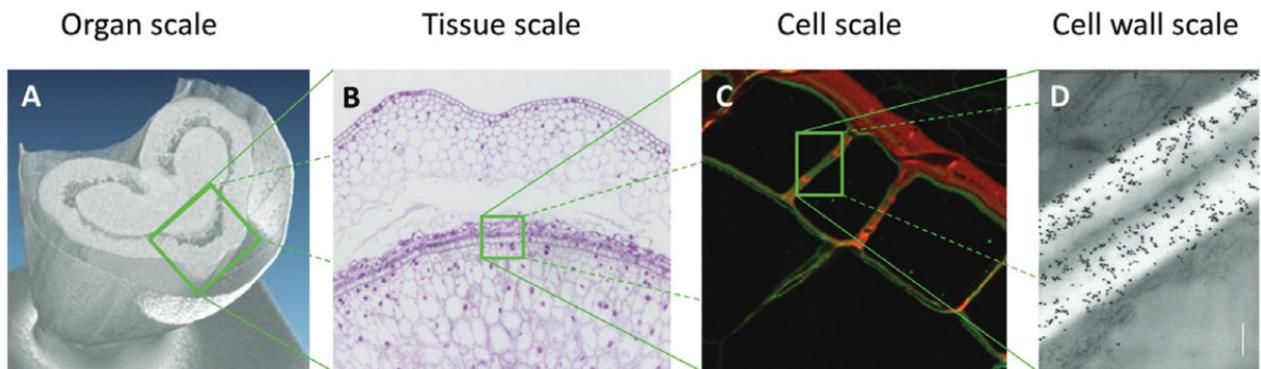


Figure 14 : Imagerie multi-échelle d'un grain de blé issue des travaux de Legland et al. 2018 [105]. A. Image de tomographie B.C. Images de microscopie optique à différents grossissements D. Image en microscopie électronique.

Connaitre l'échelle qui nous intéresse, en fonction de l'étude que l'on souhaite mener, est donc un point crucial. Des études nécessitant des informations à différentes échelles sont généralement menées en combinant différentes techniques.

1.4.2. Imagerie par microscopie

La microscopie est historiquement une méthode de choix pour étudier les plantes de l'échelle de la cellule à celle du tissu. La microscopie optique (ou photonique) est la technique la plus ancienne. C'est un système optique constitué de lentilles qui utilise la lumière visible pour permettre le grossissement de l'objet observé. L'arrivée de la microscopie par fluorescence, de la microscopie confocale et des techniques de super-résolution a permis de mener des études jusqu'à l'échelle des parois cellulaires [105]. Le développement des techniques de microscopie s'est accompagné du développement de sondes permettant de mettre en évidence des composés spécifiques des végétaux, de leurs parois et même de leurs cellules. Ces sondes sont principalement des protéines fluorescentes [99] comme par exemple la *green fluorescence protein* (GFP). Mais récemment des biocapteurs et des rapporteurs génétiquement codés ont été conçus et utilisés [106, 107]. Ces sondes ont permis une nette amélioration dans l'imagerie des plantes en permettant la mise en lumière d'éléments

spécifiques. Pour expliquer brièvement le principe, la microscopie par fluorescence utilise une (ou plusieurs) longueur d'onde, propre à la sonde utilisée, afin qu'elle soit absorbée par le fluorophore présent dans la sonde. Le fluorophore ainsi excité émet alors à une autre longueur d'onde qui sera spécifiquement détectée pour réaliser l'observation [108].

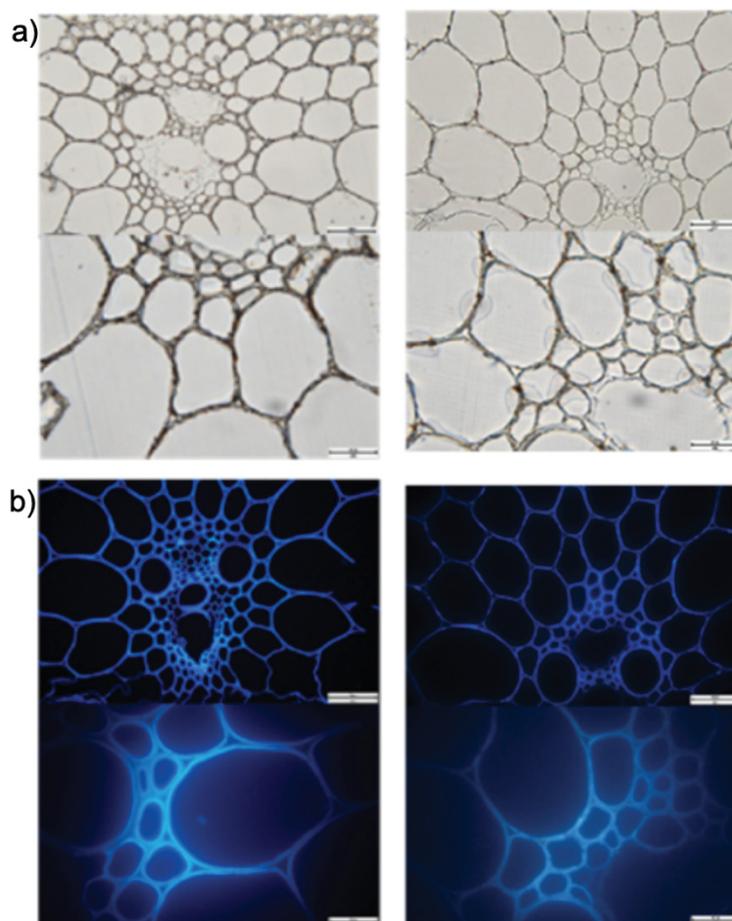


Figure 15 : Images de pailles de blé ayant subies une autohydrolyse pendant 60 min à 160°C (gauche) et 170°C (droite) par microscopie optique en lumière visible (a) et en fluorescence (b), en utilisant l'autofluorescence de la lignine. En a) et b), le grossissement est de 40x pour les vignettes du haut et de 100x pour les vignettes du bas. Ces images sont issues de [109].

La Figure 15 issue du travail de Tang et al. [109] propose des images d'objets similaires (paille de blé) prises par microscopie optique (a) et par fluorescence (b) en utilisant l'autofluorescence de la lignine [110]. La microscopie par fluorescence permet de quantifier la diminution de la brillance et donc de la quantité de lignine présente dans l'échantillon alors que la microscopie optique ne permet de voir que le changement structurel (diminution de l'épaisseur des parois cellulaires).

Les méthodes d'imagerie par microscopie proposent généralement une visualisation 2D de l'échantillon. Pour la microscopie, la préparation des échantillons est assez conséquente et destructive. Il est souvent nécessaire de les découper en tranche fine pour pouvoir les imager [109, 111, 112, 113, 114, 115].

L'apparition de la microscopie confocale a permis de satisfaire la volonté d'acquérir des informations dans la troisième direction de l'espace. Cette technique repose sur l'ajout d'un ou plusieurs trous d'épingle au niveau de l'optique collectrice, qui bloquent la lumière hors focus et augmentent ainsi le contraste et la résolution de l'image en collectant principalement la lumière provenant du plan focal. La mise au point peut être faite successivement à différentes profondeurs, permettant ainsi l'acquisition de données sur une certaine profondeur [116] et l'obtention d'une image 3D.

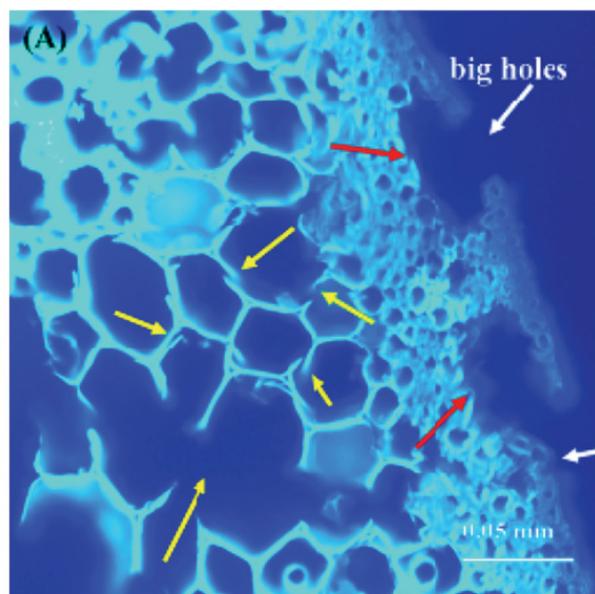


Figure 16 : Image par microscopie confocale d'une tranche (20 μ m d'épaisseur) de paille de blé après 30 jours de dégradation fongique, l'échantillon a été marqué en utilisant du calcofluor pour mettre à l'évidence la cellulose. Cette figure est issue de l'étude de Liu et al. en 2014 [117].

Cette technique donne de bons résultats pour des échantillons plutôt transparents et peu épais. Dans le cas contraire, l'information provenant des plans focaux situés en profondeur n'arrive pas jusqu'à l'optique collectrice. Malgré la possibilité d'obtenir des informations dans les trois directions de l'espace, la microscopie confocale n'est donc pas très bien adaptée aux échantillons d'épaisseur supérieure à 50-100 μ m [118]. De plus la préparation des

échantillons pour la microscopie confocale est tout aussi contraignante et destructive que pour la microscopie optique classique ou en fluorescence.

Si les structures ou les phénomènes que l'on souhaite observer ont une étendue spatiale supérieure à l'épaisseur maximale atteignable par microscopie confocale, alors cette technique présentera un intérêt limité. Par ailleurs, la préservation de l'intégrité de l'échantillon peut être cruciale dans certaines études.

1.4.3. Imagerie 3D et non destructive par tomographie à rayons X

La tomographie à rayon X (parfois appelée microtomographie ou nanotomographie selon la résolution spatiale obtenue) est une méthode d'imagerie non destructive qui permet d'obtenir des images 3D d'un échantillon.

Cette méthode acquière aussi bien des informations sur la surface que sur l'intérieur de l'échantillon si celui-ci est (plus ou moins) radio-transparent. Cette technique requiert un minimum de préparation des échantillons et permet d'étudier la structure interne intacte d'échantillons opaques au rayonnement visible ou lorsque des méthodes d'imagerie optique (par exemple la microscopie confocale) ne sont pas possibles ou sont trop limitées. Elle est dite non destructive car il n'est généralement pas nécessaire de détruire (par exemple par découpe) les échantillons. Cette technique repose sur la prise de radiographies X 2D et dans son principe elle est similaire à celle utilisée en médecine sous le nom commun de scanner. Comme il s'agit de la technique utilisée dans ce travail, nous détaillerons son principe et ses principales caractéristiques dans le Chapitre suivant.

Il s'agit de noter dans ce chapitre bibliographique qu'elle est de plus en plus couramment utilisée pour l'étude de spécimens biologiques. Par exemple, la littérature fait état de l'utilisation de la tomographie X pour explorer les microstructures des plantes et du bois [119-123] mesurer les propriétés de gonflement du bois [124], analyser la teneur en eau des cellules végétales individuelles [125, 126], ou même localiser des particules minérales dans la bagasse de canne à sucre [127]. La Figure 17 présente un exemple de visualisations issues des travaux de Dhondt et al. [121]

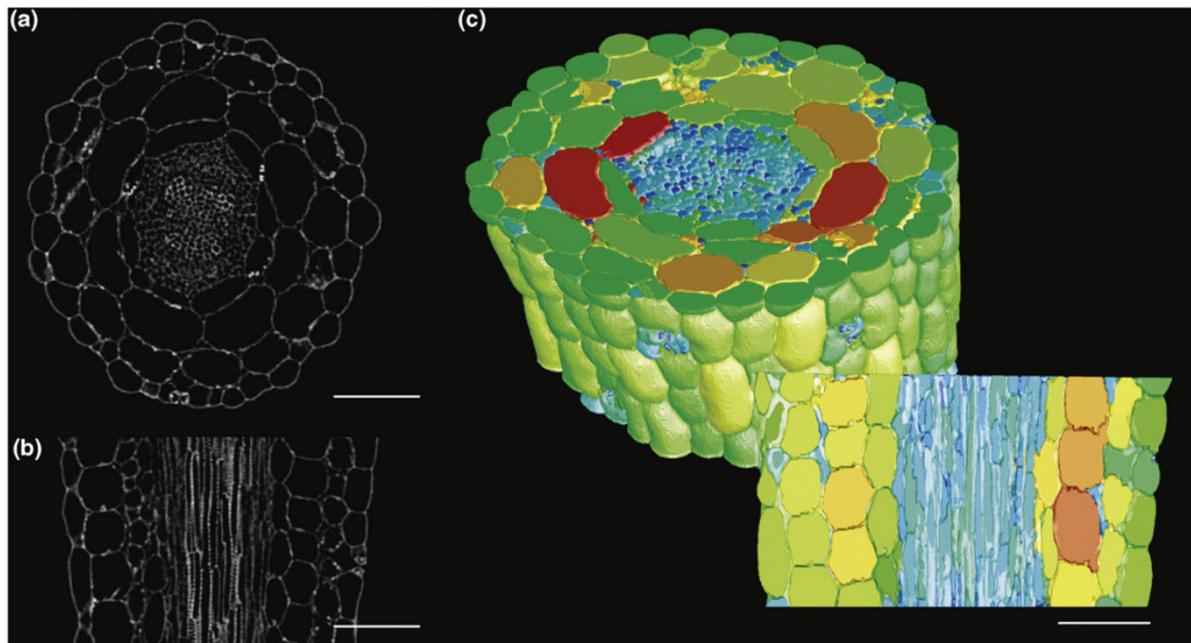


Figure 17 : Scan *ex vivo* d'un *Arabidopsis* hypocotyle par tomographie à rayons X (CT) à la résolution cellulaire. (a) Coupe HRXCT montrant une section transversale de l'hypocotyle. (b) Coupe CT montrant une section longitudinale de l'hypocotyle. (c) Reconstruction 3D d'une section de l'hypocotyle avec une fausse coloration des cellules en fonction de leur taille. Taille du voxel = 0,8 mm. Barre d'échelle = 50 m. Figure issue [121].

1.5. Retour sur les objectifs de ce travail

Comme mentionné dans l'Introduction, il existe un grand nombre de travaux portant sur la dégradation enzymatique de la biomasse. Les points bibliographiques abordés dans ce Chapitre permettent de préciser les objectifs de ce travail, déjà évoqués rapidement dans l'Introduction Générale.

Tout d'abord, travailler sur la dégradation enzymatique sur des substrats modèles, comme couramment effectué, a un premier inconvénient : on a vu le rôle des interactions de reconnaissance spécifiques qui existent entre l'enzyme et son substrat réel et qui déclenchent la catalyse (1.2). Lors de l'utilisation de substrats artificiels et/ou isolés, les conditions de cette reconnaissance ne sont pas remplies, ce qui peut conduire à une mauvaise estimation/compréhension de l'activité enzymatique vis-à-vis d'un substrat réel [128]. Le deuxième inconvénient concerne l'accessibilité de l'enzyme à son substrat, qui est considérablement facilitée par l'utilisation de polysaccharides purifiés, par opposition aux

polysaccharides qui sont intégrés dans des parois végétales dont on a vu la complexité (Figure 4).

Ensuite se pose un problème de métrologie. Pour contourner la difficulté mentionnée ci-dessus, certaines études suivent l'action des enzymes sur un substrat réel et naturel. Elles sont principalement basées sur des techniques de microscopie qui permettent de visualiser les enzymes et/ou le matériau dégradé dans des conditions très proches des conditions réelles [112-115]. Cependant, ces travaux présentent encore certaines limites. Le substrat, par exemple le maïs ou le tabac, est souvent préparé sous forme de tranches quasi-2D, ce qui le rend fortement surexposé à l'attaque enzymatique par rapport à la réalité. Ces approches limitées à des situations 2D ne permettent pas d'aborder les questions importantes liées à la diffusion et à la propagation des enzymes dans le matériau qu'elles dégradent. De plus, alors que certaines techniques de microscopie telles que la microscopie confocale peuvent conduire à des images 3D d'échantillons avec une préparation minimale, et donc des conditions de dégradation enzymatique réaliste, l'étendue réelle de la plage d'observation le long de l'axe optique est toujours limitée, et typiquement plus petite que la taille caractéristique de la structure dans cette direction (par exemple la taille de la cellule). Il n'est donc pas simple de conclure sur la question cruciale de l'hétérogénéité de la dégradation dans des conditions réelles et à toutes les échelles de longueur pertinentes dans les trois directions de l'espace.

Un des questionnements initiaux de ce travail est de savoir si l'utilisation de la tomographie à rayons X peut lever ces contraintes et c'est ce travail qui fait l'objet de la suite de cette première partie du manuscrit.

Chapitre 2. Acquisition des données par tomographie à rayons X, préparation des échantillons et autres techniques d'imagerie.

Dans ce Chapitre, nous présentons les Matériels et Méthodes mis en œuvre dans cette première partie de notre travail. Nous présenterons en détail la technique de tomographie à rayons X qui est au cœur de celui-ci, avant de détailler la préparation de nos échantillons de paille de blé, en particulier la manière dont nous effectuons la digestion enzymatique. Enfin, on donnera des informations sur les autres modalités d'imagerie utilisées.

2.1. Acquisition d'images par tomographie à rayons X

2.1.1. Présentation de la technique

2.1.1.i Principes physiques

Nous commençons cette sous-section en revenant sur les principes physiques de cette métrologie optique. La tomographie à rayons X repose sur l'interaction des rayons X avec la matière. Lorsque des rayons X rencontrent de la matière, trois grands types d'interactions sont possibles : la transmission, la diffusion et l'absorption des rayons X. Les rayons X peuvent être transmis sans changer de direction (rayons sortant en jaune sur la Figure 18). Ces derniers peuvent passer au travers en subissant ou non une atténuation (perte d'énergie). Ce sont ces rayons transmis qui sont utilisés pour l'imagerie par radiographie X (et donc pour la tomographie à rayons X).

Les rayons X peuvent aussi être diffusés (transmis avec un changement de direction), partie bleue sur la Figure 18. Cette diffusion peut se faire sans perte d'énergie et on parle alors de diffusion élastique. Ce phénomène permet d'étudier la structure atomique de l'échantillon. La diffusion peut aussi s'opérer avec une perte d'énergie, on parle alors de diffusion inélastique. C'est ce phénomène qui est à l'origine de l'effet Compton qui prend place lorsque le photon X incident transfère une partie de son énergie et de son impulsion à un électron faiblement lié. La diffusion de Compton est utilisée pour l'étude des fonctions d'ondes électroniques.

Les rayons X peuvent enfin être absorbés (partie verte sur la Figure 18). C'est l'effet photo-électrique. Le photon X interagit avec un électron lié à la couche interne d'un atome et toute l'énergie de ce photon est transférée à l'électron qui est éjecté de l'atome. Un autre électron, provenant d'une couche électronique supérieure se désexcite pour prendre la place de l'électron éjecté, ce qui produit soit un photon X (d'où la fluorescence X), soit l'émission d'un autre électron de l'atome après absorption du photon X (effet d'Auger). L'analyse de ces deux effets (fluorescence X et effet d'Auger) permet d'étudier la composition chimique de l'échantillon.

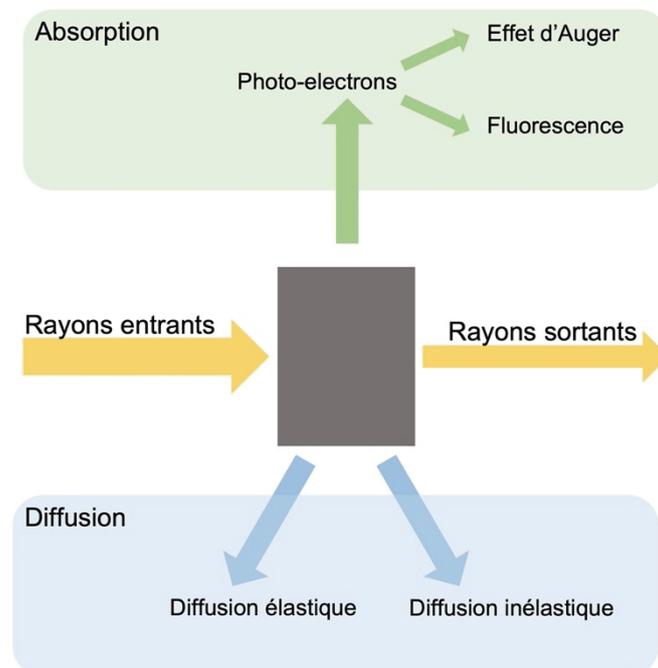


Figure 18: Représentation des différentes interactions possibles des rayons X avec la matière : la transmission en jaune, l'absorption en vert et la diffusion en bleu. Inspirée de L.Paolasini, *Interaction X-Ray Matter*, 2016 [129].

Dans le cas de la tomographie à rayons X, ce sont les rayons transmis qui permettent d'obtenir les radiographies et dans notre cas, on parle de tomographie X d'absorption car ce sont les effets d'absorptions qui sont responsables de l'atténuation du faisceau incident, dans la gamme typique des énergies de faisceau X utilisée (l'intensité transmise est inférieure à l'intensité incidente).

Afin d'obtenir des images 3D, l'acquisition se fait en plusieurs étapes comme le résume la Figure 19. Une fois l'échantillon placé entre la source à rayon X et le détecteur, une série d'acquisitions de radiographies de l'échantillon est lancée avec, entre elles, une légère différence de position angulaire : dans une majorité des cas il faut entre 1000 et 2000 radiographies pour effectuer un tour complet de l'échantillon. Une fois la série terminée, la reconstruction tomographique prend place afin de passer de l'ensemble des radiographies 2D à une unique image 3D pouvant être visualisée dans sa globalité (on parle alors de rendu volumique) ou selon des coupes dans les trois plans de l'espace (on parle alors de coupes tomographiques).

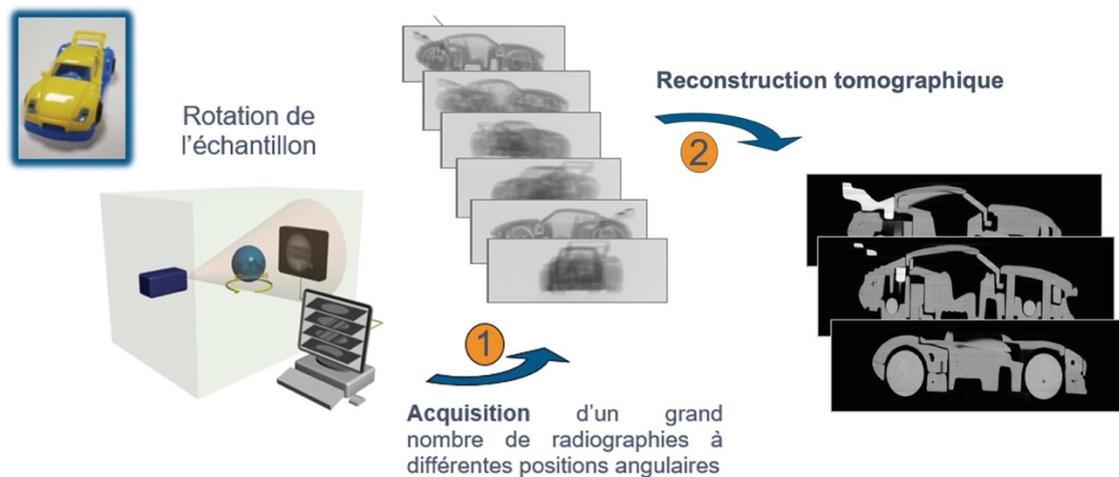


Figure 19: Schéma de principe d'un cycle d'un scan tomographique. Les deux phases sont représentées : la phase d'acquisition des radiographies puis la phase de reconstruction tomographique à l'aide d'un algorithme dédié. [132]

2.1.1.ii Origine du contraste sur les images obtenues

Le contraste observé sur les radiographies X dépend de trois facteurs : i) la différence d'absorption aux rayons X des matériaux traversés (qui se traduit physiquement par une différence dans le coefficient d'atténuation de ceux-ci) ; ii) la différence de masse volumique (densité) des matériaux traversés (qui intervient dans l'expression du coefficient d'atténuation) ; iii) la différence d'épaisseur des matériaux [131,132].

L'utilisation de la loi de Beer-Lambert permet d'exprimer l'intensité reçue par le capteur en fonction de l'intensité incidente, du coefficient d'atténuation et des épaisseurs traversées :

$$I = I_0 \exp\left(\int_{\ell} \mu(x) dx\right) \quad (1)$$

où I et I_0 sont respectivement les intensités des rayons X transmis et incidents, $\mu(x)$ [cm^{-1}] est le coefficient d'atténuation du matériau (et qui varie donc selon la composition de l'échantillon le long du trajet des rayons X) et ℓ l'épaisseur totale de l'échantillon [cm].

Une fois la reconstruction 3D effectuée, les contrastes sur l'image 3D et les coupes tomographiques sont dus aux différences de coefficients d'atténuation et donc de masse volumique, le coefficient d'atténuation étant une fonction du nombre atomique et de la masse volumique.

2.1.1.iii Tomographie en laboratoire vs tomographie synchrotron

Les scans tomographiques peuvent aussi bien être réalisés par un synchrotron que par un tomographe de laboratoire. C'est la source de rayonnement X qui diffère dans ces deux types d'appareil.

Dans un tomographe de laboratoire, le rayonnement X est obtenu en bombardant un matériau (la cible, typiquement du tungstène ou du molybdène) par un faisceau d'électron (rayonnement continu de freinage). Le faisceau obtenu est conique et polychromatique, c'est-à-dire qu'il couvre un large spectre d'énergies. L'énergie maximale est déterminée par la tension avec laquelle les électrons sont accélérés avant de percuter la cible. Les scans en laboratoire durent entre quelques minutes et quelques heures en fonction de la résolution spatiale nécessaire.

En synchrotron, le rayonnement X provient d'un rayonnement de courbure lorsque les électrons se déplaçant dans un anneau de stockage (le synchrotron) sont déviés par un champ

électromagnétique. Le flux de photons X est bien plus important que celui des tomographes de laboratoire, les temps de scan sont alors grandement diminués pouvant aller de quelques secondes à quelques minutes. Le faisceau X est parallèle, monochromatique, et on peut dans certains cas sélectionner son énergie. La nature parallèle du faisceau permet de simplifier la reconstruction par rapport à son homologue conique [133]. Ce faisceau monochromatique et parallèle permet de limiter certains artefacts et d'augmenter les différences d'absorption, et donc d'augmenter les contrastes.

Évidemment, il faut noter que les tomographes de laboratoire sont plus facilement accessibles et (beaucoup) moins onéreux, malgré leur long temps d'acquisition. C'est ce type d'appareil que nous avons utilisé, en gardant en tête que l'utilisation d'un synchrotron reste possible en principe. Plusieurs lignes sont dédiées à la tomographie à rayons X sur ces grands instruments, par exemple à SOLEIL ou à l'ESRF pour prendre les deux installations les plus connues en France.

2.1.1.iv Résolution spatiale de la technique

Sur un tomographe de laboratoire, une des limitations de la tomographie à rayons X, en plus du temps d'acquisition qui rend difficile l'étude de phénomènes dynamiques (sur des échelles de temps courtes, inférieure à la dizaine de minutes), est la résolution spatiale. À noter, qu'en première approximation pour notre étude, nous considérons que la résolution spatiale est équivalente à la taille du voxel – ce qui est une approximation optimiste. A l'heure actuelle, en utilisant des sources nano-foyers montées dans des tomographes de laboratoire, on peut descendre à une taille de voxel de 0,4 μm . Il faut noter que Zeiss commercialise des appareils (très coûteux) pouvant s'apparenter à des tomographes à rayons X et permettant de descendre à une taille de voxels de plusieurs dizaines de nanomètres [133]. Ceci est permis par une architecture interne plus complexe que celle des tomographes de laboratoires classiques, faisant intervenir plusieurs dispositifs optiques.

De plus, il est important de relever qu'augmenter la résolution spatiale entraîne automatiquement la diminution du champ imagé (Field of View -FoV-) comme l'illustre la Figure 20. Le grandissement est en effet purement géométrique. Plus le rapport entre la distance source-échantillon et la distance source-captteur est grand, plus le grandissement sera important. Mais toute partie de l'échantillon sortant du FoV ne sera pas reconstruite

correctement. Ainsi, l'utilisateur de la tomographie à rayons X est tenu de faire des compromis entre la résolution spatiale souhaitée et la taille de la zone imagée.

Pour obtenir une image très résolue d'un échantillon plus grand que le FoV, il est possible de concaténer plusieurs scans, si l'appareil utilisé dispose de cette fonctionnalité. Dans ce cas, on observe alors une augmentation de la charge de calcul de la reconstruction et des besoins de stockage.

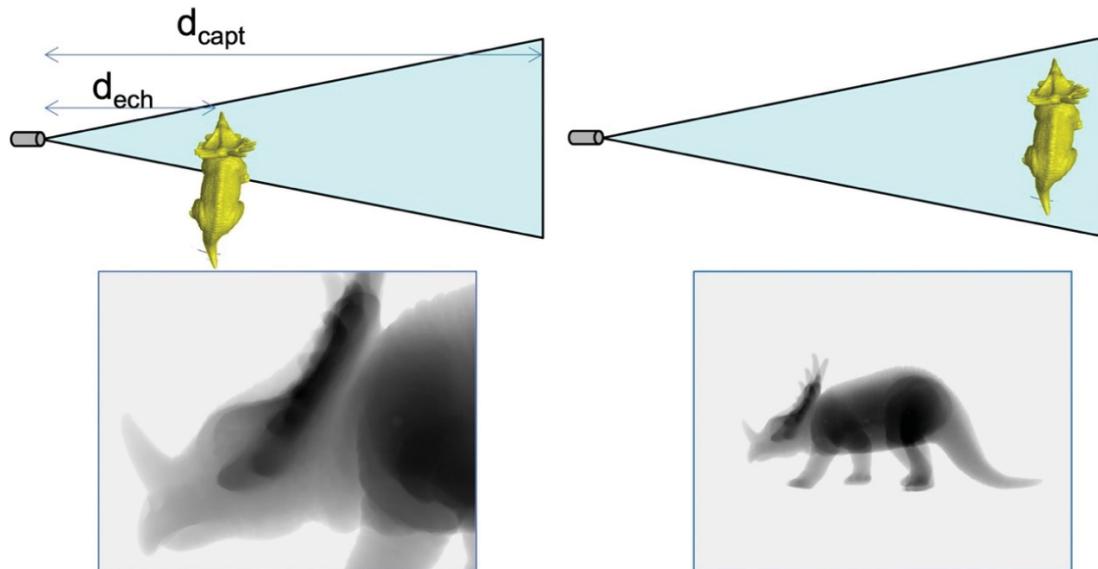


Figure 20: Schéma explicitant le grandissement (zoom) en tomographie de laboratoire. L'augmentation du rapport d_{capt}/d_{ech} augmente le zoom, la résolution spatiale et diminue le champ de vision

La résolution spatiale et ses implications (petit FoV, grand temps de scan) sont parmi les principales limitations de cette technique. On peut cependant comparer la résolution spatiale obtenue avec une source nano-foyer à celle atteignable en microscopie optique conventionnelle, de l'ordre de 200 nm, sachant qu'il existe désormais des techniques optiques dite de super-résolution permettant d'abaisser quelque peu cette limite [104].

2.1.2. Protocole d'acquisition par tomographie X

Pour notre étude, un tomographe de laboratoire Phoenix Nanotom® a été utilisé. La préparation des échantillons sera détaillée ultérieurement. Afin d'obtenir la meilleure résolution spatiale possible, l'échantillon (ici de la paille de blé) a été rapproché au maximum

de la source, tout en conservant un FoV englobant la totalité du diamètre de celui-ci. Cela a permis d'obtenir une taille de voxel de $1,25 \mu\text{m}^3$, pour une distance entre l'échantillon et la source de 4 mm.

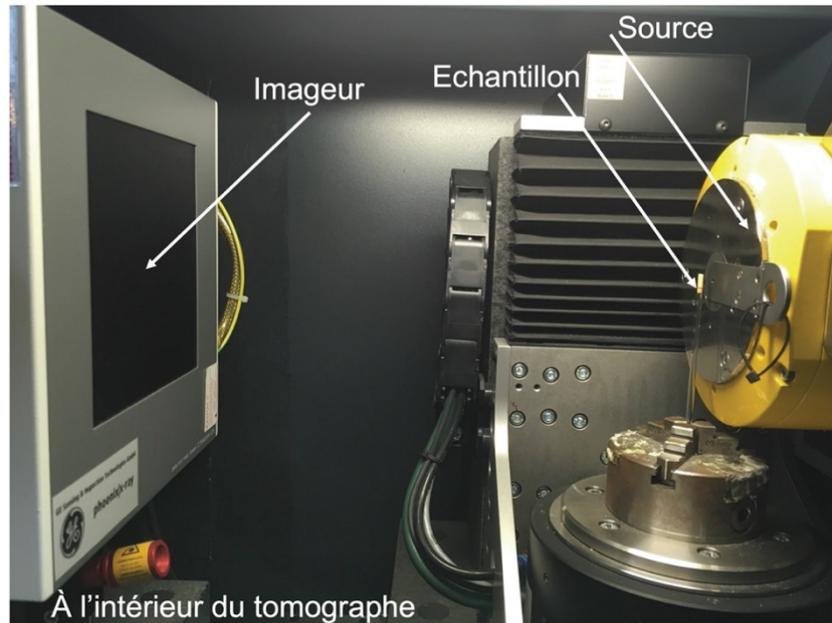


Figure 21: Photo de l'intérieur du tomographe, une fois un échantillon de paille de blé mis en place pour obtenir la résolution spatiale optimale.

Cette mise en place demande une attention particulière. En effet la source étant fragile, l'échantillon doit être amené au plus près sans pour autant toucher la fenêtre de sortie des rayons X. De plus, comme vu dans la partie précédente, l'augmentation de la résolution spatiale diminue le FoV. Afin de pouvoir imager l'entièreté du diamètre de la paille ainsi que le plus de hauteur possible tout en augmentant la résolution, nous avons dû faire attention à ce que notre échantillon soit le mieux centré possible, c'est-à-dire que sa rotation impacte au minimum la position des radiographies sur le capteur. Ainsi, l'extrémité basse de l'échantillon est insérée dans un capillaire en verre afin de placer la paille à la bonne hauteur. Ce capillaire est tenu par un mors à trois dents. Un fois l'échantillon mis en place, il est scanné dans son état initial (d_0), avant la dégradation enzymatique, puis après X minutes de dégradation (d_X), dans son état final. En effet, chaque échantillon correspond à un temps de dégradation. Lors d'une étude précédente, à l'occasion du stage de master de Louison Dumond (2016, financement incitatif INRAE Splendid, 2015-2017), il a été conclu que pour diminuer l'impact des sollicitations mécaniques qui pourraient dégrader l'échantillon (cycles d'imbibition,

séchage, manipulation, ... qui seront détaillés en §2.2.4), chaque échantillon ne subirait qu'un seul cycle de digestion.

Les acquisitions d'images ont été réalisées avec une tension d'accélération de 45 kV et un ampérage de 250 μ A, soit une puissance de 11,25 W. La tension d'accélération définit la vitesse des électrons et l'énergie maximale du spectre quand l'ampérage détermine la quantité d'électrons. Le choix de ces paramètres a été fait de façon à optimiser le contraste (largeur de l'histogramme) sur les radiographies et sur les coupes tomographiques. Le coefficient d'atténuation des matériaux augmente (i.e. meilleur contraste) généralement lorsque l'énergie diminue. Nous avons donc sélectionné la tension la plus basse permettant tout de même au rayonnement de traverser l'échantillon. Pour faire cette sélection nous avons examiné l'histogramme des radiographies afin d'avoir l'histogramme le plus large possible pour augmenter les contrastes sur les images 3D. De plus, nous avons choisi d'utiliser une cible en molybdène (à la place de la source en tungstène plus « classique »). Une cible en molybdène sépare mieux les variations en numéro atomique lorsque des grandes tensions sont utilisées (>20 kV) et donc augmente les contrastes [135].

Le temps de scan est impacté par la résolution comme dit précédemment. En fonction des applications, il faut généralement trouver un compromis sur le temps de scan, en jouant sur le nombre de radiographies prises et le nombre de radiographies moyennées à une position angulaire donnée. En effet, les radiographies utilisées pour la reconstruction sont en fait des moyennes sur un certain nombre de radiographies prises à une position angulaire donnée, afin d'augmenter le rapport signal/bruit et donc d'augmenter la qualité de l'image.

Nous avons choisi de prendre 1700 radiographies avec un temps d'exposition de 1250 ms et une moyenne de 4 images pour une durée totale de balayage de 188 minutes (environ 3 h). Le temps de scan est important mais nous avons besoin d'une qualité d'image importante pour pouvoir poursuivre notre étude. Une fois l'acquisition effectuée, la reconstruction et la correction des artéfacts prennent place.

La reconstruction tomographique et la correction des artéfacts sont réalisées par le logiciel commercial rattaché au tomographe utilisé, Phoenix Datos|X. Cette étape est une « boîte noire » car nous n'avons pas d'information sur les algorithmes utilisés. La reconstruction nous permet d'obtenir un volume 3D de 1.25 mm de hauteur, correspondant à 1000 coupes tomographiques transversales.

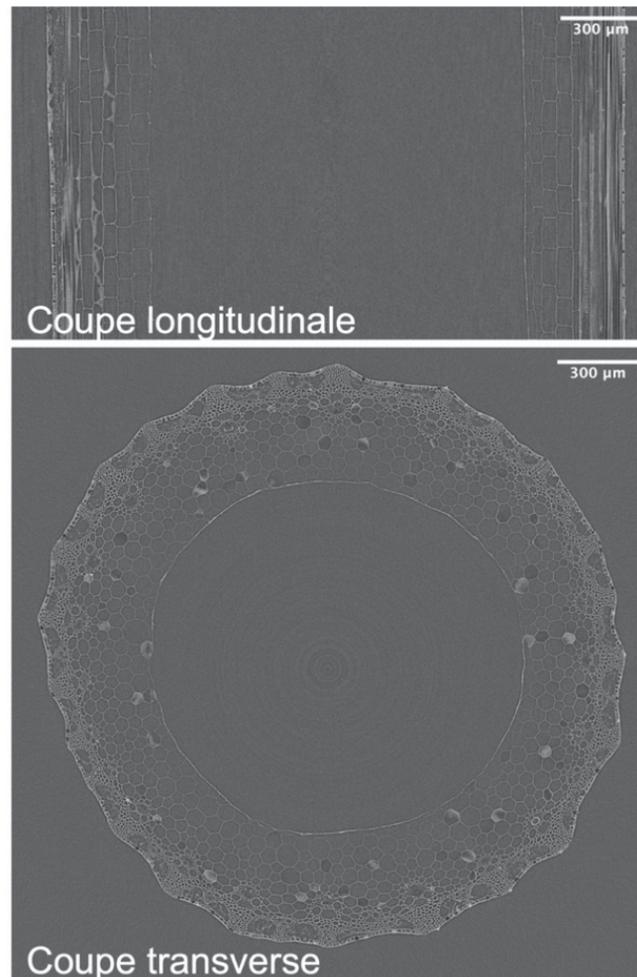


Figure 22: Coupes tomographiques longitudinale et transverse, obtenues après la reconstruction tomographique d'un scan d'un échantillon de paille de blé non dégradée. Ce sont les images brutes obtenus après reconstruction, sans post-traitement.

La Figure 22 montre des coupes brutes selon deux directions issues de la reconstruction tomographique d'un scan de paille de blé. Les coupes tomographiques transverses seront utilisées pour la suite de notre étude comme support pour toutes nos analyses. Ces coupes sont des images en format Tiff (Tagged Image File Format) en 16 bits. Ce format d'image permet la compression et décompression des images sans perte d'information, de plus ce format prend aussi en charge les niveaux de gris.

La Figure 23 montre une coupe transverse d'un échantillon brut ainsi qu'un zoom et l'histogramme correspondant à cette coupe. On peut voir que, malgré nos efforts pour maximiser la qualité de l'image, elle est quand même bruitée. Sur l'histogramme de la Figure 23.c, le pic correspond à l'air, le matériau de fond de l'image et la queue de l'histogramme

(du côté droit du pic) correspond au matériau constitué des parois cellulaires de la paille. Celui-ci est plus absorbant que l'air et donc correspond à des niveaux de gris plus élevés.

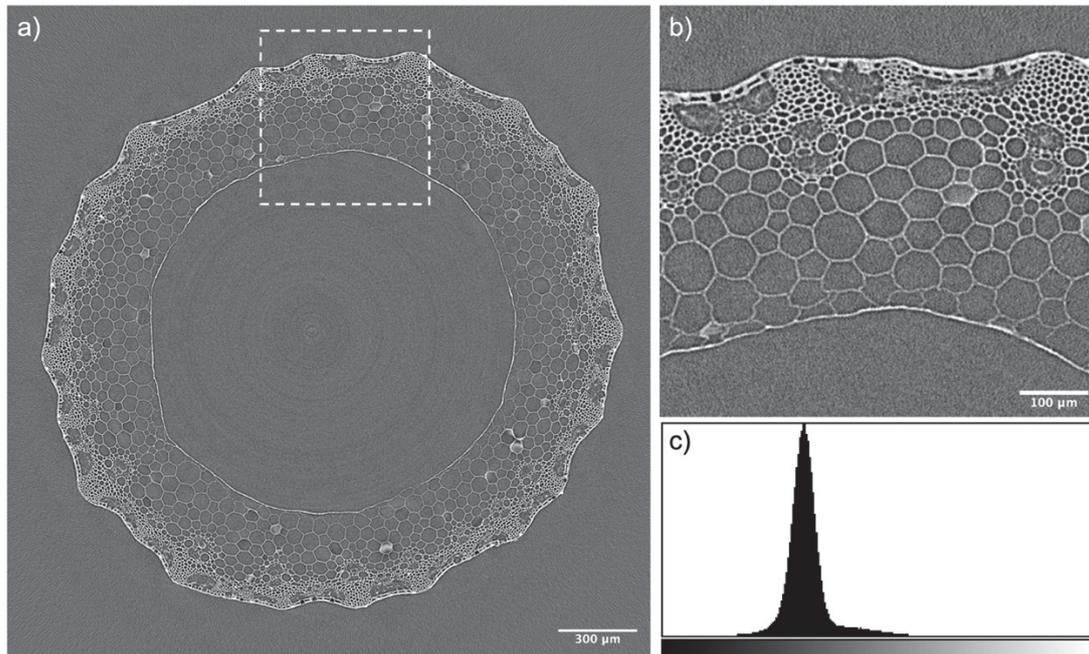


Figure 23: a) Coupe tomographique transversale de paille de blé native. b) Gros plan sur le carré blanc en pointillés. c) Histogramme des niveaux de gris de la coupe.

Le processus de post-traitement des images, c'est-à-dire l'ensemble des opérations effectuées sur les coupes tomographiques obtenues en vue de leur exploitation quantitative sera détaillé dans le Chapitre 1.

2.2. Échantillons de paille de blé pour la microtomographie : manipulation, préparation et hydrolyse enzymatique

2.2.1. La paille de blé

La paille de blé est la partie résiduelle de la plante après la récolte des grains. Elle est composée de nœuds servant de points d'attache des feuilles à la tige et d'entre-nœuds [80] comme décrit dans le Chapitre 1. Dans notre étude, les échantillons utilisés sont des entre-nœuds de paille de blé (*Triticum aestivum*, cv. Apache), récolté à l'été 2010 et séché sur site, Hérault, France d'environ 1 cm de haut, 2 mm de diamètre et 0,4 mm d'épaisseur.

2.2.2. Test enzymatique

Les échantillons de notre étude ont été digérés par un cocktail enzymatique commercial, Novozymes Cellic HTEC2 (lot VHN00003, 2013). Bien que la composition exacte de ce cocktail ne soit pas publiée (elle est confidentielle), ce dernier contient un mélange d'enzymes actives sur différents polymères de carbohydrates constituant la paroi végétale [72], comme des endoxylanases et des cellulases. Ce cocktail présente une activité enzymatique optimale entre 45° C et 50° C, à un pH compris entre 5 et 5,5. Dans notre étude, nous avons travaillé à pH 5,4 et 45° C. Un tampon citrate stock concentré 10 fois a été préparé (500 mM citrate, pH 5,4). Pour ce faire, 3,36 g d'acide citrique (MW = 210,14 g/mol) et 10 g de citrate de sodium (MW = 294,12 g/mol) ont été dissous dans 80 mL d'eau déionisée. Ensuite le pH de la solution a été ajusté à 5,4 en utilisant une solution concentrée d'hydroxyde de sodium ou d'acide acétique. Une fois le pH ajusté, le volume du tampon est ajusté à 100 mL par ajout d'eau déionisée. Cette solution est conservée à température ambiante. À partir de ce tampon, un tampon d'activité (TA) est préparé. Pour réaliser cette solution, 10 mg d'albumine de sérum bovin (BSA) est dissous dans 10 mL de tampon stock, puis complété avec 80 mL d'eau désionisée. Le mélange est homogénéisé et le pH est ajusté à 5,4. Le volume final est alors complété à 100 mL par de l'eau déionisée. Cette solution est stockée à 4°C. Les solutions enzymatiques utilisées dans notre étude proviennent d'une dilution au 1/500 final de la solution commerciale de Cellic HTEC2. Pour obtenir cette dilution, une solution mère au 1/10 (i.e. diluée 10 fois) est obtenue en mélangeant 50 µL de cocktail à 450 µL de TA. Puis une seconde dilution est obtenue en mélangeant 100 µL de la solution mère à 400 µL de TA. L'ensemble de ces solutions enzymatiques est conservé dans de la glace à 4° C. La dilution finale sera obtenue en mélangeant 200 µL de solution enzymatique à 1800 µL de TA contenant un échantillon de paille de blé.

2.2.3. Test DNS

Le suivi de l'activité du cocktail enzymatique sur la paille de blé peut être effectué par une méthode de dosage colorimétrique très couramment utilisée, en utilisant l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) [136]. En effet, chaque événement hydrolytique de polymères de sucres des parois des cellules de notre échantillon conduit à la formation d'une extrémité non

réductrice. La solution de DNS contient 10 g.L^{-1} d'acide dinitrosalicylique (Acros organics), 16 g.L^{-1} d'hydroxide de sodium (NaOH, GPR Rectapur) et 300 g.L^{-1} tartrate et potassium de sodium (VWR chemicals). Classiquement, un volume de $100 \mu\text{L}$ d'échantillon est mélangé à $100 \mu\text{L}$ de DNS dans un tube de $1,5 \text{ mL}$ puis chauffé 10 min à 95° C . Du fait du pH très basique du DNS ($\text{pH} > 12$), les enzymes sont instantanément inactivées à son contact. Lorsque tous les échantillons sont prélevés, un volume de 1 mL d'eau déionisée est ajouté à chaque tube, puis $300 \mu\text{L}$ de cette solution sont déposés dans une microplaque de 96 puits. L'absorbance dans chaque puits est mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur microplaque (Sunrise, TECAN). Afin de convertir la valeur de l'absorbance mesurée pour chaque échantillon en équivalent unité de xylose réduit exprimée en mM, une gamme étalon est réalisée en parallèle de chaque cinétique en utilisant des solutions de xylose de concentrations croissantes à partir d'une solution mère de 20 mg/mL de xylose (100 mg de xylose pour 5 mL d'eau déionisée). De cette solution mère, 5 mL de différentes concentrations sont préparés : $0,05 \text{ mg/mL}$; $0,1 \text{ mg/mL}$; $0,2 \text{ mg/mL}$; $0,4 \text{ mg/mL}$; $0,5 \text{ mg/mL}$; 1 mg/mL et 2 mg/mL . Ces concentrations massiques correspondent aux concentrations molaires suivantes : $0,33 \text{ mM}$; $0,66 \text{ mM}$; $1,32 \text{ mM}$; $2,64 \text{ mM}$; $3,33 \text{ mM}$; $6,66 \text{ mM}$ et $13,32 \text{ mM}$. La Figure 24 illustre une microplaque avant analyse par le Sunrise et met en parallèle une gamme étalon typique. Il faut noter que pour chaque analyse une gamme étalon particulière est établie.

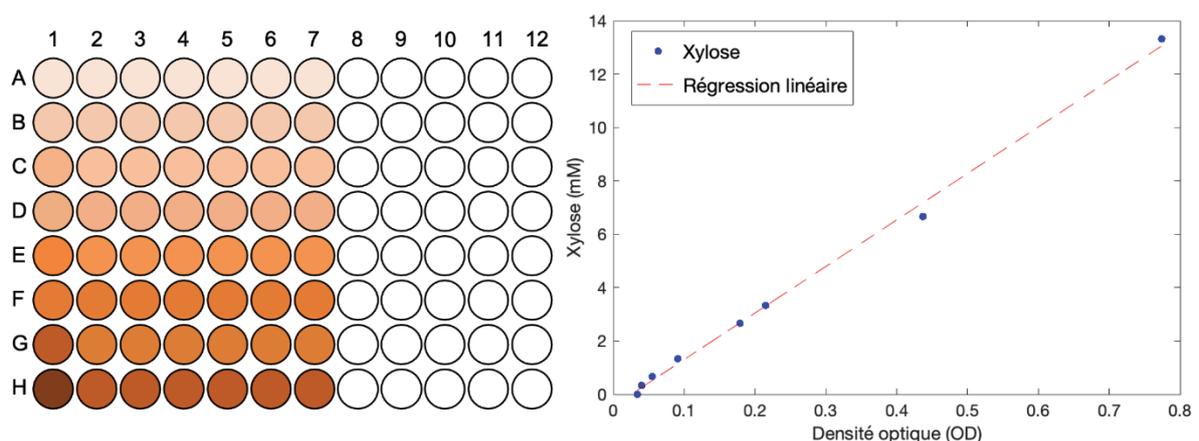


Figure 24 : Procédure d'étalonnage. Gauche : schéma d'une microplaque 96 puits contenant des solutions DNS en présence de sucres réducteurs, après révélation thermique. A-H : temps par ordre croissant. Colonne 1 : gamme étalon, colonnes 2-7 : différents échantillons, colonnes 8-12 vides. Droite : Courbe étalon typique mettant en relation la concentration en xylose (en ordonnée) et la densité optique de la gamme étalon en abscisse (colonne 1).

2.2.4. Préparation des échantillons pour la μ CT

Avant toute utilisation, les échantillons sont lavés dans trois bains successifs d'eau déionisée pendant 5 minutes, 10 minutes et une heure, puis séchés pendant 6 heures dans un four ventilé à 45° C. Une fois cette étape effectuée, un premier scan de l'état initial de l'échantillon est effectué (d0). Typiquement, un échantillon de paille de blé est immergé dans 1800 μ L de TA dans un tube de 2 mL et incubé 2 h à température ambiante, afin que le tampon imbibe la paille de blé. Puis l'échantillon est incubé 30 min à 45° C (ThermoMixer C Eppendorf, 1000 rpm) et la réaction est initiée par ajout de 200 μ L de solution enzymatique (t=0 min). Les échantillons seront chacun digérés pendant une durée déterminée de 30, 45, 60, 90 ou 120 min. Les échantillons de contrôles sont incubés dans les mêmes conditions mais en absence d'enzymes.

Temps de digestion	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Échantillons	P9	P10, P17, P20	P4, P5, P12, P15	P6	P8, P14

Tableau 1: Récapitulatif des échantillons de paille de blé en fonction de la durée de la digestion enzymatique. Les échantillons en vert étant les contrôles. La notation se fait de la manière suivante : P+numéro de l'échantillon.

Les réactions enzymatiques sont stoppées par trois bains successifs d'eau déionisée pendant 5 min, 10 min et une 1 h, puis séchés pendant 6 heures dans un four ventilé à 45°C. Après cela, le scan de l'état final de l'échantillon est effectué (dX). Un cas limite est également préparé avec une digestion pendant 72 h, en prenant soin de remplacer toutes les 24 h la solution enzymatique par une solution fraîchement préparée (échantillon P7).

Les échantillons présentés dans le Tableau 1 ont été utilisés pour les scans tomographiques ainsi que pour les suivis par DNS lors de leur digestion enzymatique.

2.3. Autres approches d'imagerie

Outre la tomographie à rayons X, nous avons eu recours de manière ponctuelle à deux autres techniques d'imageries: la microscopie confocale et la microscopie électronique à balayage (MEB). La microtomographie telle qu'utilisée dans notre étude étant novatrice (en terme d'échantillon et d'interprétation des images), il nous a semblé important d'appuyer nos observations à l'aide de techniques couramment utilisées pour visualiser des échantillons de plantes. Par ailleurs, ces techniques permettent d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues par microtomographie (qui sont purement d'ordre structurel) et leurs résolutions spatiales sont généralement supérieures, ce qui permet d'affiner notre compréhension des images tomographiques. Les échantillons de pailles proviennent du même lot que celles utilisées pour la microtomographie et sont traités dans des conditions similaires. Nous présentons ici les protocoles d'imagerie et les résultats seront introduits plus tard dans le manuscrit.

2.3.1. Microscopie confocale

2.3.1.i Marquage par calcofluor pour l'étude de la teneur en cellulose

Nous discutons ici d'un jeu de données obtenus par microscopie confocale en amont de la thèse, par Alain Jauneau de la plate-forme TRI- Genotoul. Les échantillons ont été marqués avec du calcofluor pour mettre en évidence la présence de cellulose. On verra que ces images ont joué un rôle important dans notre stratégie, en motivant notamment l'étude présentée dans la seconde partie de ce manuscrit. Le protocole de préparation des échantillons est détaillé ci-dessus.

Les pailles de blé subissent tout d'abord une attaque enzymatique : elles sont incubées en présence de tampon (tampon citrate 50 mM pH 5,4) avec 0,1 g/L du cocktail enzymatique commercial Novozymes Cellic HTEC2 ce qui correspond à une dilution 1/2000 environ. Des contrôles sans cocktail sont aussi préparés. Après une digestion de 24 h à 45° C, les échantillons sont fixés à l'aide de glutaraldéhyde à 2,5% dans une solution de cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7. Puis, ils sont déshydratés par incubation dans des bains successifs

d'éthanol à 20, 40, 60, 70, 80, 90 % pendant 1 h chacun, puis dans de l'éthanol à 100 % (2 fois 24h). Les pailles de blé sont imbibées par de la résine (LRWhite) dans des solutions d'éthanol: résine 2:1, 1:1 puis 1:2 (\approx 12 h chacune à température ambiante) puis 2 fois dans de la résine pure (24 h chacune). Les échantillons sont enfin placés dans des capsules de résine et incubés à 65 °C pour la polymérisation.

Une fois cette phase de préparation effectuée, les pailles de blé sont coupées en deux par le milieu à l'aide d'un couteau diamanté avec un Ultramicrotome (UltraCut E Leica-Reichert) puis des tranches de 1 μ m sont réalisées sur la face tranchée de la paille de blé. Les coupes sériées sont fixées sur des lames de verre, séchées à 50° C et traitées avec 0,2% de calcofluor. Le calcofluor est une molécule fluorescente spécifique de la cellulose. Les échantillons sont observés en microscopie confocale (Leica SP2 AOBS) avec un laser à diode monochromatique à 405 nm. La fluorescence émise par le calcofluor est recueillie entre 415 et 500 nm. Toutes les observations ont été réalisées avec les mêmes paramètres d'acquisition. Sur les coupes microscopiques obtenues, la taille du pixel est de 0,17 μ m. Pour cette série d'images, on peut noter que les échantillons de départ sont du même type que ceux étudiés dans ce manuscrit. La découpe permet de visualiser des plans 2D transverses du matériau, qui a subi une attaque enzymatique similaire à celle de notre étude, en terme d'accessibilité des enzymes, qui ont accès au matériau depuis l'extérieur (l'épiderme) et l'intérieur (*Pith Cavity Lining*, -PCL-) uniquement.

2.3.1.ii Premières indications sur la composition du PCL

On verra qu'un de nos principaux résultats est que l'attaque enzymatique se produit principalement au niveau du PCL. Pour avoir accès à une composition chimique partielle de ce dernier, nous avons marqué nos échantillons à l'aide différentes sondes fluorescentes et observé leur localisation dans la paille. Ainsi, nos échantillons bruts et non digérés ont été découpés à la main dans le sens de la longueur, afin d'exposer le PCL.

Nous avons utilisé du rouge du Nil (Nile red) pour marquer les lipides et du calcofluor à 0.2 % pour marquer la cellulose. La lignine étant quant à elle auto-fluorescente, elle ne nécessite pas de marquage particulier. Les échantillons ont été observés par microscopie confocale Raman à balayage laser avec une résolution de 0,17 μ m.

2.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Nous avons également utilisé ponctuellement la microscopie à balayage, afin d'obtenir des images à très haute résolution spatiale, le grand avantage de cette technique (destructive pour l'échantillon, celui-ci nécessitant souvent une préparation particulière : découpe et métallisation).

Les échantillons ont été rincés dans de l'eau déionisée et séchés avant d'être coupé à la main dans le sens de la longueur à l'aide d'une lame tranchante, montés sur des stubs de microscope, puis métallisés sur 5 nm d'épaisseur par pulvérisation de platine sous argon (Leica EM MED 020 coating system). Des images MEB ont été acquises à l'aide d'un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 FEG à une tension d'accélération de 10kV.

2.4. Conclusions

Ces différentes techniques et leurs résultats seront mises en œuvre pour obtenir et discuter les résultats du Chapitre 4. Dans le Chapitre 3 suivant, nous détaillons les opérations de post-traitement des images de tomographie X, un point important de notre travail. C'est en effet sur cette technique que des développements importants ont été effectués.

Chapitre 3. Traitement et exploitation des images de tomographie à rayons X

Dans ce Chapitre, nous présentons les différents traitements d'images appliqués aux images obtenues par tomographie à rayons X en suivant le protocole présenté au Chapitre précédent. Il s'agit à proprement parler de résultats de ce travail de thèse, qui ont demandé un travail conséquent. Cependant, il faut noter qu'une lecture détaillée de ce Chapitre n'est pas nécessaire pour appréhender les résultats présentés dans le Chapitre suivant et peut donc être omise dans un premier temps ou bien faire l'objet d'une lecture à part.

3.1. Traitement d'images (*denoising*, *segmentation*, *ajustement d'histogrammes*)

Dans cette partie nous allons aborder le traitement des coupes tomographiques. Pour notre étude, nous utiliserons les coupes transverses car elles nous permettent de visualiser la structure de la paille de blé de façon analogue aux visualisations habituelles que l'on peut retrouver avec des techniques de microscopie optique [73, 111]. Comme nous l'avons vu sur la Figure 23 les images brutes obtenues par tomographie, en sortie immédiate de reconstruction 3D, présentent un bruit de fond important et le contraste entre le bruit et certaines parois végétales est assez faible. Afin de pouvoir exploiter au mieux ces images, une étape de débruitage (*denoising*) est nécessaire. Ensuite, il nous faudra séparer le fond (l'air) de l'information (les parois cellulaires de la paille de blé) par une étape de segmentation. Finalement, pour comparer les résultats obtenus sur différents scans, nous verrons qu'une étape d'ajustement des histogrammes (*histogram matching*) est nécessaire. Une fois ces étapes de traitement d'images explicitées, nous verrons dans la section suivante comment les images peuvent être exploitées de manière quantitative.

3.1.1. Débruitage

Une première étape indispensable consiste à débruiter au maximum les coupes tomographiques, tout en conservant les informations sur la structure imagée. Le débruitage est une étape nécessaire. Sur une coupe tomographique telle que celle montrée sur la Figure 23, on constate que le niveau de bruit est important, d'où l'aspect « poivre et sel » du fond (matériau air). On devine qu'il sera alors difficile de séparer proprement les pixels provenant de l'air et du matériau.

Pour débruiter nos images, nous avons tout d'abord dû choisir un algorithme adapté. Nous avons choisi d'utiliser un filtre moyen non-local (*Non-Local Mean Filter* –NLMF-) car ce dernier permet de préserver les informations sur la structure de l'image et de conserver les interfaces entre matériaux. En comparaison avec d'autres algorithmes de débruitage (filtre gaussien par exemple), le NLMF présente un effet de débruitage stable et est caractérisé par l'absence de floutage [137]. En résumé, ce filtre permet de conserver la texture de l'image tout en lissant le bruit de fond.

Le filtre non-local moyen fonctionne de la manière suivante : l'algorithme remplace la valeur d'un pixel par une moyenne des valeurs d'une sélection d'autres pixels. Des sous-images centrées sur d'autres pixels sont comparées à une sous-image centrée sur le pixel d'intérêt considéré. Cette comparaison se fait dans une zone de voisinage dont la taille est définie par l'utilisateur. La moyenne est effectuée uniquement si les sous-images sont similaires à la sous-image centrée autour du pixel d'intérêt [138]. Le caractère aléatoire du bruit permet son élimination. L'image présentée en Figure 25 illustre le fonctionnement de ce filtre. Dans cet exemple, un pixel quelconque est pris comme pixel cible. L'algorithme va alors considérer dans la zone de voisinage différentes sous-images et calculer leur similarité avec la sous-image centré sur le pixel cible. Par exemple, les zones vertes peuvent être celles présentant une forte similarité avec la sous-image centrée sur le pixel cible, les zones bleues une similarité moins importante, les zones rouges étant totalement différentes. Cette opération de comparaison est ensuite répétée pour tous les pixels de l'image.



Figure 25: Exemple de débruitage grâce à un filtre moyen non local (NLMF) [139].

Il existe de nombreuses formulations de ce filtre, qui font parfois appel à des jeux de paramètres différents selon le logiciel utilisé. Pour le mettre en œuvre, nous avons travaillé sous le logiciel Avizo® que nous présenterons plus loin dans ce Chapitre. D'autres essais, moins concluants, ont été menés avec IPSDK®, logiciel développé par la société Reactiv'IP. On peut également noter que ce type de filtre existe aussi sous Matlab.

3.1.1.i Choix des paramètres

Afin de sélectionner les meilleurs paramètres pour le filtre, une étude préliminaire a été menée. À l'aide d'un code développé sous MATLAB, nous avons pu tracer et comparer des profils d'intensité extraits d'une coupe tomographique avant et après débruitage, cf. Figure 18.

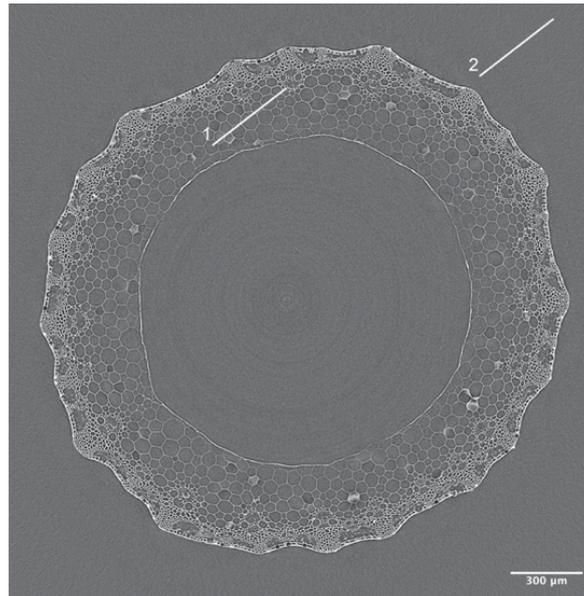


Figure 26: Coupe tomographique sur laquelle sont placées deux lignes le long desquelles des profils d'intensité seront tracés.

La première question a été de choisir si nous appliquons le filtre en 2D (sur chaque coupe individuellement) ou en 3D (sur un ensemble de coupes successives, avec une formulation 3D du filtre, c'est-à-dire des patchs cubiques).

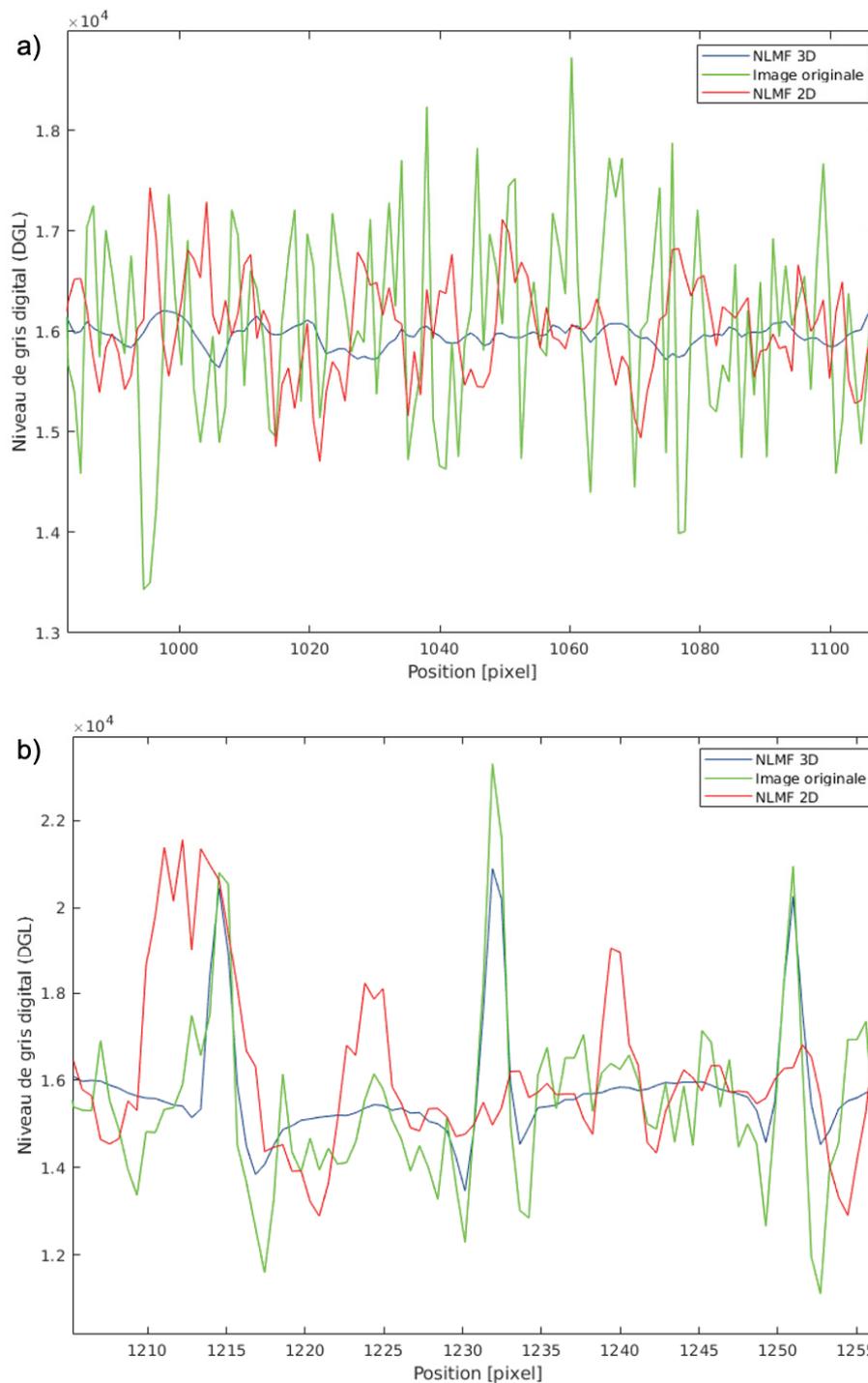


Figure 27: Profils d'intensité caractéristiques dans le fond d'une coupe de paille de blé (a) et à travers sa structure (b).

Sur la Figure 19.a, en vert, nous pouvons voir les variations des niveaux de gris sur la coupe originale, dans le fond de l'image (profil 2 sur la Figure 26), ce qui correspond au bruit, c'est-à-dire ce que nous voulons lisser le plus possible sans pour autant perdre d'informations sur la structure de notre paille. Les profils pour les images filtrées en 2D et en 3D sont

respectivement représentés en rouge et en bleu. Nous pouvons remarquer sur Figure 27.a que le filtre appliqué en 3D permet une meilleure réduction du bruit de fond. Afin de confirmer que le filtre en 3D est la meilleure option, nous devons nous assurer de ne pas perdre d'informations sur la structure de la paille. Pour cela, nous avons tracé sur la Figure 27.b des profils d'intensité au cœur de la structure de la paille de blé (profil 1 sur la Figure 26). Nous cherchons à vérifier que les pics correspondant au passage d'une paroi cellulaire sont conservés par l'algorithme de débruitage. La Figure 27.b confirme notre choix. En effet la courbe bleue est plus fidèle à la structure de la coupe originale.

Nous avons ensuite décidé de faire varier deux paramètres : la taille de la fenêtre de recherche et la taille du voisinage afin de trouver le débruitage optimum. Ces paramètres s'expriment en voxel. La taille du voisinage a besoin de correspondre à la taille des structures observées. Cela permettra de donner plus de poids à l'information que nous souhaitons conserver et donc de diminuer le bruit. Nous avons donc choisi la taille du voisinage autour de 3 pixels, ce qui correspond à la largeur moyenne des pics sur les profils d'intensité lorsque nous traversons une paroi cellulaire. Nous ferons varier ce paramètre entre 2 et 5 pixels. La taille de la fenêtre de recherche doit être plus grande que le voisinage. Plus la fenêtre est grande plus le bruit est réduit, mais sa taille affecte le temps de calcul. Il nous a donc fallu trouver un compromis entre la réduction du bruit, la conservation des structures et le temps de calcul afin d'optimiser notre traitement.

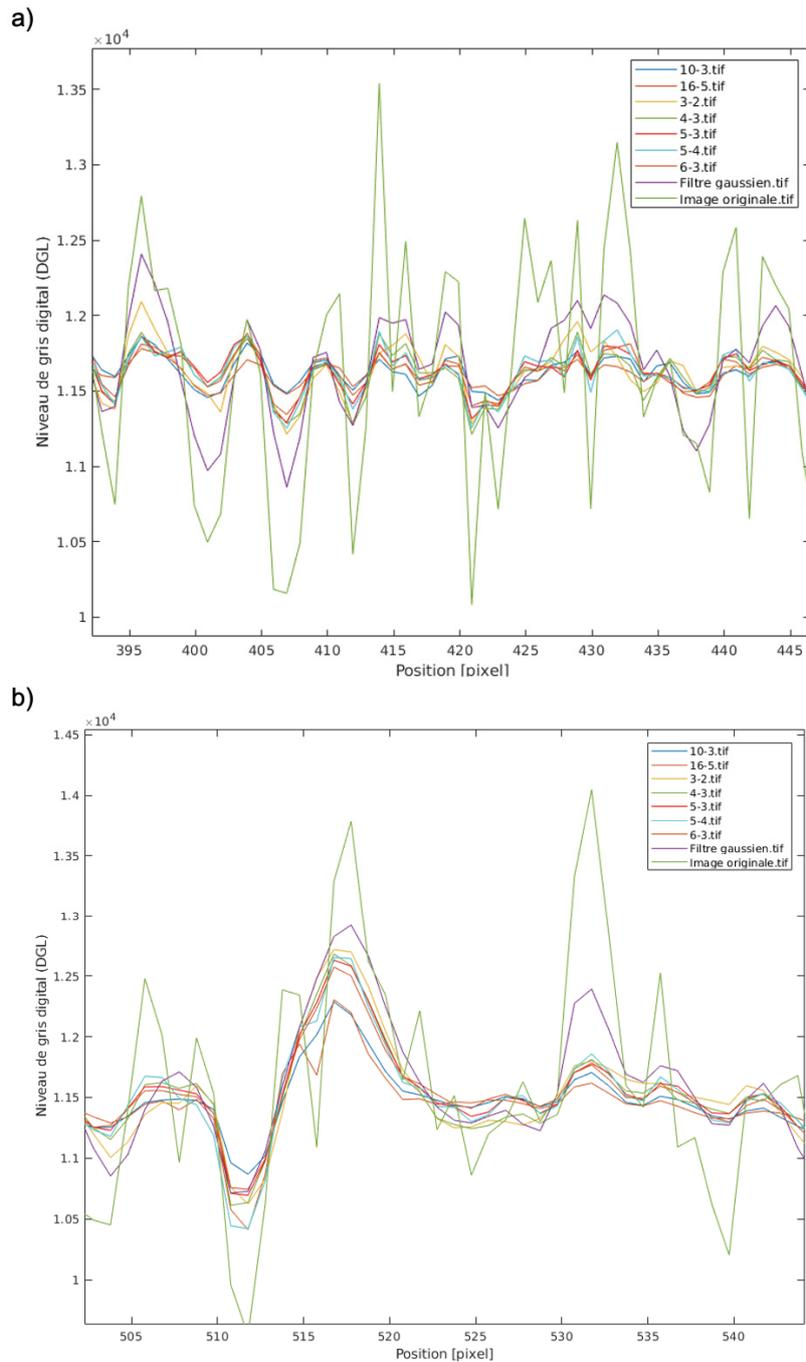


Figure 28: Profils d'intensité caractéristiques dans le fond d'une coupe de paille de blé (a) et à travers sa structure (b) en fonction des différentes tailles de voisinages et de fenêtres de recherche. Le premier chiffre de la légende indique la taille de la fenêtre et le second la taille du voisinage.

La Figure 28 montre la comparaison de profils d'intensité pour une gamme de paramètres et le résultat pour un filtre Gaussien sur la même image (en violet sur la Figure 28). Le filtre Gaussien conserve correctement les pics d'intensité correspondant au matériau mais ne lisse pas assez le bruit en comparaison avec le NLMF. C'est pour cela que nous nous sommes

concentrés sur le filtre moyen non-local. On peut aussi remarquer qu'avec une trop grande fenêtre de recherche (10/16 pixels) la réduction de bruit est importante mais que l'on perd en intensité sur les pics correspondant aux parois végétales. Le meilleur rapport entre la diminution du bruit et la conservation des informations est pour les combinaisons de paramètres suivantes : 3-2, 5-3 et 6-3. La Figure 29 ci-après nous permet de nous concentrer sur ces combinaisons.

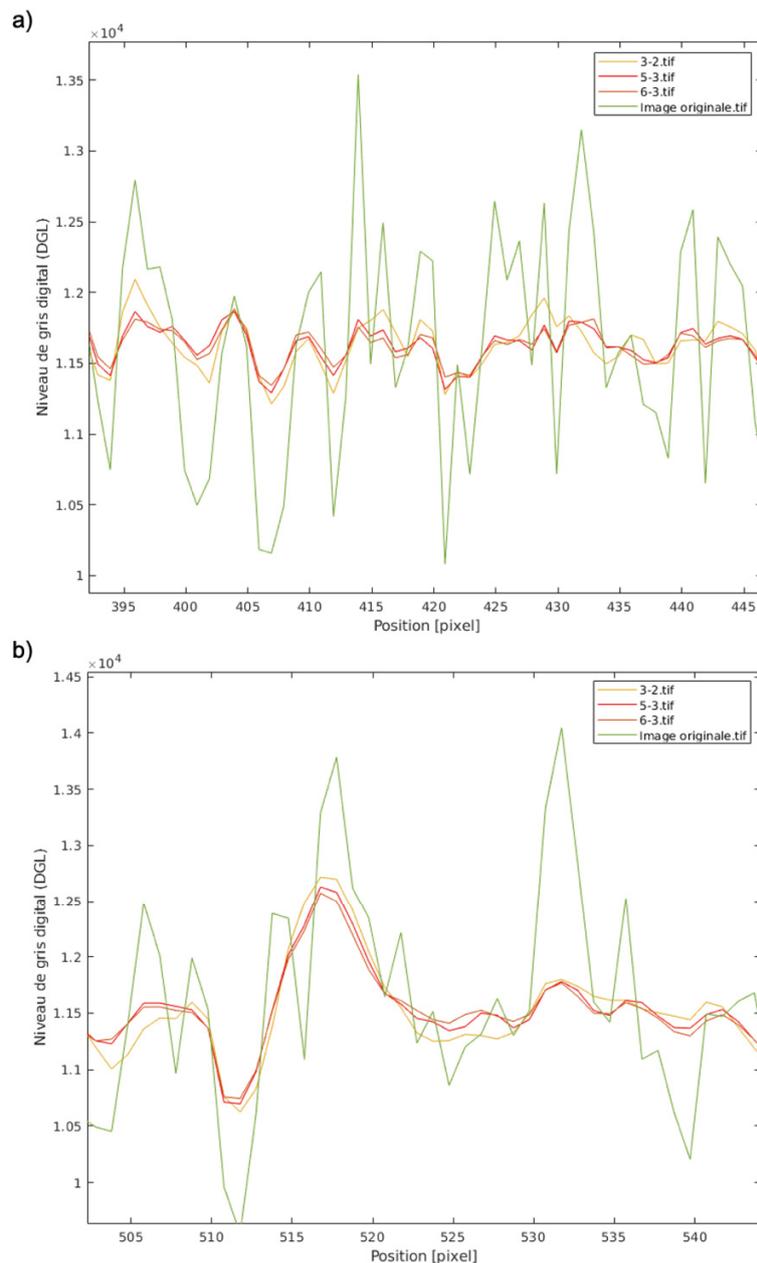


Figure 29: Profils d'intensité caractéristiques dans le fond d'une coupe de paille de blé (a) et à travers sa structure (b) en fonction des différentes tailles de voisinages et de fenêtres de recherche. Le premier chiffre de la légende indique la taille de la fenêtre et le second la taille du voisinage.

On remarque que la réduction du bruit pour la combinaison 3-2 est légèrement moins bonne que pour les deux autres. En revanche, on observe très peu de différences entre les combinaisons 6-3 et 5-3. Nous avons choisi la combinaison 5-3 car plus les fenêtres de recherches sont grandes, plus le temps de calcul est long donc nous gagnons légèrement en temps de calcul. En effet, il est à noter qu'il faut environ 16 h de calcul avec la combinaison de paramètres 5-3 pour débruiter un jeu de données complet (un échantillon composé de 1000 coupes).

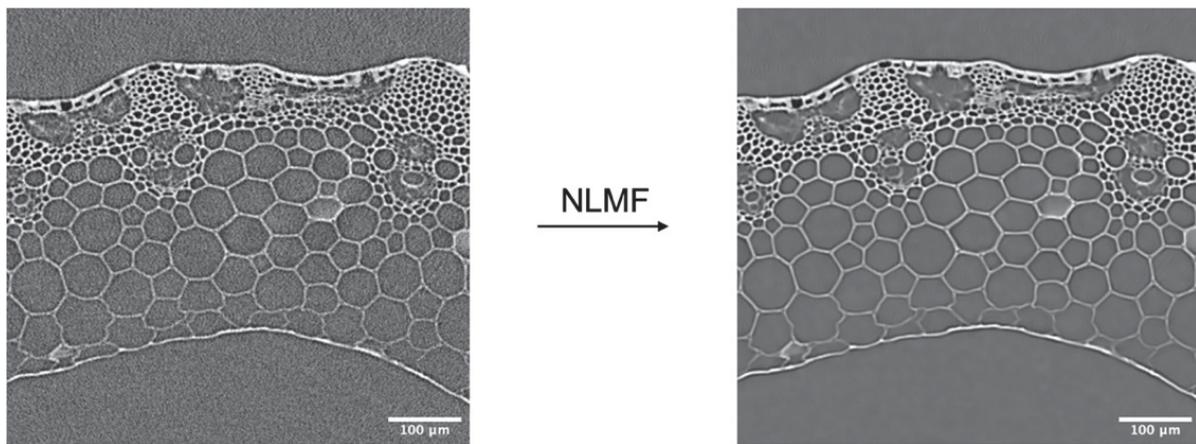


Figure 30: Zooms sur une coupe tomographique de paille de blé avant et après le débruitage.

Pour conclure, comme récapitulé sur la Figure 30, l'action du filtre moyen non-local permet clairement de lisser le bruit de fond de nos images tout en conservant les structures. On s'intéresse dans le paragraphe ci-dessous à son effet sur l'histogramme des niveaux de gris.

3.1.1.ii Effet de l'opération à l'échelle d'une coupe tomographique

Dans ce paragraphe et les suivants, la distribution des niveaux de gris sur une coupe tomographique sera représentée sous forme d'histogrammes similaires à celui présenté sur la Figure 23. Pour une meilleure visibilité, ce n'est pas *stricto sensu* un histogramme en rectangles qui sera tracé mais une courbe. La gamme de niveaux de gris est divisée en classes de largeur identique : l'axe des abscisses donne le centre de chaque classe et l'axe des ordonnées le nombre de voxels dans la classe considérée. On compte alors tout simplement le nombre de voxels dans chaque classe (d'où le terme *count* introduit sur certaines des images à suivre). On peut décider de diviser le nombre de voxels dans chaque classe par le nombre total de voxels sur l'image, auquel cas on parlera de fréquence.

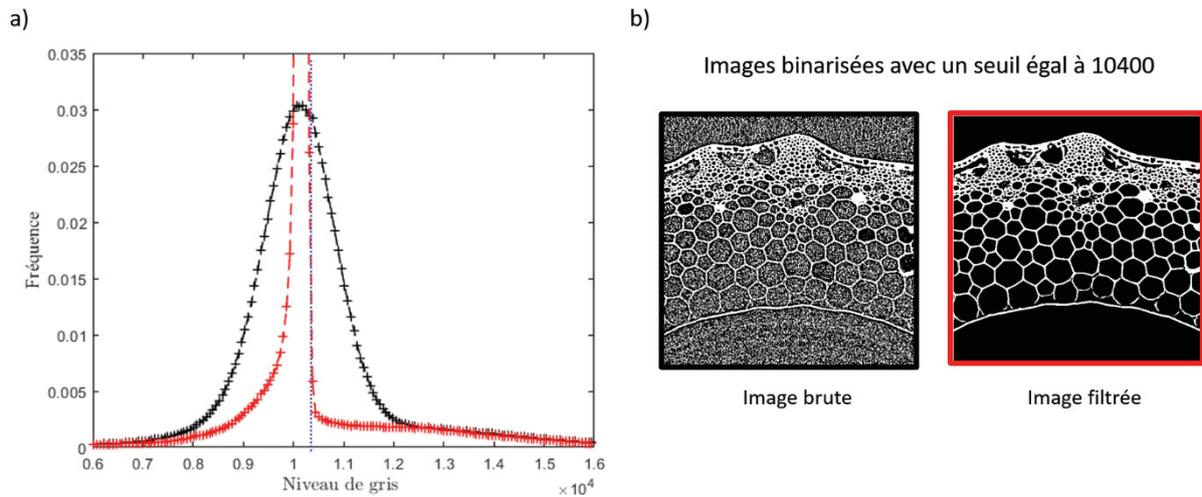


Figure 31: a) Histogramme des niveaux de gris sur une coupe tomographique avant (noir) et après (rouge) débruitage. La courbe pointillée bleue indique le seuil de binarisation qui sera choisi et dont la détermination est explicitée dans la sous-section suivante. b) Exemple d'images binarisées.

L'effet du NLMF sur la distribution des niveaux de gris peut être apprécié en comparant les histogrammes des images, avant et après application du filtre (Cf. courbe noire (avant) et courbe rouge (après)). L'histogramme obtenu avec l'image filtrée est bien plus « piqué », c'est-à-dire qu'il est moins étalé dans la gamme de niveau de gris, ce qui traduit la moindre importance du bruit. On remarque que la queue de l'histogramme, pour les niveaux de gris supérieur à 12500 environ, est peu affectée. Il s'agit des voxels les plus clairs, appartenant au matériau parois cellulaires (*Plant Cell Walls -PCW-*), se détachant nettement par rapport au bruit. On verra ci-dessous que la valeur d'un seuil pertinent de segmentation air/PCW peut être pris à 10400, englobant ainsi la partie droite de l'histogramme filtrée. L'allure de l'histogramme d'une image non filtrée montre clairement que l'application d'un tel seuil sur une image non filtrée donnerait des résultats insatisfaisants, comme illustré dans la sous-section suivante qui traite justement du choix du seuil de segmentation.

3.1.2. Segmentation / binarisation

Nous abordons maintenant une discussion sur le choix du seuil de niveau de gris (*Gray Levels -GL-*) choisi pour séparer le matériau PCW de l'air (le matériau de fond), c'est-à-dire segmenter ces deux matériaux (la segmentation se réduisant ici à une binarisation, car deux matériaux seulement sont présents). Pour la discussion générique suivante, nous utilisons un

détail d'une coupe tomographique comme image de référence. Cette étape va nous permettre d'isoler le matériau paroi cellulaire, dont on cherche à quantifier la dégradation. Les explications qui suivent sont génériques, les valeurs numériques introduites sont propres à l'échantillon choisi. Cependant, on verra dans la sous-section suivante comment on peut les généraliser à l'ensemble des échantillons.

Deux solutions sont testées : une binarisation simple avec un seuil déterminé à l'œil nu et une technique a priori plus fine (algorithme de type *hysteresis thresholding*). On va voir que toutes deux donnent des résultats équivalents.

3.1.2.i Binarisation avec détermination d'un seuil « à l'œil nu »

La Figure 32 montre la distribution des GL pour l'image de référence qui est présentée en insert. Quelques images obtenues après binarisation simple (les voxels en dessous du seuil sont mis à 0 -noir-, les voxels au-dessus du seuil sont mis à 1 -blanc-) sont montrées sous l'histogramme de l'image. Les différents seuils utilisés sont représentés par des lignes pointillées verticales sur l'histogramme.

Lorsque le seuil est trop bas, les voxels d'air bruités finissent clairement par être considérés comme des voxels appartenant au matériau PCW. Lorsque le seuil est trop élevé, certains voxels appartenant au matériau PCW sont écartés à tort : le matériau PCW est progressivement rogné lorsque le seuil est augmenté.

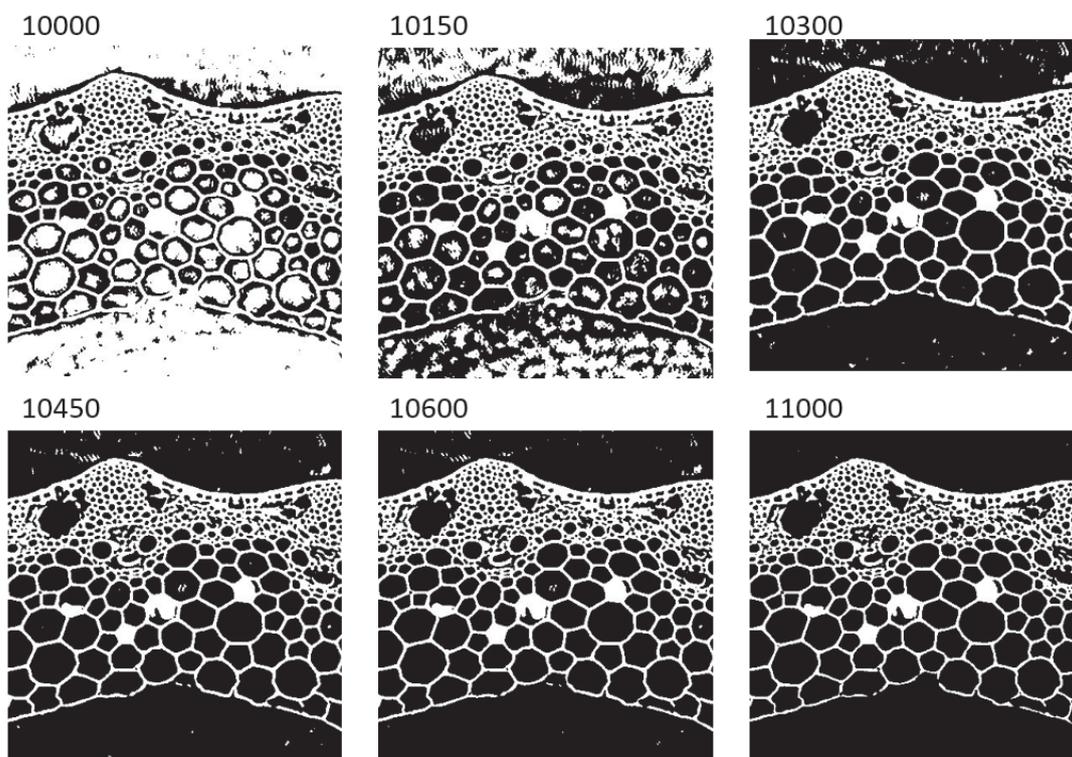
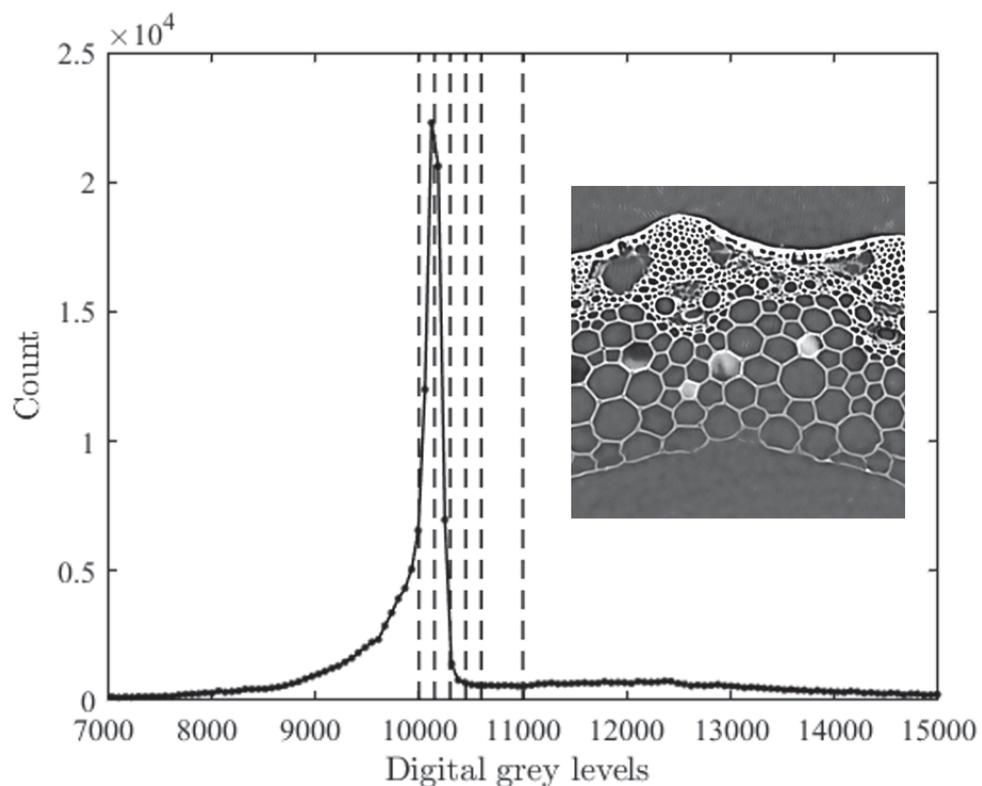


Figure 32 : En haut: histogramme du détail d'une coupe tomographique transversale représenté en insert. Les lignes pointillées verticales mettent en évidence les seuils utilisés dans la partie inférieure de la figure. En bas : images binarisées, pour différentes valeurs du seuil de binarisation.

La Figure 33 montre la fraction de voxels blancs en fonction du seuil de binarisation. Il y a une transition nette entre une situation où le seuil est trop bas de sorte que la plupart des voxels sont considérés comme du matériel PCW (seuil inférieur à 10000) et une situation où l'effet de « rognage » est dominant, comme le montre la diminution graduelle de la fraction de voxels blancs pour un seuil supérieur à 10500. Par conséquent, le seuil est choisi pour être 10400, juste à la transition entre une image dominée par le bruit et une image sans rognage, avec une incertitude de +/- 100.

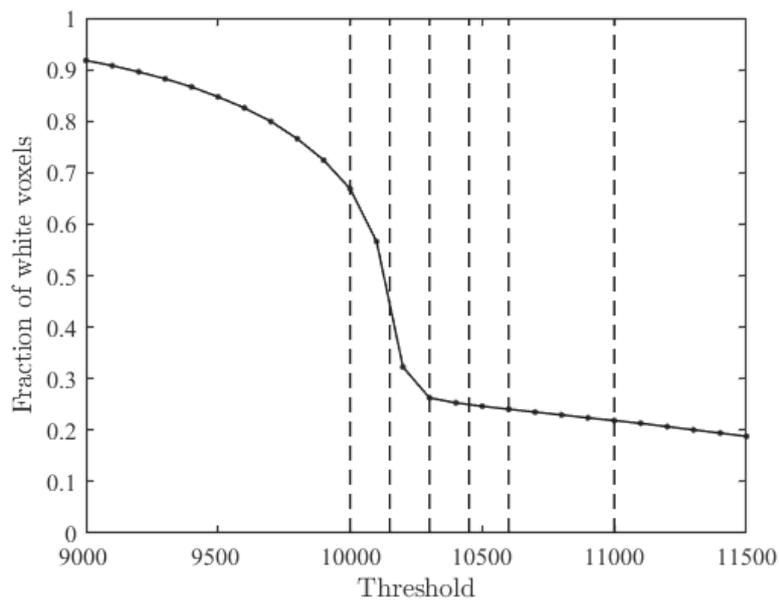


Figure 33: Fraction de voxels blancs trouvés dans l'image de la Figure 32, en fonction du seuil de binarisation. Les lignes pointillées verticales mettent en évidence les seuils utilisés dans la partie inférieure de la Figure 32.

On peut regarder également l'évolution de la moyenne avec le seuil. Sur la Figure 34, on retrouve le même genre de comportement avec une transition au niveau des valeurs de seuils autour de 10400 si ce n'est que l'évolution de la moyenne est moins marquée.

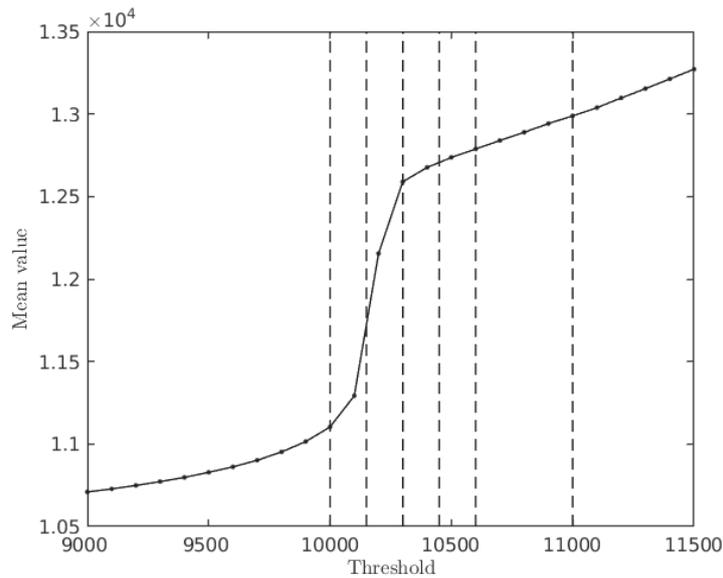


Figure 34 : Valeur moyenne des voxels retenus par l'opération de binarisation sur Figure 32, en fonction du seuil choisi. Les lignes pointillées verticales mettent en évidence les seuils utilisés dans la partie inférieure de la Figure 32.

3.1.2.ii Binarisation par seuillage par hystérésis

Une méthode de binarisation a priori plus fine que la précédente est décrite dans ce paragraphe. Elle a été mise en œuvre sous Avizo® en utilisant un algorithme de seuillage par hystérésis (*hysteresis thresholding*, HT). Ce dernier crée une image binaire en utilisant un seuil bas (faible niveau de gris) et un seuil haut (niveau de gris plus élevé). Les pixels dont le niveau de gris est plus élevé que le seuil haut se voient automatiquement attribuer la valeur 1 (matériau) et ceux dont le niveau de gris est inférieur au seuil bas attribuer la valeur 0. Pour les pixels dont le niveau de gris est compris dans l'intervalle entre les deux seuils, le processus est le suivant. L'algorithme part d'un pixel attribué au matériau 1 et étend le matériau de pixel en pixel jusqu'à ce qu'il soit face à un pixel dont le niveau de gris est inférieur au seuil bas. Cet algorithme fonctionne grâce à une méthode par croissance de régions (*region growing*). Il faut noter que le résultat est généralement assez peu sensible au seuil haut et dépend principalement de la valeur du seuil bas [121]. Nous avons effectué notre propre étude de sensibilité sur les choix des seuils, similaire dans son principe à celle exposée précédemment pour la binarisation simple. Pour ce faire nous nous sommes placés dans trois situations : i)

les seuils haut et bas sont les mêmes (binarisation simple) ; ii) le seuil haut est fixe et le seuil bas varie ; iii) le seuil haut varie et le seuil bas est fixe.

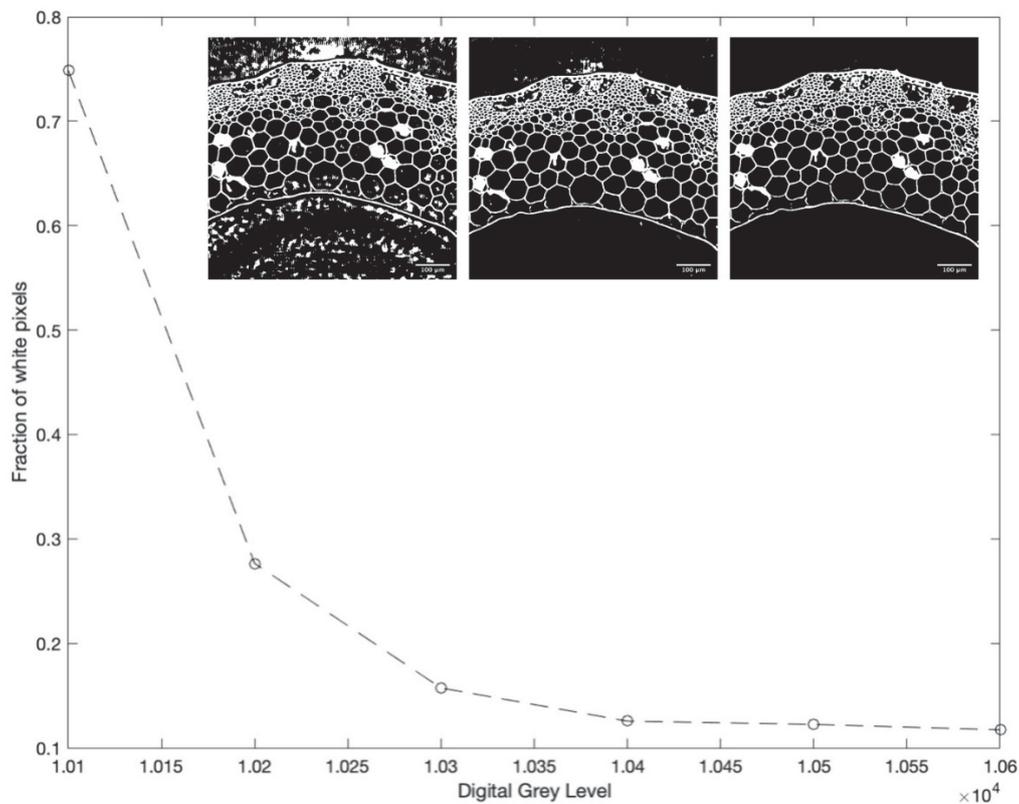


Figure 35: Graphique représentant l'impact du seuil sur le pourcentage de pixels blancs présents sur une coupe tomographique type. En insert, zooms sur un détail de coupes tomographiques de paille de blé binarisée avec un seuil unique dont la valeur vaut, de gauche à droite : 10200, 10400 et 10600.

La première situation étudiée nous place dans la même situation qu'une binarisation plus classique à un seul seuil (voir les résultats présentés sur la Figure 35). Cela nous permet d'avoir une idée du seuil bas autour duquel nous allons devoir travailler. On peut voir sur les coupes ainsi que sur la Figure 35 que pour un seuil inférieur à 10400 il y a une grande proportion de pixels blancs et donc de bruit. À partir de 10400 on voit une diminution de la proportion de pixels blancs. Ces résultats sont similaires à ceux de la Figure 32. Il va donc falloir choisir un compromis nous permettant de ne pas avoir de bruit sans pour autant perdre de la matière. Pour trouver le seuil bas qui nous paraît le plus pertinent, dans le cadre de l'algorithme HT, nous allons fixer maintenant un seuil haut à 11100. Les résultats de cette étude sont montrés sur la Figure 36 ci-dessous.

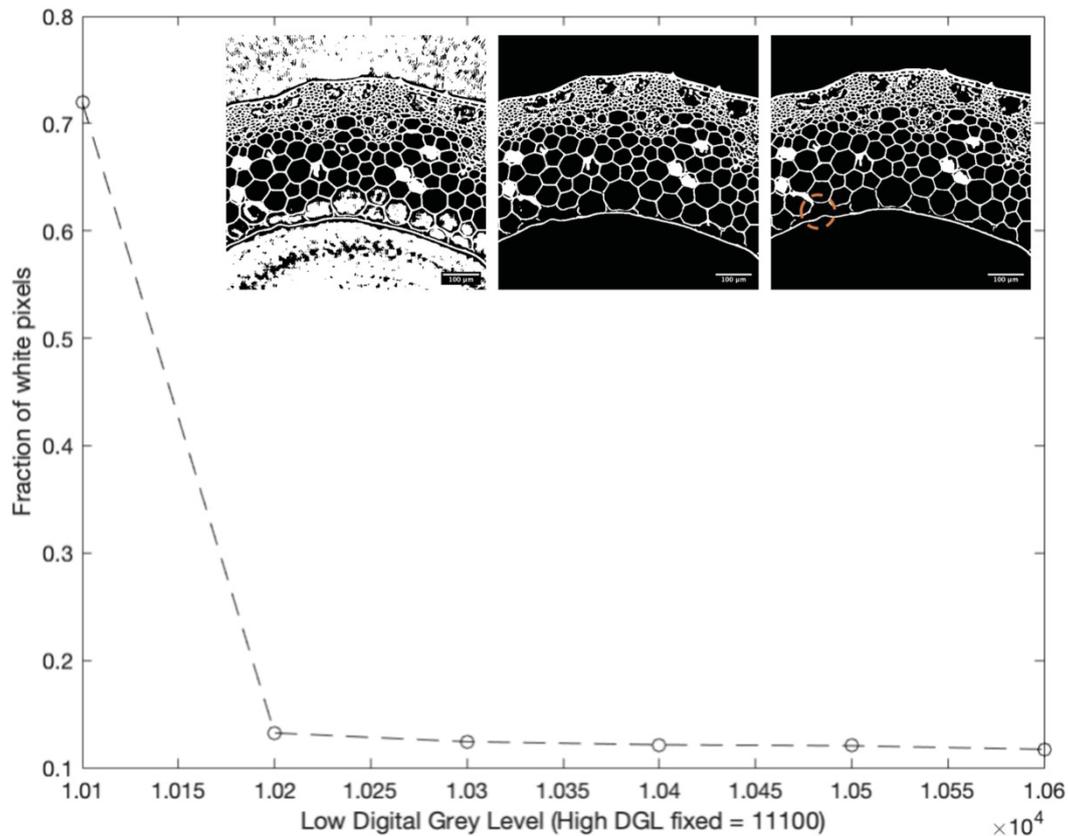


Figure 36: Graphique représentant l'impact du seuil bas sur le pourcentage de pixels blancs présents sur une coupe tomographique, le seuil haut étant fixé. En insert : zooms sur un détail de coupe tomographique de paille de blé binarisées avec un seuil haut fixé à 11100, le seuil bas valant respectivement de gauche à droite : à 10100, 10400 et 10600. Pour ce dernier cas, la zone orange souligne un endroit où le seuil appliqué (10600) fait disparaître de la matière.

On remarque une diminution drastique de la fraction de pixels blancs entre 10100 et 10200 puis une diminution plus progressive. Il est préférable d'avoir encore une infime proportion de bruit plutôt que de perdre de l'information dans la matière. En examinant les coupes issues des différentes opérations, nous pouvons remarquer que pour les seuils au-delà de 10400 il y a disparition de voxels correspondant à du matériau PCW à l'intérieur de la paille de blé, comme par exemple au niveau du cercle en pointillés oranges sur la Figure 36. Pour les coupes dont le seuil bas a été fixé en dessous de 10400, on dénote encore une quantité de bruit importante qui nous gênera dans les étapes suivantes. On choisit donc un seuil bas à 10400. Pour finir, même si on s'attend à ce que le choix de la valeur du seuil haut soit moins critique, nous allons tester plusieurs seuils hauts en utilisant la valeur de seuil bas sélectionnée en amont.

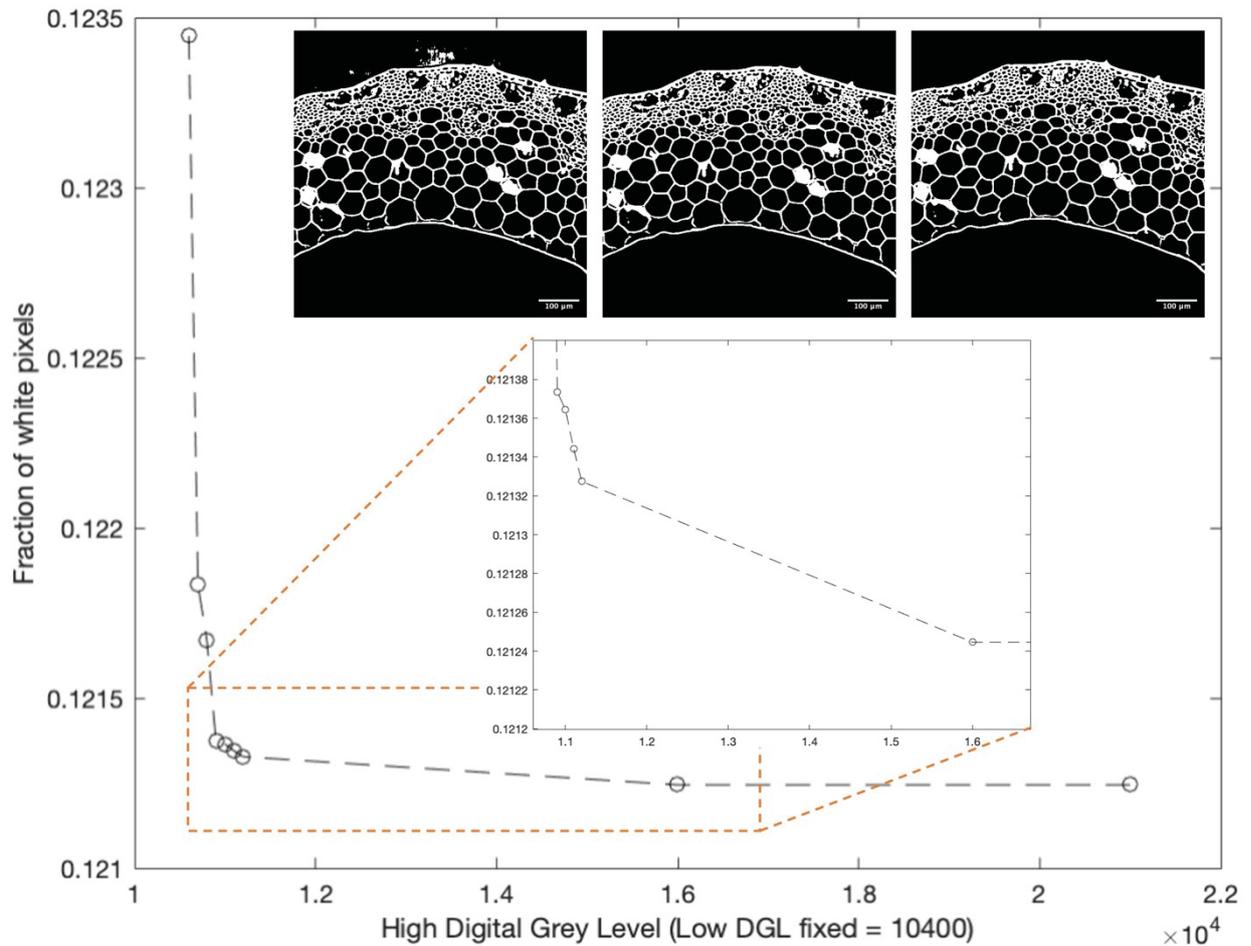


Figure 37 : . Graphique représentant l'impact du seuil haut sur le pourcentage de pixels blancs présents sur une coupe tomographique, le seuil bas étant fixé. En insert : zooms sur un détail de coupe tomographique de paille de blé binarisée avec un seuil bas fixé à 10400, le seuil haut valant respectivement de gauche à droite : à 10600, 11100 et 21000.

Faire varier la valeur du seuil haut nous a permis de confirmer qu'il était moins critique, comme attendu. En effet, on peut remarquer sur la Figure 37 que la fraction de pixels blancs sur les coupes varie assez peu par rapport aux figures précédentes (des variations entre 0,121 et 0,1235 environ contre des variations entre 0,1 et 0,7 environ). En prenant en compte la variation de la fraction de pixels blancs et en examinant les coupes nous avons conclu que le seuil haut idéal est de 11000.

Pour résumer, une fois l'étude menée pour définir les seuils les plus adéquats pour la binarisation de nos images, nous avons sélectionné 10400 pour le seuil bas et 11000 pour le seuil haut. La Figure 38 ci-dessous montre l'effet du seuillage par hysteresis avec les seuils choisis sur un zoom de coupe de paille de blé.

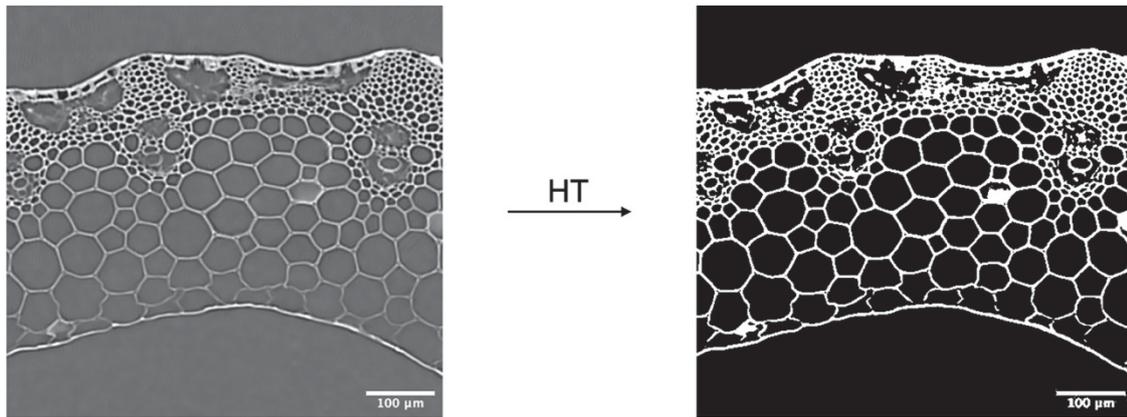


Figure 38: Zoom sur une coupe tomographique de paille de blé avant et après seuillage par hystérésis.

A l'œil nu, on se rend compte que les deux méthodes de segmentation (avec un seuil unique ou par hysteresis thresholding) donnent des résultats très similaires. Une manière de les comparer est de compter le nombre de voxels finalement retenus comme faisant partie du matériau PCW. La différence entre les nombres de voxels PCW obtenus par l'une ou l'autre des méthodes est typiquement inférieure à 1% du nombre total de voxel, sans que des différences systématiques, au niveau de tel ou tel détail anatomique ne puisse être repérée à l'œil nu.

3.1.2.iii Détermination automatique du seuil dans le cas d'une binarisation simple

Il existe plusieurs techniques pour déterminer automatiquement un seuil de binarisation. Par exemple la méthode d'Otsu qui permet de calculer le seuil optimal qui sépare ces deux classes afin que leur variance intra-classe soit minimale. Pour l'image utilisée sur la Figure 38, la méthode d'Otsu (en utilisant la commande *graythresh* de Matlab) donne une valeur de 11565, qui n'est pas satisfaisante et éloignée de la valeur déterminée (10400) par un examen attentif à l'œil nu des images binarisées à différents seuils et de la Figure 32. Nous pensons que ce mauvais résultat de la méthode d'Otsu est dû au faible contraste entre les deux matériaux présents sur nos images, l'air et les parois cellulaires.

On peut imaginer plusieurs autres manières de procéder, en se basant sur ce que l'on observe à l'œil nu. Le bruit qui se manifeste quand le seuil est trop bas prend la forme de taches blanches qui envahissent toute l'image quand le seuil décroît. On peut par exemple tracer le nombre de taches en fonction du seuil. Puis fixer nombre de taches maximal à ne pas

dépasser. Là encore, il y a donc un choix arbitraire à faire. Au final, faire confiance à l'œil nu semble tout à fait raisonnable.

3.1.3. Ajustement des histogrammes (*histogram matching*)

Comme vu en 2.1.2, tous les scans 3D ont été réalisés avec les mêmes réglages du tomographe (tension et intensité notamment) menant à des distributions de niveaux de gris similaires sur les radiographies 2D d'un scan à l'autre. Cependant, des différences notables de distribution de niveaux de gris sont observées d'un échantillon à l'autre quand on considère les coupes tomographiques issues de la reconstruction 3D (que cela soit avant ou après l'opération NLMF, qui modifie la distribution des niveaux de gris). Certes, ces distributions ont toutes une forme similaire mais leur largeur (c'est-à-dire la largeur de la gamme de niveaux de gris) et leur valeur moyenne diffèrent d'un échantillon à l'autre.

Ces différences sont très certainement dues à l'algorithme de reconstruction 3D utilisé (fourni avec le tomographe par le fabricant Phoenix) et à la manière dont celui-ci gère la correction des pixels morts (à l'origine des artefacts de type anneaux -*ring artefacts correction*-). Mais la boîte noire qu'est ce logiciel ne nous permet pas d'en savoir plus. Quoiqu'il en soit nous avons cherché une méthode pour corriger les distributions de niveau de gris, afin de les rendre similaires pour tous les échantillons, ce qui va faciliter l'exploitation des résultats.

Pour ce faire, nous avons utilisé la commande Matlab *imhistmatch* (de la Toolbox *Image Processing*), qui permet de faire correspondre toutes les distributions sur une distribution type (choisie arbitrairement). Comme globalement toutes les distributions se ressemblent et que la dégradation enzymatique a un faible effet sur celles-ci (car très localisée comme on le verra dans le Chapitre suivant), nous avons fait l'hypothèse que cette opération n'induit pas de biais sur les analyses quantitatives effectuées, qui sont détaillées plus loin.

L'effet principal de cette opération est de déplacer une distribution dans la gamme de niveaux de gris et de modifier sa largeur (en l'occurrence la diminuer, vu que la distribution de référence a été choisie parmi les coupes tomographiques d'un échantillon pour lequel la dynamique du signal -la largeur de la distribution- était la plus faible). L'impact de la faible déformation de la distribution induite par le procédé est donc négligé.

Pour illustrer le procédé d'ajustement, la Figure 39.a montre deux distributions obtenues en considérant tous les voxels de deux coupes tomographiques (avant et après digestion).

Comme mentionné ci-dessus, les distributions initiales sont similaires, mais avec une largeur et une valeur moyenne différente. Il est important de noter que la principale population de voxels (le pic de la distribution) correspond aux voxels sombres, représentatifs du matériau air. Les voxels donnant des informations sur les parois cellulaires (et donc qui nous intéressent tout particulièrement) sont moins nombreux et se trouvent dans la queue droite de la distribution. On remarque qu'il n'y a pas de séparation nette dans les gammes de niveaux de gris couvertes par ces deux matériaux, d'où une segmentation non immédiate, comme discuté précédemment.

Les distributions obtenues après la procédure d'ajustement sont parfaitement superposées avec la distribution de référence (en bleue sur la Figure 39). On montre aussi sur la Figure 39.b un détail de coupes tomographiques, avant et après la procédure. Un examen attentif à l'œil nu de ces images révèle qu'il ne semble pas y avoir de biais induit par ce traitement. Par exemple, on n'observe pas de modifications significatives du niveau de gris pour certains voxels, qui les feraient passer du matériau air au matériau parois cellulaires.

Chaque jeu de coupes tomographiques (obtenu en scannant un échantillon donné) est traité par ajustement d'histogramme, en utilisant une unique coupe de référence. Une fois l'opération effectuée, toutes les images ajustées (qu'on les visualise sous forme de coupes tomographies ou de rendus volumiques) peuvent être comparés directement, en termes de valeur de niveaux de gris. Notamment, le seuil utilisé permettant de séparer air et parois végétales devient le même pour tous les échantillons (en l'occurrence il s'agit de la valeur 10400 discuté précédemment, les images utilisées pour sa détermination ayant été choisies parmi les images du scan de référence).

Pour tester l'impact de ce traitement sur les indicateurs quantitatifs qui seront extraits des images, il est possible d'étudier l'effet du choix de l'image de référence, en faisant varier celle-ci (en la choisissant parmi tel ou tel jeu de coupes tomographiques, même issu d'un scan obtenu sur un échantillon dégradé). Typiquement, les indicateurs de dégradation qui seront introduits et calculés au Chapitre suivant varient peu quand l'image de référence est changée. L'effet d'une variation du seuil de segmentation est bien plus marqué et c'est la source d'erreur principale, nous y reviendrons.

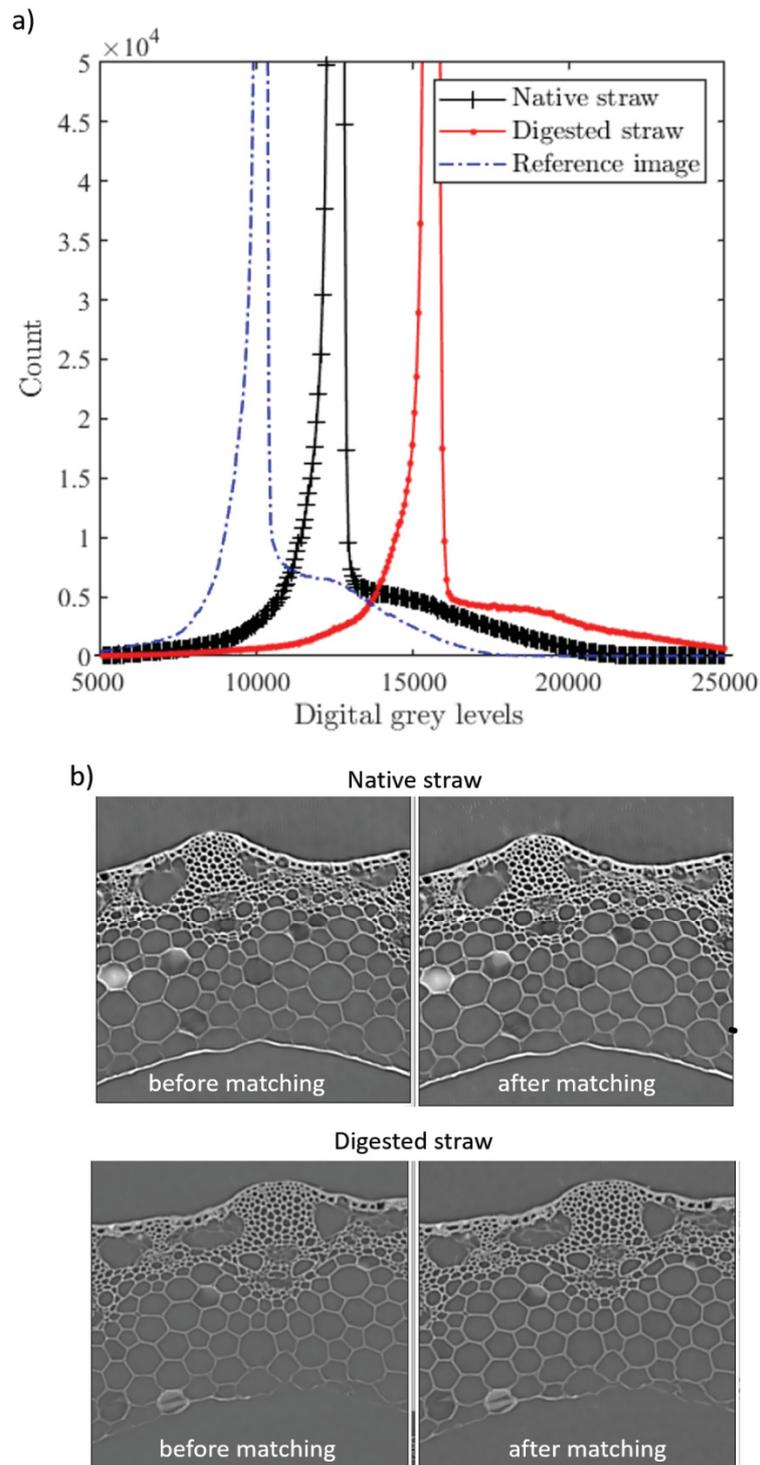


Figure 39: Illustration et impact de l'ajustement des histogrammes (histogram matching). a) Trois histogrammes de la distribution des niveaux de gris pour trois coupes tomographiques. L'histogramme de référence est le bleu. b) Détails des coupes tomographiques pour un échantillon natif (en haut) et un échantillon digéré (en bas) ; avant la correspondance des histogrammes (à gauche, voir les histogrammes noir et rouge sur a) et après la correspondance des histogrammes (à droite, voir l'histogramme bleu dans les deux cas).

3.2. Exploitation des images : rendus volumiques 3D avec Avizo®

3.2.1. Rendu volumique 3D

Dans cette partie, nous allons expliquer comment passer d'une visualisation de coupes en 2D à une visualisation d'un objet 3D. Pour ce faire nous avons décidé d'utiliser le logiciel Avizo®, déjà utilisé pour l'opération de débruitage par NLMF. Avizo® est une application logicielle développée par Thermo Fisher Scientific®. Elle permet de faire des calculs et d'effectuer une visualisation interactive d'un ensemble de données 3D que l'on appelle rendu volumique. La Figure 40 illustre une arborescence classique que l'on peut retrouver sous le logiciel Avizo®.

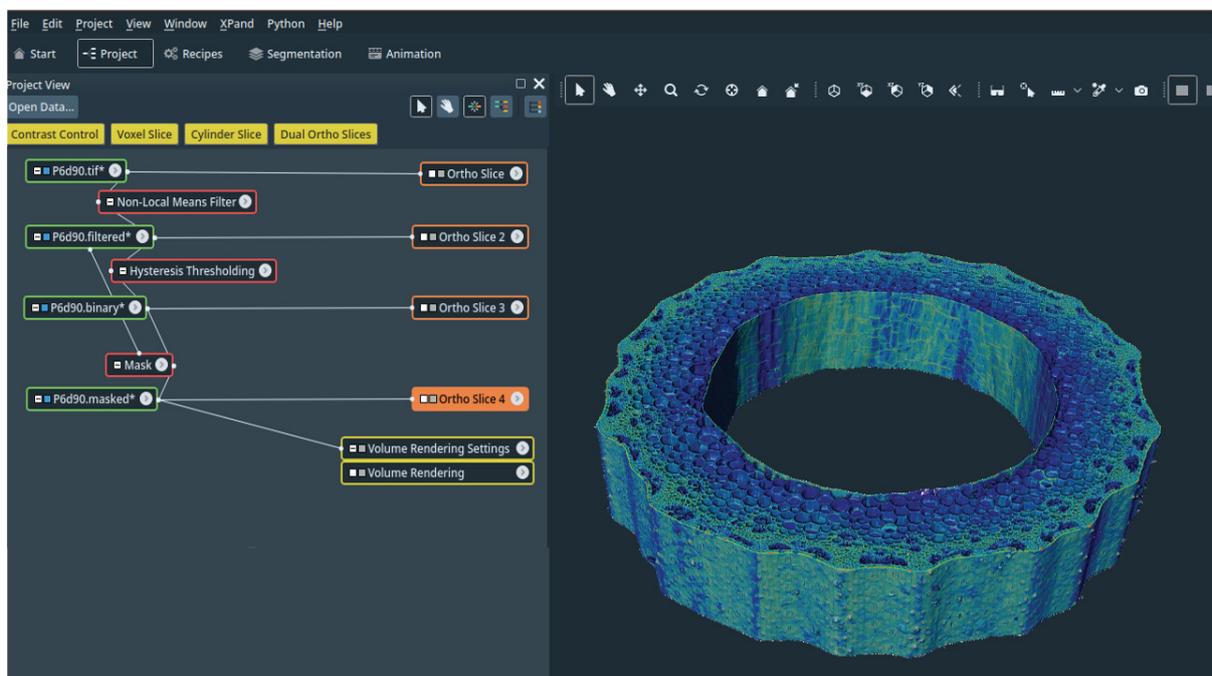


Figure 40 : Capture d'écran sous Avizo, illustrant la structure en arborescence à gauche, représentant la succession d'opérations de traitement effectuées et l'image correspondante à droite. Au niveau de l'arborescence, les rectangles verts correspondent aux données, les rectangles rouges représentent les actions (filtres, segmentation, masque) effectuées sur les données, les rectangles oranges sont les visualisations en coupe (2D) et les rectangles jaunes sont les visualisations en 3D.

Pour passer d'une visualisation 2D des coupes tomographiques à une visualisation 3D du volume reconstruit nous effectuons deux étapes que nous allons discuter : 1) l'extraction des informations à reconstruire en 3D par application d'un masque ; 2) le rendu volumique 3D en lui-même.

3.2.1.i Application d'un masque

Dans la partie 3.1.2, nous avons discuté de la segmentation/binarisation des images qui nous permet d'obtenir une image binarisée. Cette image va nous servir de masque pour extraire les informations sur la paille de blé tout en conservant la dynamique des niveaux de gris présents dans la structure. La fonction masque, sous Avizo®, superpose les images binarisées (le masque) et les images en niveaux de gris. Les voxels appartenant à la fois au masque et aux images en niveaux de gris sont conservés, avec leur niveau de gris, les autres sont mis à zéro. Cette opération permet en quelque sorte de supprimer tout l'arrière-plan (le matériau air).

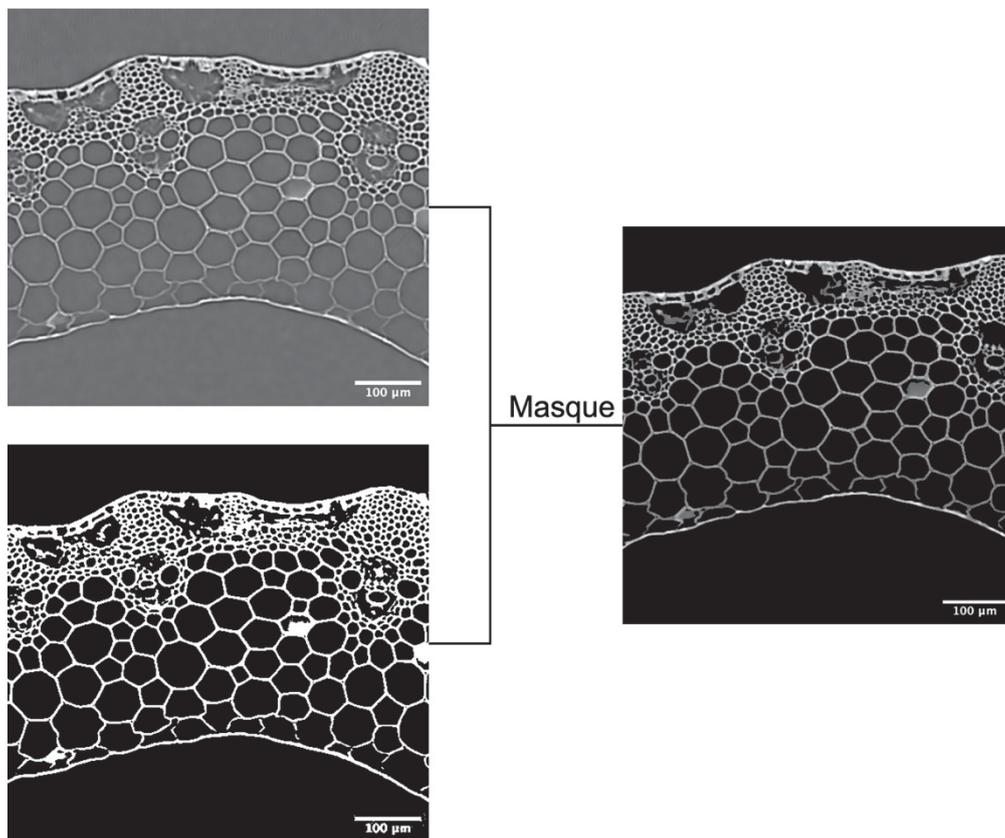


Figure 41 : Schéma illustrant l'action de la fonction masque sous Avizo® sur un zoom de coupe tomographique de paille de blé.

Comme on peut le remarquer sur la Figure 41 une fois le masque appliqué, le fond est noir mais la structure de la paille de blé conserve ses différents niveaux de gris. Bien que cette opération ressemble à une opération de segmentation, ce n'en n'est pas une *stricto sensu*. Car la segmentation est une opération qui consiste à rassembler des pixels (ou voxels) suivant

des critères pour former une ou plusieurs régions uniformes sur l'image finale [122]. Dans notre cas nous excluons uniquement le fond de l'image pour faciliter les opérations à venir tout en conservant tous les niveaux de gris de la structure.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons commencé par une segmentation classique de nos données. Mais nous nous sommes très vite rendu compte qu'une partie importante des informations résidait dans la dynamique des niveaux de gris et la manière dont cette dernière était modifiée par la digestion enzymatique. Il est donc crucial de conserver cette information.

3.2.1.ii Rendu volumique 3D

Une fois nos données masquées, nous pouvons passer au rendu volumique 3D. Pour ce faire nous avons utilisé l'outil de rendu volumique d'Avizo® qui est un outil de visualisation permettant la représentation 3D d'un objet. Afin d'obtenir une visualisation nous permettant d'interpréter au mieux nos données, nous avons décidé d'avoir un rendu opaque pour les parois en réglant l'opacité à 100 %. Cela permet de visionner uniquement les nuances de niveaux de gris sur les parois végétales sur le premier plan visualisé, selon l'angle de vue choisi. Pour faciliter la perception des différents niveaux gris, nous avons décidé d'utiliser une carte des couleurs nous permettant une meilleure différenciation.

Une fois cette procédure mise au point, une image 3D peut être obtenue, en utilisant les coupes tomographiques complètes ou bien des régions d'intérêt sélectionnées sous Avizo®. La Figure 42 montre de tels rendus volumiques, à l'échelle de la paille dans toute sa largeur et sur une région d'intérêt. La Figure 43 reprend la région d'intérêt visualisée sur la Figure 42.b, en faisant varier l'angle de vue. Ces images 3D seront commentées dans le Chapitre suivant.

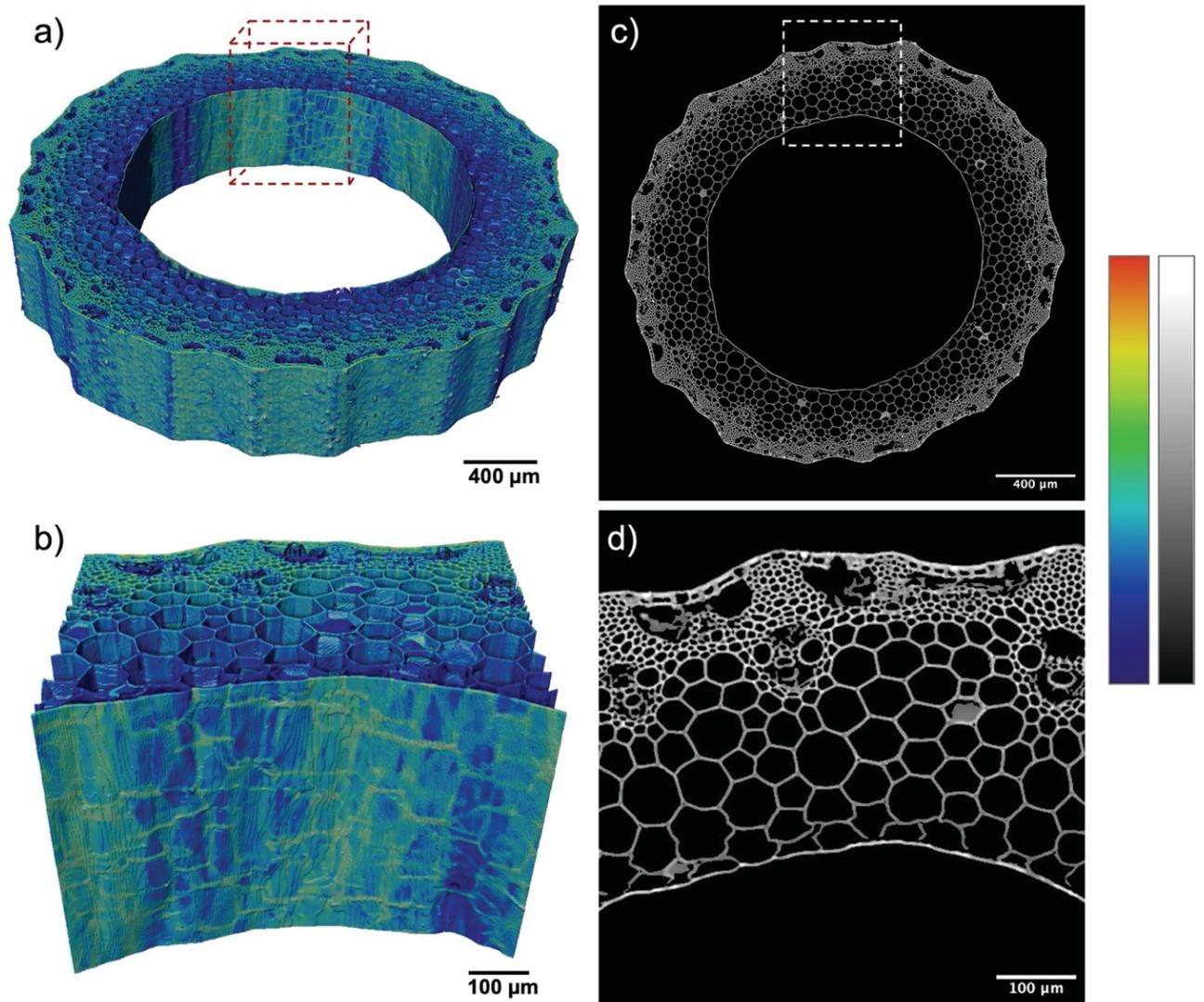


Figure 42 : Images μ CT de la paille de blé native. a) Rendu volumique 3D (pour des raisons de clarté, seul un tiers du volume complet reconstruit est montré). b) Gros plan 3D (la face avant dans la paroi intérieure de la paille, voir le carré rouge pointillé en a). c) Coupe transversale tomographique (prise au milieu du volume 3D montré en a). d) Gros plan de la coupe transversale sur le carré blanc pointillé montré en c). La correspondance entre les niveaux de gris des images 2D et la carte des couleurs des volumes 3D est donnée à droite.

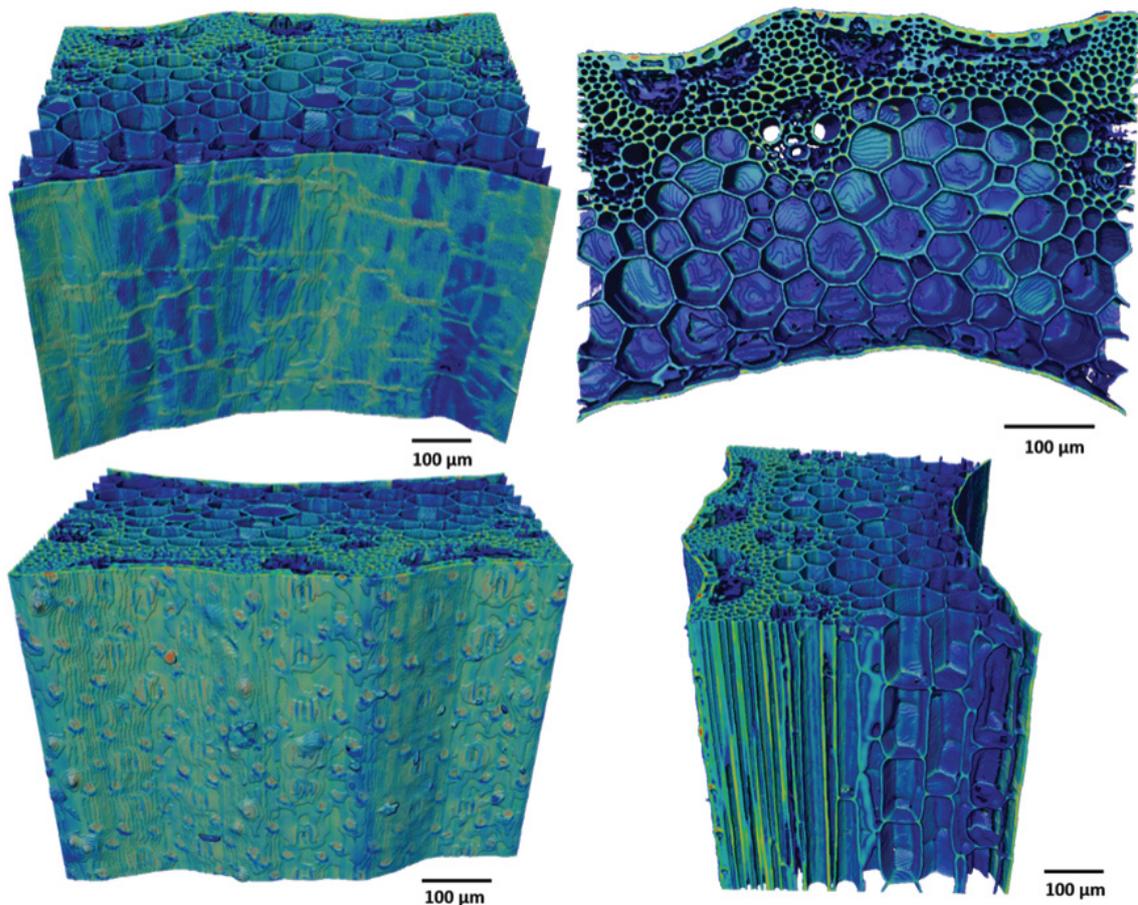


Figure 43 : Exemple de rendus volumique d'un sous volume de paille de blé (celui présenté sur La Figure 23.b), en faisant varier l'angle de vue.

3.3. Exploitation des images : analyse avec Matlab

Matlab, à travers la ToolBox Image Processing, dispose d'outils de traitements d'images similaires à ceux que l'on peut trouver sur Avizo®. Pour certaines opérations, l'ergonomie d'Avizo® est supérieure, ainsi que la puissance de la station de calcul sous laquelle le logiciel tourne, ce qui facilite notamment les visualisations 3D en direct, de manière dynamique et interactive, d'où le choix de ce logiciel pour les rendus volumiques (et les opérations de NLMF). Par contre, le logiciel Matlab a été utilisé pour extraire des données quantitatives des empilements de coupes tomographiques obtenus suite aux différentes opérations de traitement d'images détaillées précédemment. La succession de commandes effectuées est codée sous forme de scripts.

Nous allons tous d'abord préciser les opérations effectuées pour pouvoir comparer différents jeux de coupes, obtenus sur différents échantillons, notamment les images issues d'un même échantillon, avant et après traitement enzymatique. Ensuite, nous présenterons la manière dont des marqueurs de la dégradation ont été extraits des images. Enfin, nous expliquerons comment on peut réaliser des cartes 2D sur la surface intérieure de la paille.

3.3.1. Ajustement spatial des images 3D, avant et après traitement enzymatique

Afin de pouvoir analyser l'effet du traitement enzymatique, il est nécessaire de pouvoir se positionner au même endroit dans un échantillon donné, sur le scan initial et celui obtenu après attaque enzymatique. La procédure d'ajustement spatial, ou recalage, est détaillée ici. Il s'agit d'ajuster les images en z et θ , où z est la position selon la direction longitudinale (celle de l'axe de la paille de blé) et θ la position angulaire.

En guise de remarque préliminaire, il faut mentionner que nous avons pris soin de scanner à peu près la même partie d'un échantillon donné, avant et après la digestion. L'orientation 'haut/bas' d'un échantillon donné est conservée du premier (natif) au second (digéré) scan. Une fois dans le scanner, nous utilisons l'extrémité supérieure de l'échantillon comme référence et centrons généralement l'échantillon 4 mm en dessous du sommet. On s'attend donc à retrouver les mêmes régions de l'échantillon dans les coupes tomographiques obtenues avant et après traitement enzymatique.

3.3.1.i Recalage en z

Le décalage exact en z est déterminé manuellement en faisant défiler sous le logiciel ImageJ la pile de coupes transverses. Des motifs typiques formés par les parois cellulaires dans le plan tomographique transversal sont détectés sur les deux séries d'images (voir la Figure 44 à titre d'illustration). Le décalage en z peut varier légèrement en fonction de l'emplacement angulaire et de la position le long de la pile. La moyenne est calculée sur 10 valeurs.

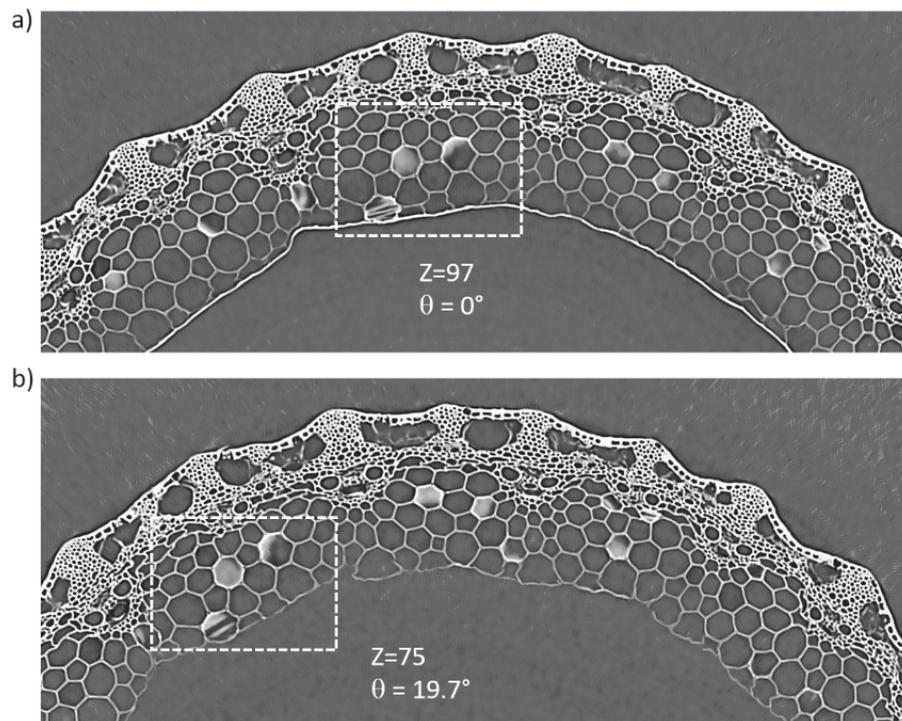


Figure 44: Recalage spatial (dans la direction longitudinale z) entre deux images d'un même échantillon, avant et après digestion. a) Un motif distinctif formé par trois parois cellulaires végétales dans le plan tomographique plan est repéré sur la coupe 97 au sein de la pile de coupes tomographiques correspondant à l'échantillon natif (mis en évidence par le rectangle blanc pointillé). b) Le même motif est retrouvé sur la coupe 75, au sein de la pile obtenue après attaque enzymatique, avec un décalage angulaire de 19,7° par rapport à la tranche initiale.

3.3.1.ii Recalage en θ

Le décalage angulaire entre les deux scans est déterminé en extrayant le contour externe de la paille de blé, à un z donné, pour les échantillons natifs et digérés. Un exemple type est montré sur la Figure 45.a. Le rayon est mesuré par rapport au centre de masse du matériau. Celui-ci vaut en moyenne 840 voxels environ, avec des variations (+/- 20 voxels en ordre de grandeur) résultant de la rugosité de la surface extérieure de l'échantillon. On retrouve des variations identiques pour les 2 coupes considérées mais décalées. Ensuite, on calcule un coefficient de corrélation entre ces deux courbes, en les décalant pas à pas angulairement (Figure 45.b). Le maximum de corrélation, ici obtenu pour 202°, donne l'angle de rotation permettant le recalage. Une fois recalés, les deux contours extérieurs coïncident presque parfaitement. Cette opération peut être répétée le long de différents z (typiquement le bas,

le milieu et le haut de la pile) mais cela conduit généralement à des valeurs de décalage angulaire très proches (moins de 0,1 degré de différence).

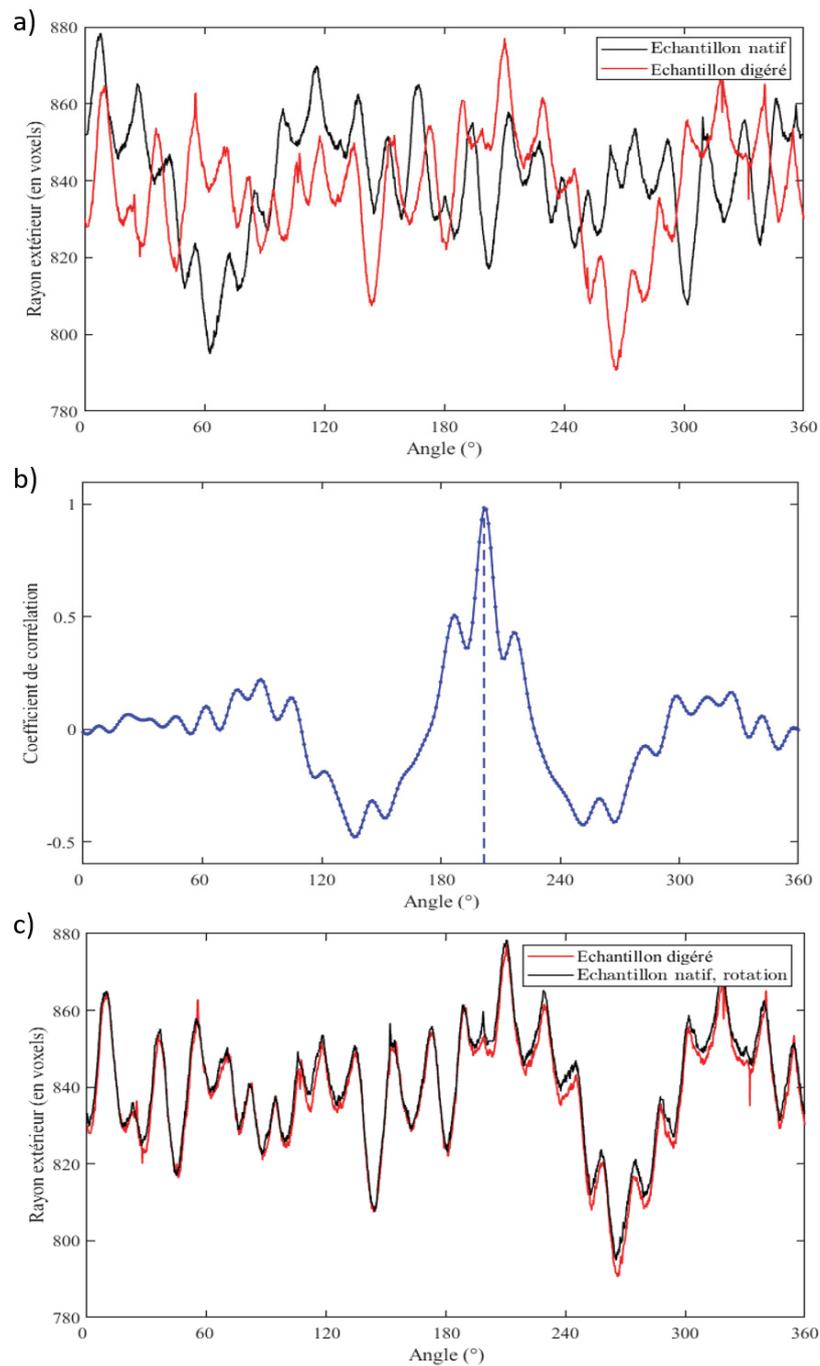


Figure 45 Recalage angulaire entre deux images d'un même échantillon, avant et après digestion: Contours extérieurs et recalage angulaire. a) Contours extérieurs (rayon extérieur en fonction de la position angulaire) à un z donné, pour deux coupes tomographiques issues de l'échantillon natif (en noir) et de l'échantillon digéré (en rouge). b) Coefficient de corrélation entre les deux contours en fonction du décalage angulaire. c) Contours extérieurs : comparaison après recalage angulaire avec un angle correspondant au maximum de corrélation.

3.3.1.iii Limites de l'ajustement spatial

Malgré cet ajustement, certaines différences locales (par exemple dans la forme des cellules) peuvent être remarquées en regardant le même endroit avant et après la digestion. Elles pourraient être attribuées aux diverses sollicitations mécaniques de l'échantillon au cours du protocole (imbibition/séchage, positionnement dans le tube capillaire pour la numérisation) et éventuellement à la libération des contraintes mécaniques internes induites par la modification de l'architecture des parois cellulaires végétales causée par l'attaque enzymatique. Typiquement, on peut observer à certains endroits un léger (c'est-à-dire quelques voxels d'amplitude) rétrécissement ou une dilatation des cellules proches de la paroi interne de la paille (Pith Cavity Lining -PCL-), comme le montre la Figure 46. Malgré l'aspect très localisé de ces différences, c'est un point qui compliquera singulièrement notre exploitation des images comme on le verra prochainement.

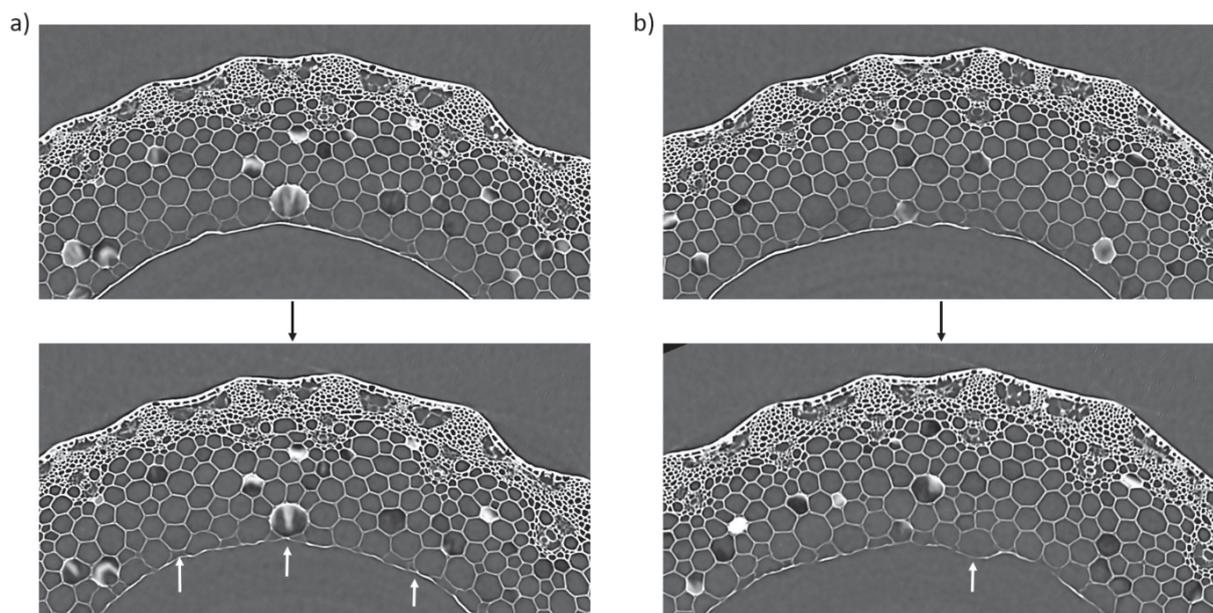


Figure 46: Déformations localisées de l'échantillon, entre image native et image digérée, à un même endroit (suite au recalage spatial). Exemple de rétraction (a) ou de dilatation (b) locale des cellules proches du PCL après une attaque enzymatique (images du bas, celles du haut sont des échantillons natifs). Les flèches blanches indiquent les régions d'intérêt. Ici, la durée de l'attaque enzymatique est de 30 minutes.

3.3.2. Positionnement de régions d'intérêt

On verra dans le Chapitre suivant qu'une analyse statistique est utilisée pour étudier la localisation et l'effet de l'attaque enzymatique sur nos échantillons. Celle-ci consiste en des mesures effectuées sur un ensemble de régions d'intérêt (ROI) 3D (des petites boîtes parallélépipédiques) localisées de manière aléatoire dans l'image 3D. Plus précisément, on introduit plusieurs familles de ROIs, et au sein de chaque famille, les ROIs sont positionnés de la même manière par rapport à des structures anatomiques caractéristiques de la paille de blé.

Nous détaillons donc ici comment est obtenu l'ensemble des ROIs utilisés pour l'analyse statistique. Tout d'abord, un ensemble de 1000 valeurs pour le couple de coordonnées (z, θ) est tiré au sort. Pour ne considérer que des ROIs ne se recouvrant pas, une distance minimale (40 voxels) est imposée entre les centres de masse de chaque ROI. Pour cette étape, le centre de masse de chaque ROI est donné par la valeur de z tirée au sort et une valeur de r (position radiale par rapport au centre de masse) typique, prise comme le rayon interne de l'échantillon considéré. Ensuite, les calculs basés sur les ROIs, qui constituent le cœur de l'analyse statistique présentée dans le Chapitre 3, sont généralement effectués comme suit :

- Chaque ROI est considéré successivement. La tranche tomographique correspondant à la position z du ROI subit une rotation de l'angle θ . Un profil d'intensité, du centre de masse de l'échantillon au bord extérieur de l'image (c'est-à-dire le long de la direction verticale de l'image, puisque l'image a été tournée) est extrait. Les emplacements du PCL et de l'épiderme sont respectivement donnés par la position le long de ce profil d'intensité du premier et du dernier voxels appartenant au matériau PCW (ils sont mis en évidence par des croix rouges sur la Figure 47.a).
- Les ROI sont positionnées de manière à se trouver en travers du PCL (rectangle rouge dans la Figure 47.b, avec une étendue de 5 voxels x 31 voxels), en travers de l'épiderme (rectangle bleu, 5 voxels x 31 voxels) ou à être centrés à 100 voxels du PCL (rectangle vert, 51 voxels x 51 voxels).
- Les voxels appartenant aux ROIs sont extraits numériquement de l'image 3D. Comme l'étendue verticale (c'est-à-dire dans la direction z , perpendiculaire au plan tomographique représenté sur la Figure 47) de chaque ROI est de 5 voxels, cette opération est effectuée pour 5 coupes (avec des emplacements dans la plage $[z-2 \ z+2]$). Ainsi, tous les voxels appartenant

à des ROIs ayant la même localisation sont regroupés et leurs distributions de niveau de gris et/ou valeurs moyennes peuvent être calculées.

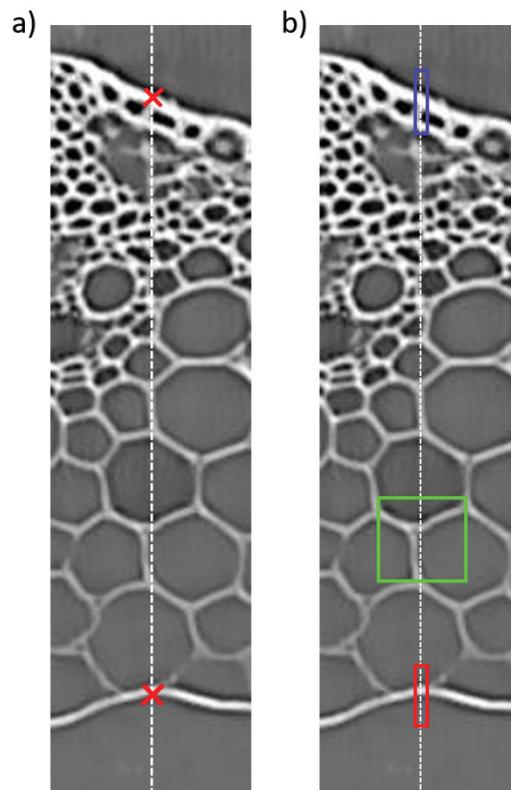


Figure 47 : Détection du PCL et de l'épiderme et localisation des ROIs. a) Profil d'intensité (ligne pointillée blanche) et positions de la paroi interne (PCL) et externe (épiderme) de la paille (croix rouges). b) Positionnement des différentes ROIs.

Une telle méthode présente une difficulté majeure. La détection automatique de l'emplacement du PCL est simple pour l'échantillon natif, car les voxels appartenant au PCL sont plus clairs et ressortent nettement sur l'image. Elle peut devenir délicate pour les échantillons digérés car, comme cela sera mis en évidence au Chapitre suivant, les voxels PCL s'estompent et disparaissent même complètement pour les plus longues durées de l'attaque enzymatique. Dans ce dernier cas, le premier voxel PCW trouvé le long du profil peut donc appartenir à une paroi cellulaire du parenchyme, la région anatomique comprise à l'intérieur de la paille, juste au-delà du PCL. Ceci est illustré sur la Figure 48. La détection du PCL ne pose pas de problème sur l'échantillon natif (Figure 48.a) alors qu'elle est clairement erronée sur l'échantillon une fois digéré (Figure 48.b). En effet, le PCL a disparu dans ce cas ! L'algorithme de détection trouve donc à la place la paroi d'une des cellules internes (voir les croix rouges sur la Figure 48). Pour faire face à de tels cas, le schéma de correction suivant est appliqué :

l'emplacement du PCL à un endroit donné sur un échantillon digéré est alors considéré comme l'emplacement du PCL mesuré au même endroit pour l'échantillon natif. Concrètement, on reporte la distance entre le centre de masse de l'image et le premier voxel appartenant au matériau PCW mesurée sur l'échantillon natif sur l'image digérée. A titre d'exemple, cela aboutit à la position repérée par une croix blanche sur la Figure 48.b.

Les résultats obtenus avec cette correction diffèrent significativement de ceux obtenus sans, en particulier pour les longues durées d'attaque enzymatique, lorsque des disparitions locales du PCL sont observées (Cf. Chapitre 3). Pour les plus courtes durées d'attaque enzymatique, la correction ne conduit pas à des différences significatives. Notez que l'emplacement du PCL trouvé sur un échantillon digéré (à un endroit où le PCL est encore clairement détectable) peut légèrement différer de l'emplacement trouvé sur l'échantillon natif (pour une ROI donnée), en raison du déplacement du PCL provoqué par le rétrécissement/dilatation discuté ci-dessus. Cependant, comme la largeur du ROI dans la direction radiale (31 voxels) est supérieure à l'ampleur typique en voxels du retrait/dilatation qui peut être observé, la distribution des niveaux de gris pour le matériau PCW extraite de la ROI en question sera la même, avec ou sans correction.

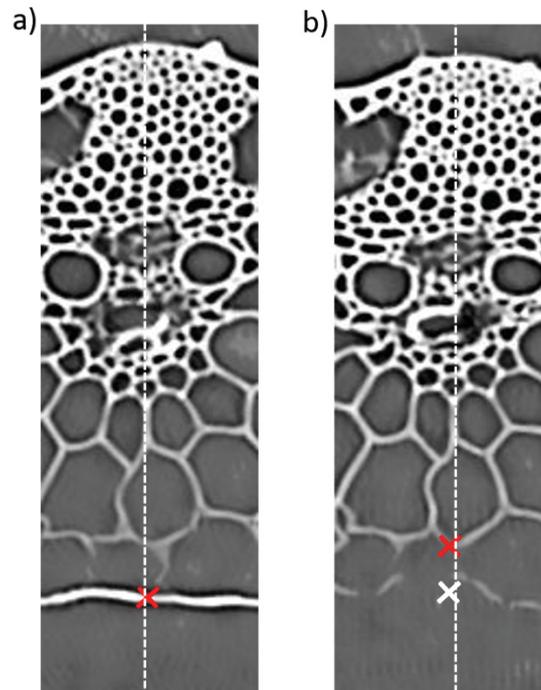


Figure 48 : Correction sur la détection du PCL lorsque l'échantillon est dégradé. a) Détection et position du PCL pour un échantillon natif (avant digestion) : croix rouge. b) Détection et position du PCL pour un échantillon dégradé avant (croix blanche) et après (croix rouge) correction.

3.3.3. Données extraites des ROIs - Marqueurs de dégradation

Comme mentionné ci-dessus, les données utilisées pour l'analyse statistique (statistique car utilisant un grand nombre de ROIs, 1000, répartie aléatoirement dans l'échantillon, pour un type de ROIs donné) sont l'ensemble des voxels présents dans l'ensemble des ROIs de même localisation. Si on se concentre sur les voxels appartenant au matériau PCW au sein de ces ROIs, on verra dans le Chapitre suivant comment leurs distributions de niveau de gris, leur valeur moyenne et leur nombre peuvent être utilisés comme des marqueurs de la dégradation.

On peut revenir à ce stade sur la discussion précédente concernant le seuil de binarisation, c'est-à-dire le seuil en niveau de gris au-delà de laquelle un voxel est considéré comme appartenant au matériau PCW. La discussion et la conclusion de la partie 3.1.2 ci-dessus concernant le choix du seuil de binarisation ne s'appliquent pas seulement lorsque l'on considère le détail d'une coupe tomographique mais aussi lorsque l'on restreint l'analyse aux voxels prélevés dans les ROIs définis pour l'analyse statistique. Et la procédure d'ajustement

des histogrammes présentée au §3.1.3 permet de considérer un seuil unique pour toutes les données. On verra dans le Chapitre suivant comment l'incertitude sur le choix du seuil (10400 +/- 100 niveaux de gris) se propage en incertitudes sur les marqueurs extraits des ROIs.

3.3.4. Des coupes tomographiques à des cartographies 2D du PCL de la paille de blé

Nous présentons ici la façon dont on peut extraire de manière synthétique, sous forme d'image, une information concernant la surface interne de la paille (le PCL), qui sera au centre de notre attention dans le Chapitre suivant. On parlera de « cartographies » du PCL, qui s'obtiennent à l'aide d'opérations basées sur l'utilisation de ROIs, du même type que celles présentées ci-dessus. Ces cartographies 2D sont obtenues en quelque sorte en déroulant l'échantillon de paille de blé et en observant sa surface intérieure.

La principale différence entre les opérations basées sur les ROIs pour l'analyse statistique et celles utilisées pour obtenir une cartographie du PCL de la paille de blé réside dans la distribution spatiale des ROIs. Dans ce dernier cas, les ROIs sont localisés de manière à paver approximativement la surface interne. Chaque ROI a la même étendue verticale (direction z), latérale (direction θ) et la même profondeur (direction radiale). Pour un z donné, la tranche tomographique est tournée de 360 degrés par pas de $\Delta\theta$. La valeur du pas angulaire ($\Delta\theta = 0.5^\circ$) est obtenue à partir d'une estimation du périmètre interne de l'échantillon divisé par l'étendue latérale des ROIs (5 voxels). Ensuite, comme expliqué au §3.3.1.ii, la position radiale du PCL est automatiquement détectée et les voxels appartenant à la ROI sont extraits numériquement de l'image 3D (c'est-à-dire sur les tranches dont l'emplacement est compris dans l'intervalle $[z-2 \ z+2]$, l'étendue verticale étant considérée comme étant de 5 voxels). La profondeur des ROIs est un paramètre clé : elle est prise égale à 4 voxels seulement afin que les ROIs contiennent uniquement des voxels appartenant au PCL (dont l'épaisseur est de quelques voxels). Sur les images 2D, la valeur de chaque voxel est obtenue en calculant la valeur moyenne des niveaux de gris des voxels appartenant au ROI correspondant. Il est à noter que cette opération de pavage n'est pas parfaite car la paroi interne n'est pas parfaitement circulaire et présente quelques ondulations comme on peut le voir, par exemple, sur les coupes tomographiques présentées plus tôt dans ce Chapitre, par exemple sur la Figure 42.c. Mais on obtient néanmoins des images 2D où des hétérogénéités similaires

peuvent être identifiées à des endroits similaires sur les échantillons natifs et digérés. Cette opération peut être réalisée pour les échantillons dont les durées d'attaque enzymatique sont les plus courtes (30 et 45 minutes) et pour lesquels le PCL est encore détectable. A ce stade, on se contentera de montrer sur la Figure 49 un exemple de cartographie, pour un échantillon natif et on reviendra sur l'analyse de telles images dans le Chapitre suivant.

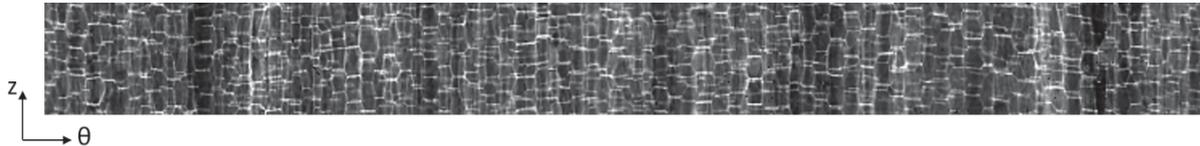


Figure 49 : Exemple de cartographie 2D du PCL pour un échantillon natif. Un tiers de la pile complète de coupes tomographiques transverse a été utilisée pour cette image. Cette cartographie donne une vue de la surface interne de la paille, comme si celle-ci avait été déroulée. Ainsi, deux coordonnées sont pertinentes pour se repérer sur de telles images : la direction z longitudinale et la position radiale repérée par un angle polaire θ variant entre 0 et 2π .

3.4. Conclusions

Le traitement des images tomographiques et la mise en place d'outils d'exploitation/visualisation a présenté une part importante de notre travail. Les résultats méthodologiques présentés dans ce Chapitre en présente une version concise, en en présentant les points les plus importants, sans détailler les fausses pistes qui ont parfois été suivies. Nous sommes donc prêts à passer à la présentation de nos résultats.

Chapitre 4. Résultats et discussion

Ce chapitre présente tout d'abord une caractérisation de l'activité du cocktail enzymatique utilisé, dont on montre qu'il fonctionne sur nos échantillons. Puis, ce point crucial étant vérifié, nous présentons l'analyse qui est faite des images obtenues par tomographie X, en utilisant ponctuellement d'autres modalités d'imagerie.

Ces résultats font l'objet d'une publication soumise au journal *Bioresource Technology Reports*, intitulée *X-ray microtomography reveals the 3D enzymatic deconstruction pathway of raw lignocellulosic biomass*, en cours de révision au moment où ce manuscrit est rédigé.

4.1. Vérification de l'activité enzymatique

Comme expliqué auparavant, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail de thèse à la dégradation enzymatique de la paille de blé. Pour ce faire, nous devons nous assurer en premier lieu que le cocktail enzymatique (et donc les enzymes) utilisé était bien actif, condition nécessaire pour pouvoir affirmer que les effets de la dégradation imagés par tomographie à rayons X sont bien dus à ce dernier. Il faut noter que la bouteille de cocktail enzymatique Cellic HTEC2 utilisée au cours de cette thèse fait partie d'un lot produit en 2013, raison de plus pour s'assurer de son activité. C'est les résultats de cette vérification que nous allons présenter dans cette section.

4.1.1. Contrôle de la stabilité du cocktail enzymatique

Afin d'être certain que le cocktail enzymatique soit stable dans nos conditions expérimentales des tests ont été réalisés sur 24 h à 45° C. Pour cela, nous avons préparé 1 mL de solution enzymatique diluée au 1/50, comme précédemment décrit, et conservé à 45° C durant toute la durée de l'expérimentation. Trois suivis de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de paille de blé ont été réalisés par DNS comme décrit précédemment, sur une durée de une heure : un au moment de la préparation de la dilution enzymatique (points bleus sur la Figure 50),

puis à 6 h (points oranges) et à 24 h (points jaunes). Les différents aliquots de 100 μL ont été prélevés à 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 min puis dosés par DNS. Deux contrôles ont été réalisés en parallèle (à 6 h et 24 h, carrés violets et verts), en utilisant une dilution enzymatique fraîchement préparée.

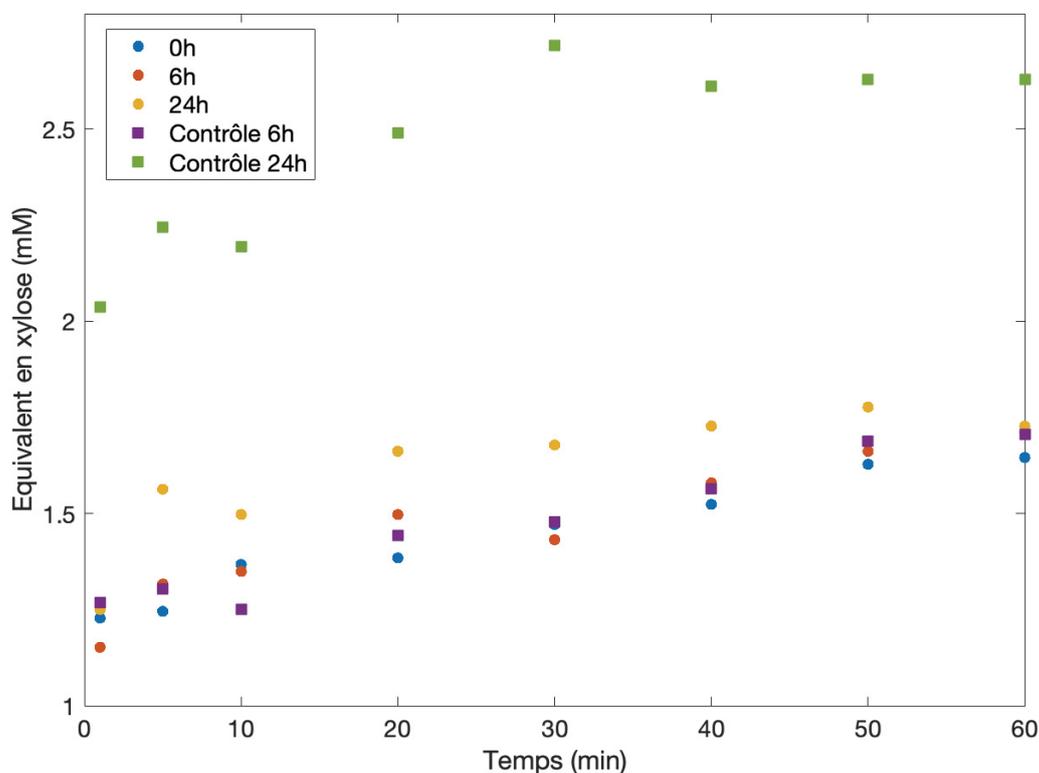


Figure 50 : Cinétique de la dégradation enzymatique de la paille de blé par un cocktail enzymatique (*Cellic HTEC2*) dilué à 1/500. Différents suivis cinétiques sur une heure sont effectués, en fonction de l'âge du cocktail (fraîchement préparé, agissant depuis 6h ou 24h). En bleu le suivi à 0h, en orange à 6h et en vert à 24h. Les triangles gris et violets représentent les contrôles.

Sur la Figure 50, on observe bien pour tous les échantillons une augmentation au cours du temps d'équivalent xylose relargué en solution. Les enzymes dégradent donc bien la paille de blé, quel que soit l'âge du cocktail, même quand celui-ci est resté 24h à 45° C. Les cinétiques sont comparables (les pentes sont similaires), les différences (principalement pour le dosage effectué à 24h avec une solution fraîchement préparée) pouvant être expliquées par la variabilité naturelle de nos échantillons, en terme de composition exacte (quantité de polymères) et de masse (il y a une dispersion de +/- 10% autour de la masse moyenne des échantillons, qui vaut 6 mg).

Le cocktail enzymatique est donc très stable au cours du temps, ce qui nous permet d'affirmer que l'échantillon P7, traité 72h mais avec un rafraîchissement de la solution enzymatique toutes les 24h, a sans doute été digéré au maximum des possibilités du cocktail.

4.1.2. Suivi DNS sur les échantillons tomographiés

Un suivi par DNS a également été réalisé pour les échantillons ayant été imagé par tomographie (ceux listés dans le Tableau 1 du §2.2.4). Dans ce cas, nous avons prélevé en cours de digestion un petit volume du milieu réactionnel, afin d'effectuer le dosage des sucres réducteurs par DNS.

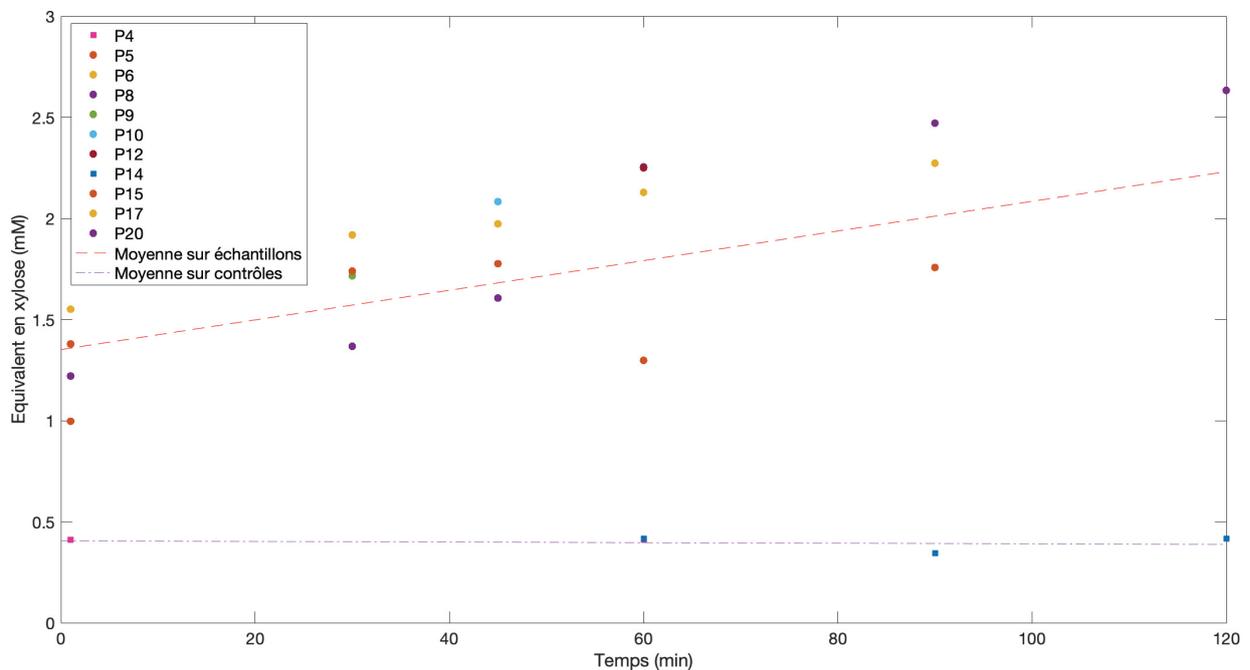


Figure 51 : Évolution de la concentration en sucre réducteur équivalent au xylose au cours du temps, mesurée par des essais DNS sur la paille de blé. Les points sont les échantillons ayant subi une digestion enzymatique avec en pointillés rouges la tendance sur la moyenne des échantillons. Les carrés sont les échantillons de contrôle avec en pointillés violets la tendance sur la moyenne des contrôles.

Sur la Figure 51, qui regroupe l'ensemble de ces résultats, l'augmentation en équivalent xylose relargué au cours du temps nous confirme que nos échantillons sont de plus en plus digérés. Là encore, la dispersion observée est sans doute causée par la variabilité naturelle des échantillons brut (en composition et masse exacte).

On peut aussi remarquer un décalage sur les courbes de la Figure 51. En effet, en début de réaction (à $t=0$), une certaine quantité de sucres réducteurs est déjà détectée en solution (entre 1 à 1.5 mM équivalent xylose). Pour discuter ce résultat, nous avons effectué un dosage DNS du cocktail seul, sans paille de blé. Notre hypothèse de départ était que ce décalage était dû à l'absorbance propre du cocktail à 540 nm, et non à la présence de sucres réducteurs.

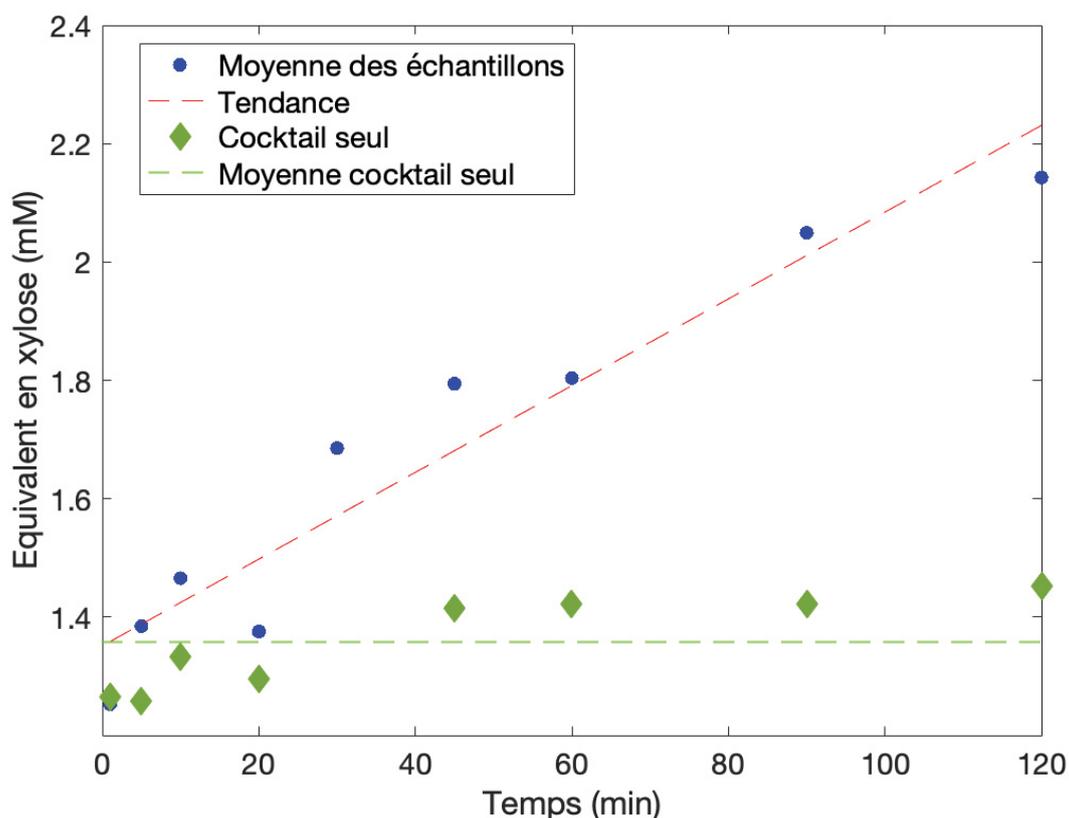


Figure 52: Évolution de la concentration moyenne en sucre réducteur équivalent au xylose au cours du temps, mesurée par des essais DNS sur la paille de blé (points bleus et tendance en pointillés rouges) et sur le cocktail seul, sans paille de blé (points verts et valeur moyenne en courbe pointillée verte).

Pour ce faire, nous avons utilisé le protocole décrit précédemment mais nous n'avons pas mis de paille de blé dans le tube. Les résultats sont exposés sur la Figure 52. On remarque que le dosage du cocktail seul au cours du temps donne une absorption constante (et donc un équivalent xylose constant aux alentours de 1.4mM) avec une valeur moyenne sur tous les points de mesure correspondant à l'ordonnée à l'origine des points obtenus avec échantillon. Nous pouvons donc en déduire que le décalage observé pour ces derniers est bien provoqué par l'absorbance propre au cocktail. Cette dernière peut donc être considérée comme un bruit de fond et être soustraite aux points de mesure avec échantillon, pour faciliter la lecture

4.1 Vérification de l'activité enzymatique

des résultats, ce qui est fait sur la Figure 53. Par ailleurs, sur cette Figure, est présenté la moyenne sur tous les échantillons utilisés sur la Figure 51, en utilisant la déviation standard comme barre d'erreur. De plus les résultats ont été rapportés en mM d'équivalent xylose/mg de paille afin de diminuer la dispersion de nos résultats due à la masse qui varie d'un brin de paille à un autre (10% de variabilité en masse).

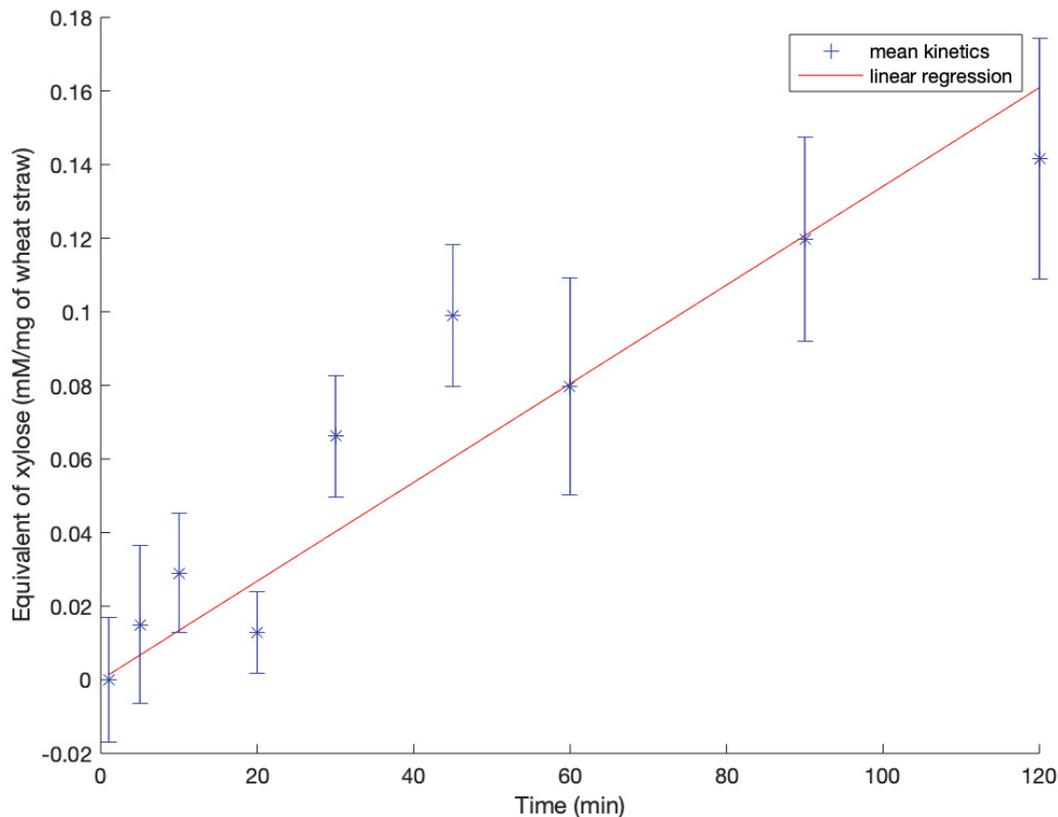


Figure 53 : Évolution de la concentration en sucre réducteur équivalent au xylose au cours du temps, mesurée par des essais DNS sur la paille de blé. Chaque point de données est la moyenne sur plusieurs échantillons, l'écart-type étant pris comme barre d'erreur.

Nous pouvons conclure que cette étude par DNS nous a permis de confirmer l'activité et la stabilité du cocktail enzymatique utilisé. De plus nous avons observé une augmentation de la quantité d'équivalents xylose libérés au cours de l'hydrolyse enzymatique. Cela nous indique que la paille de blé est de plus en plus dégradée au cours du temps et que les observations qui sont faites, en parallèle, au tomographe à rayons X pourront être corrélées à cette digestion enzymatique. Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus par tomographie à rayons X.

4.2. Résultats obtenus par tomographie à rayons X

Nous présentons dans les sections suivantes les résultats de l'analyse des images 3D obtenues par tomographie à rayons X. Les opérations de traitement d'images préliminaires et les développements d'outils d'analyse (sous Matlab) ont été présentés dans le Chapitre 1.

Dans un premier temps (§4.2.1), nous allons détailler les résultats obtenus sur la paille de blé brute. Il s'agit de revenir sur des aspects anatomiques connus, qui permettent de valider notre technique d'imagerie tout en faisant quelques observations peu documentées dans la littérature. Nous validerons certains de ces aspects en utilisant des techniques d'imagerie complémentaires.

Puis, dans la Section 4.3, nous étudierons les effets de la digestion enzymatique, d'un point de vue statistique avant d'examiner ceux-ci plus localement, en utilisant les échantillons les moins dégradés (en termes de durée d'hydrolyse), ce qui sera justifié ultérieurement. Enfin, nous concluons sur cette étude et donc sur cette première partie du manuscrit.

4.2.1. Paille de blé brute

4.2.1.i Anatomie de la paille de blé brute : éléments connus

La Figure 54 propose quatre vues d'un échantillon natif (avant traitement enzymatique) : un rendu volumique sur une hauteur de 300 coupes tomographiques (a), un détail zoomé de ce rendu (b), une coupe tomographique transverse (c) et une vue zoomée sur cette coupe (d). La Figure 55 présente un même rendu volumique, celui présenté sur la Figure 54.c, vu sous différents angles de vue. Pour une meilleure visualisation les rendus volumiques sur ces deux figures ont été colorés. La correspondance entre les couleurs sur les rendus volumiques et les niveaux de gris sur les coupes tomographiques est donnée à droite des images.

La paille a une structure tubulaire avec une surface interne grossièrement circulaire qui semble lisse à l'échelle spatiale résolue, soit environ le micron. La surface extérieure est plus accidentée et présente des ondulations d'environ 30 à 50 μm de hauteur qui peuvent être associées à un motif élémentaire radial de la structure qui se répète pour former l'anneau. Un gros plan 3D qui englobe ce motif est donné à la Figure 54.b. Une façon moins impressionnante mais plus pratique d'observer ces résultats est de se concentrer sur une

coupe transversale tomographique de l'échantillon (Figure 54.c et le gros plan correspondant dans la Figure 54.d).

Différents types de cellules sont présentes dans la structure, avec des tailles allant de 70 μm environ pour les cellules du parenchyme, près de la surface interne de la paille (*Pith Cavity Lining* -PCL-), à 10 μm environ pour des cellules près de la surface externe (l'épiderme de l'échantillon). Les Figure 54.d et Figure 55 ont été annotées, pour faire apparaître les principaux éléments anatomiques, bien décrits dans la littérature et détaillés dans le Chapitre 1 de ce manuscrit (§1.2.1).

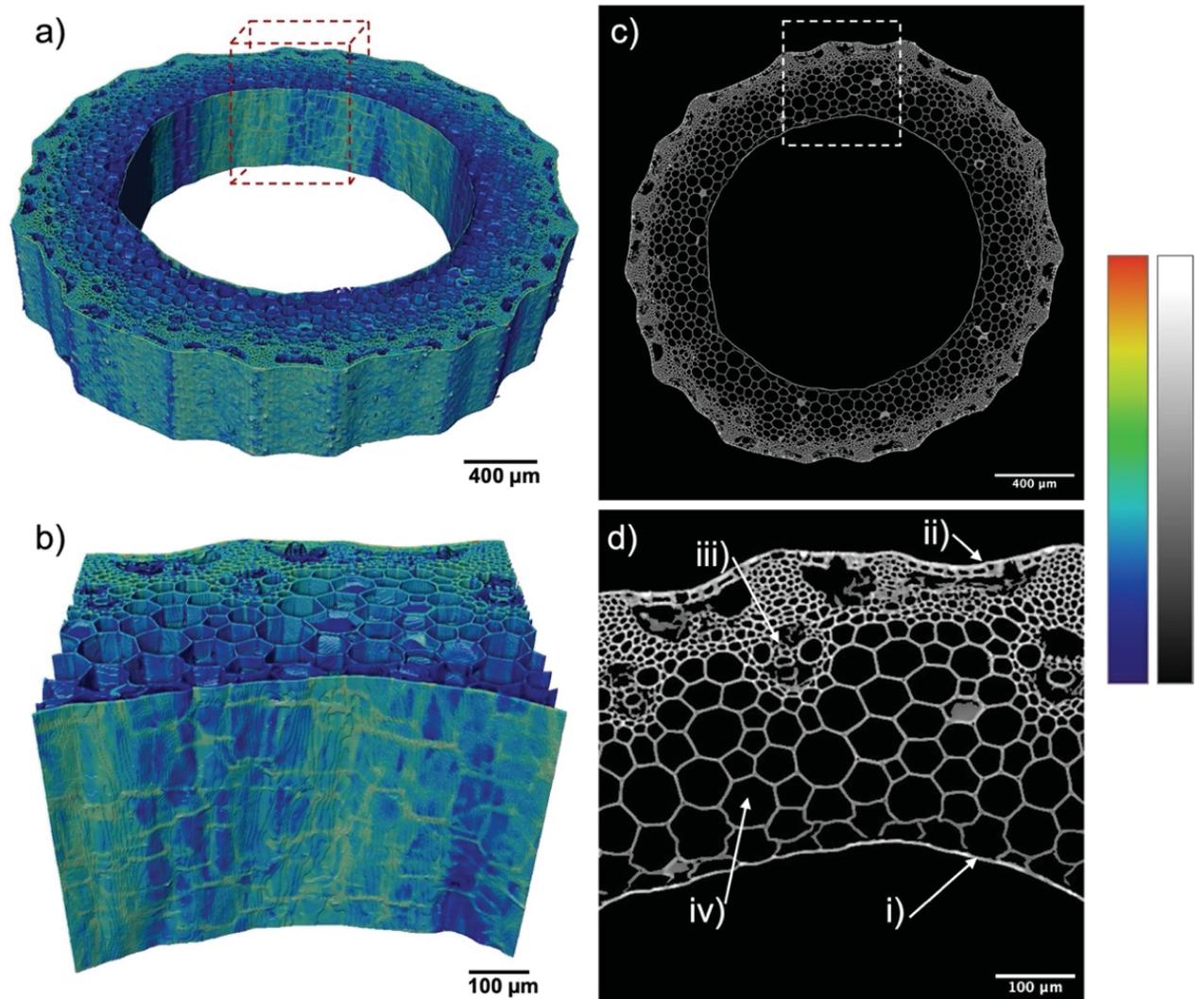


Figure 54 : Images μ CT de la paille de blé native. a) Rendu de volume 3D (pour des raisons de clarté, seul un tiers du volume complet reconstruit est montré). b) Gros plan 3D (la face avant dans la paroi intérieure de la paille, voir le carré rouge pointillé en a). c) Coupe transversale tomographique (prise au milieu du volume 3D montré en a). d) Gros plan de la coupe transversale sur le carré blanc pointillé montré en c). Plusieurs caractéristiques anatomiques sont indiquées : revêtement interne de la cavité (Pith Cavity Lining -PCL-) (i), épiderme (ii), vaisseaux vasculaires (iii), cellules du parenchyme (iv). La correspondance entre les niveaux de gris des images 2D et la carte des couleurs des volumes 3D est donnée à droite.

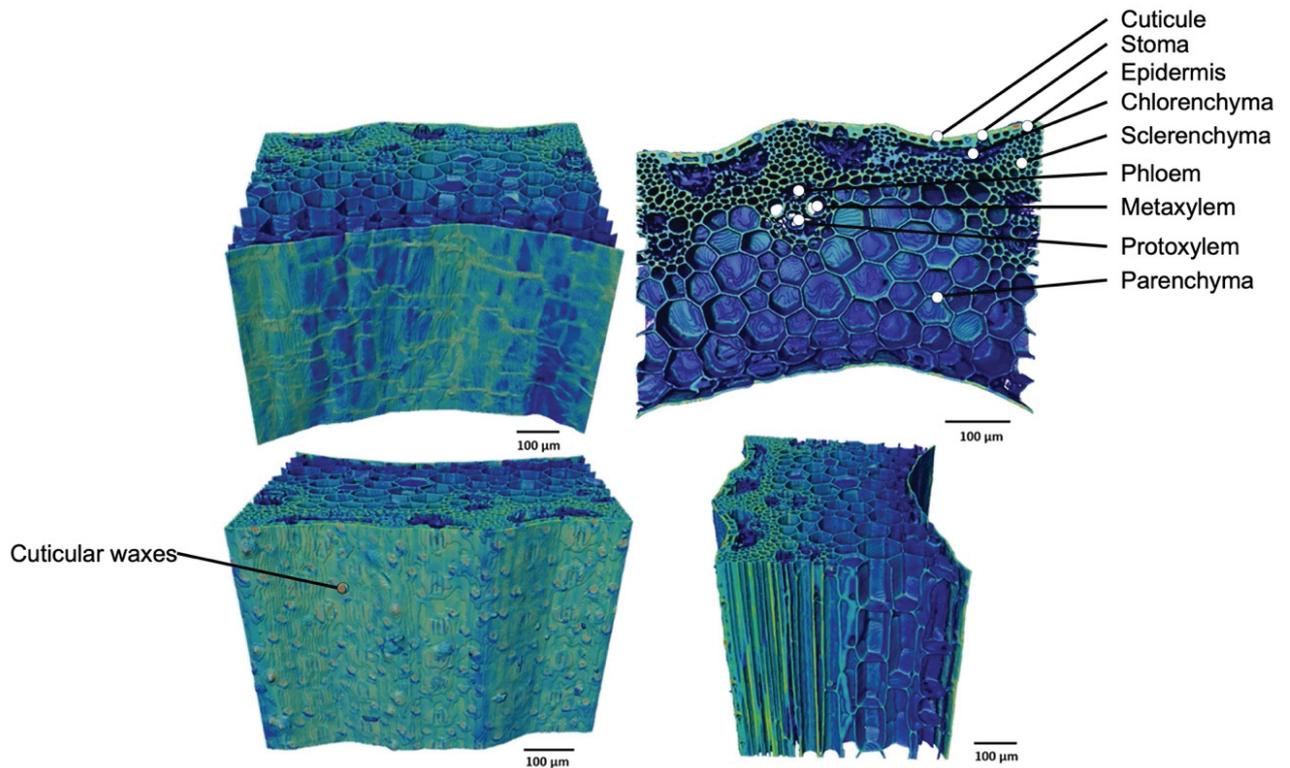


Figure 55 : Sous-volumes de paille de blé brute avec différents points de vue : avant (gauche en haut), arrière (gauche en bas), haut (droite en haut) et côté gauche (droite en bas). Plusieurs caractéristiques anatomiques sont indiquées.

4.2.1.ii Anatomie de la paille de blé brute : nouveaux éléments

Il y a cependant quelques aspects intéressants concernant l'anatomie de nos échantillons de paille de blé qui méritent d'être mentionnés ici et qui - à notre connaissance - ne sont pas encore bien documentés dans la littérature.

Plus grande densité effective du PCL

Le premier est le fait que la paroi interne de la paille, le PCL (pour *Pith Cavity Lining*), d'une largeur d'environ 7-8 μm , se distingue particulièrement par des voxels plus lumineux. Comme déjà discuté, l'absorption en tomographie X, à l'échelle d'un voxel de l'image 3D, est une fonction du matériau présent dans ce voxel : plus le matériau est lourd (en terme de numéro atomique) et dense (en terme de masse volumique), plus celui-ci absorbe les rayons X (et donc apparaît avec de forts niveaux de gris sur l'image 3D/les coupes tomographiques). Dans nos échantillons, tous les polymères constitutifs des parois végétales ont une composition

similaire (atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène). On fait donc l'hypothèse que la plus grande absorption au niveau du PCL est due à une plus grande densité effective de ces matériaux. Attention, on parle bien de densité effective : la paroi végétale est constituée d'un réseau poreux de fibres polymères intriquées entre elles, c'est ce réseau qui est plus dense (moins poreux) au niveau du PCL.

Cette densité effective plus élevée dans le PCL n'est pas clairement documentée dans la littérature. Pour confirmer ces observations faites en tomographie, nous avons utilisé des images obtenues par microscopie confocale faisant apparaître la cellulose préalablement marquée par une sonde fluorescente, le calcofluor (Figure 56), qui suggèrent que le PCL est en effet constitué d'une structure fibreuse très dense.

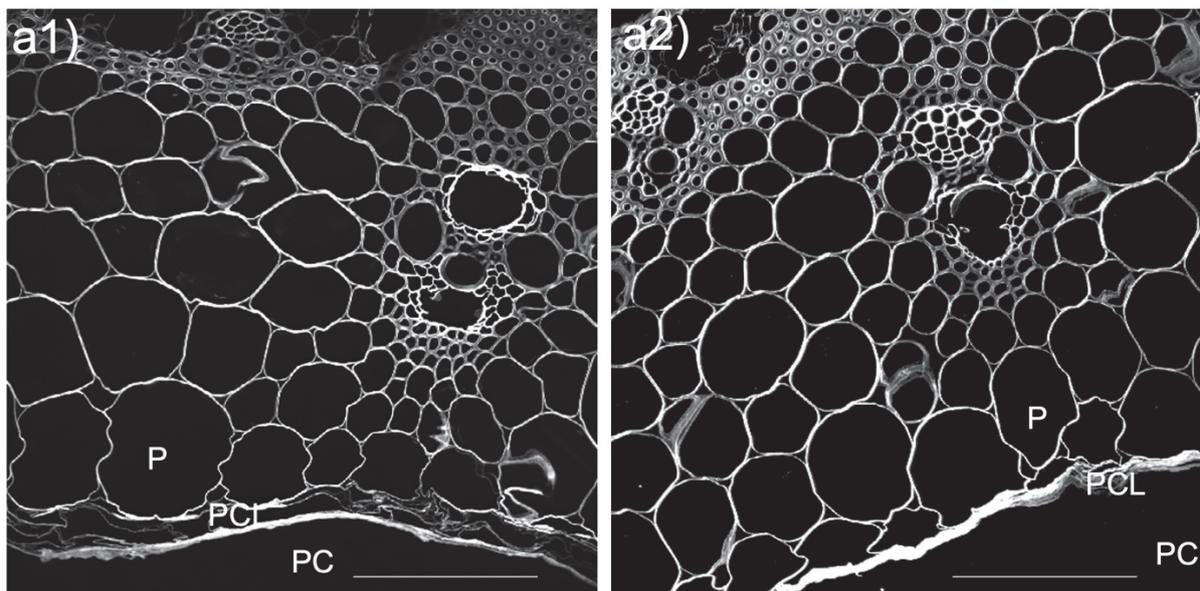


Figure 56 : Coupes obtenues par microscopie confocale (voir §2.3.1). La barre d'échelle en bas à droite représente 100 µm. a) Échantillons témoins de paille de blé avant (a1) et après incubation en présence de tampon pendant 24 h (a2). Annotations : P, parenchyme ; PCL, revêtement de la cavité médullaire (Pith Cavity Lining) ; PC, cavité médullaire.

Sur ces images, le PCL est clairement observable comme une structure brillante et compacte (Figure 56.a), riche en cellulose. Il est toutefois possible d'observer occasionnellement une désorganisation de cette structure (Figure 56.b en bas à droite), quelle que soit la durée d'exposition des échantillons au tampon.

Nous pensons que la densité plus forte est à relier avec les mécanismes de formation de la cavité centrale de la tige, lorsque les cellules du parenchyme qui forment le PCL s'effondrent

pendant la maturation de la plante [142], accumulant ainsi du matériel à base de cellulose et d'autres glucides à cet endroit précis.

Motif caractéristique en « treillis », au niveau du PCL

La deuxième caractéristique frappante est le motif en forme de maille, de treillis que nous discernons à la surface du PCL sur les rendus volumiques 3D (Figure 54.a et 46.b). Il semble que cette caractéristique structurelle n'ait jamais été explicitement décrite auparavant, même si des images en microscopie électronique à balayage (MEB) non annotées publiées précédemment mettent en évidence un motif similaire. Nous présentons sur la Figure 57, ces images MEB, issues de l'article de Hansen et al. [74].

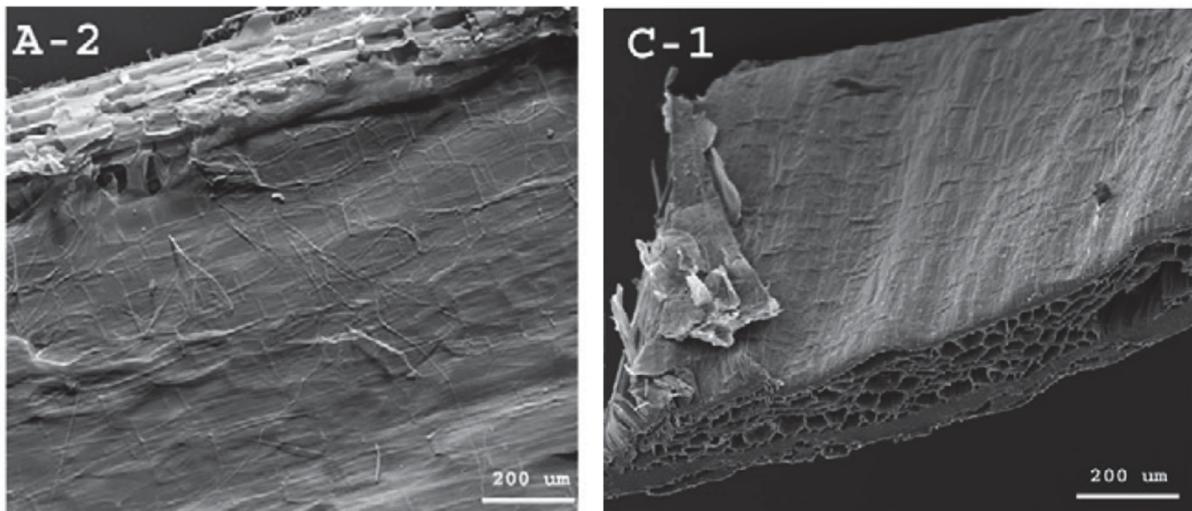


Figure 57 : Images en microscopie électronique à balayage du PCL d'une paille de blé (Figure 5 de Hansen et al [74]).

Ce motif, dont la taille des mailles correspond à peu près à la taille transversale d'une cellule de paille de blé (environ 70 µm), n'est pas associé à une rugosité de la surface interne de la paille de blé, à la résolution de la tomographie : c'est la présence de voxels présentant des densités plus élevées au sein du PCL qui dessine ce motif. Afin de mieux comprendre l'origine de ce motif et avoir des éléments sur son origine, nous avons effectués plusieurs mesures complémentaires, en utilisant différentes techniques d'imagerie. Au vu des résultats de tomographie, le motif ne semble pas systématiquement correspondre aux parois des cellules du parenchyme qui se trouvent immédiatement à l'arrière du PCL, comme le révèle une inspection minutieuse de nos images. Par exemple, la Figure 58 montre quelques coupes

tomographiques le long du motif maillé. Sur la Figure 50.a, on montre le rendu volumique et la position des plans de coupes (en pointillés) que l'on retrouve sur les Figure 50.b et 50.c. Pour le cas montré sur la Figure 58.b, la densité locale plus élevée dans le PCL (à l'intersection des plans jaune et rouge) est associée à la présence du plafond cellulaire d'une cellule de parenchyme voisine, mais ce n'est pas le cas dans la Figure 58.c (à l'intersection des plans violets et rouge).

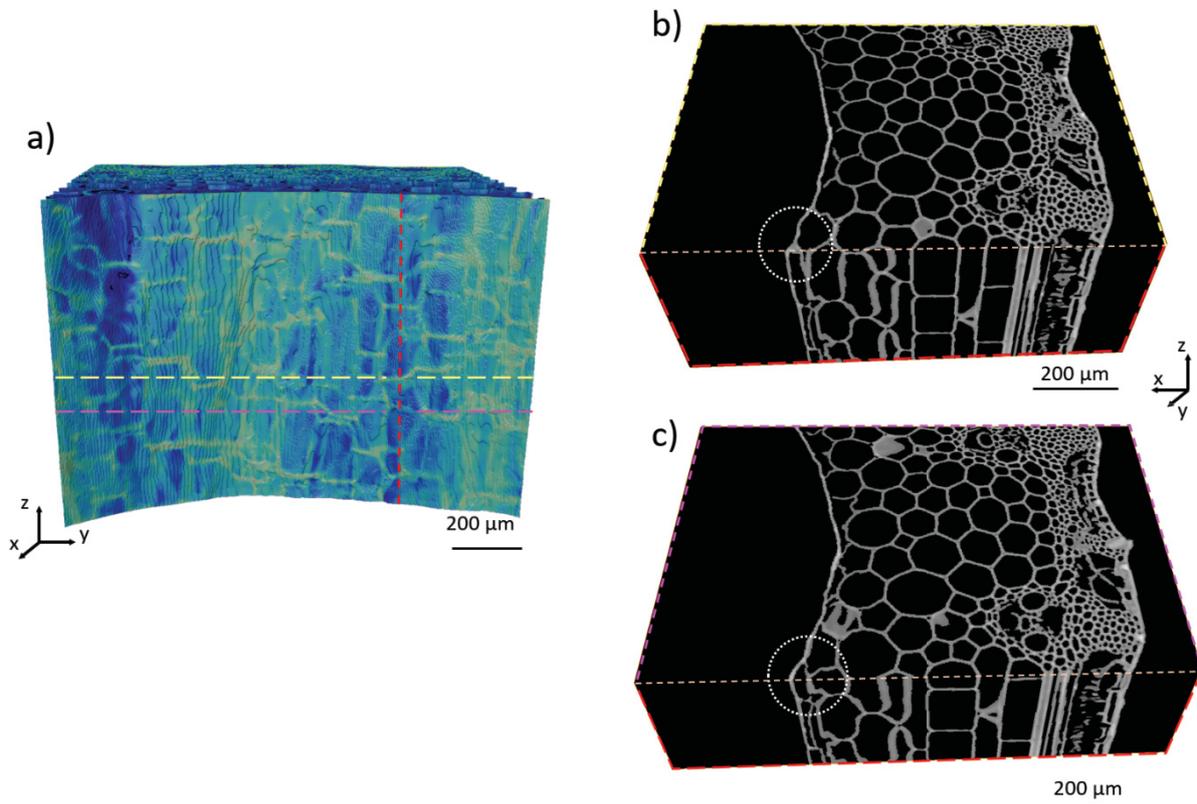


Figure 58 : Analyse du motif en treillis au niveau du PCL. a) Rendu volumique et position des plans de coupe (lignes pointillées de couleur. b) et c) Visualisations au niveau des plans de coupe.

D'autres visualisations ont été réalisées en MEB, à haute résolution et sont présentées sur la Figure 51. Elles confirment clairement la présence du motif maillé, qui apparaît en léger relief à la surface du PCL comme une structure organisée (Figure 51.a). Des vues plus rapprochées ont été réalisées à l'endroit où l'échantillon a été coupé, révélant par chance la face interne du PCL, Figure 51.b, c et d. Il est ainsi possible de révéler des structures de forme parallélépipédique sur la surface interne du PCL, apparemment pas toujours liées aux cellules formant le soubassement du ou aux premières cellules du parenchyme PCL : voir les

structures indiquées par des flèches blanches sur la Figure 51.c. Un agrandissement encore plus important centré sur une telle structure (Figure 51.d) met en évidence son aspect fibreux.

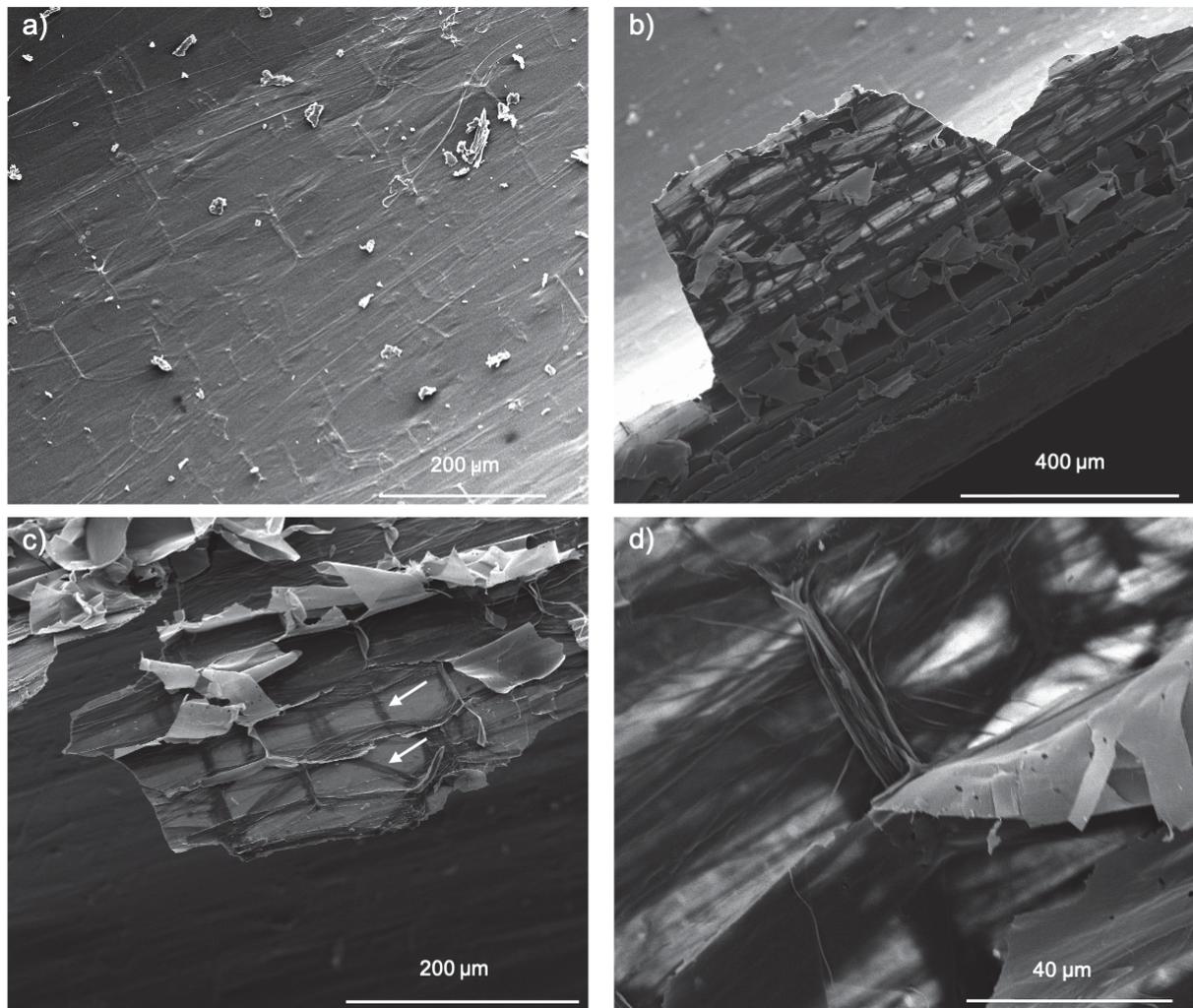


Figure 59 : Images obtenues par MEB. La surface intérieure de la paille, le PCL, est imagé en a). Les trois autres images sont centrées au niveau d'une déchirure localisée à l'endroit où l'échantillon a été découpé, qui permet de visualiser l'envers du PCL. L'échelle de taille est indiquée par la barre blanche sur chacune des images.

Afin d'avoir une première indication sur la composition chimique de la structure en treillis, nous avons réalisé plusieurs observations en microscopie de fluorescence, comme décrit en 2.3.1.ii, en utilisant deux sondes fluorescentes de la cellulose et de la lignine.

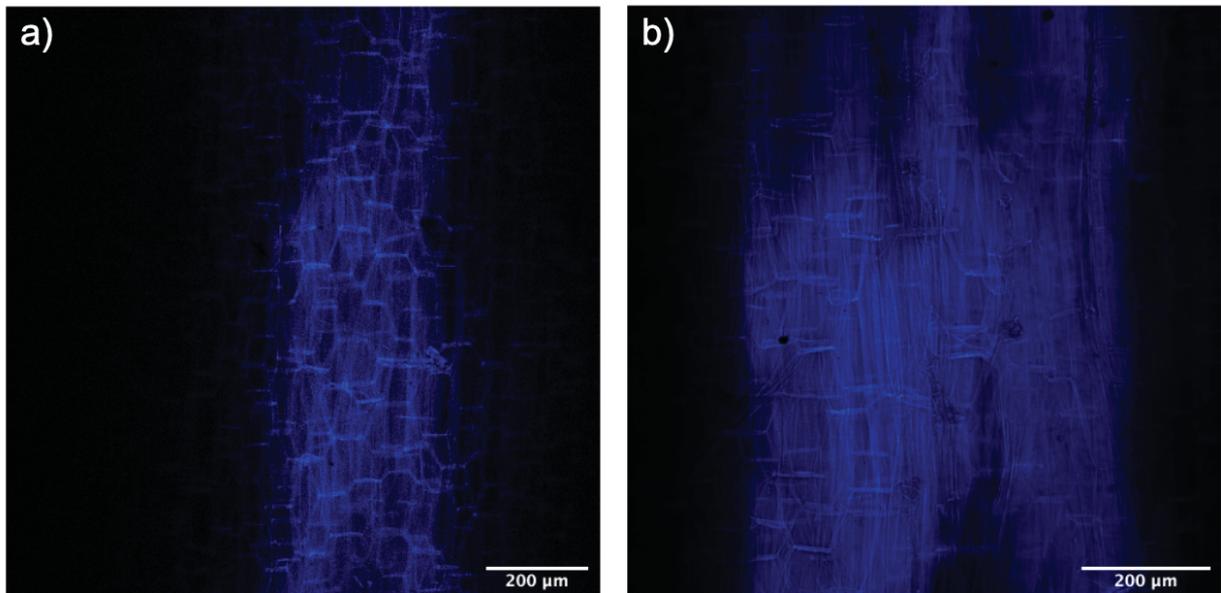


Figure 60 : Microscopie confocale de la paille de blé brute : a) auto fluorescence indiquant la présence de lignine, b) échantillon marqué au calcofluor pour mettre en évidence la cellulose. Ces images présentent chacune une coupe confocale type, prise au niveau du PCL au centre de l'échantillon.

Dans les deux cas (Figure 60), les images ont révélé le même motif maillé que celui observé sur le rendu volumique des images 3D et sur les images MEB. Cette structure n'est manifestement pas un artefact, elle est probablement composée d'un entrelacs dense de fibrilles de cellulose et de lignine, fournissant ainsi un matériau dense qui ressort sur les images tomographiques.

Sur la base des résultats présentés sur les trois Figures précédentes, nous déduisons que le maillage résulte de la présence d'une structure cellulosique dense, fibreuse et maillée à l'intérieur du PCL. Encore une fois, une telle structure est sans doute la signature de mécanismes complexes qui se produisent pendant la croissance de la plante, en particulier pendant la formation de la tige creuse, en lien avec l'empilement et la compression des cellules qui finissent par former le PCL.

4.3. Dégradation enzymatique de la paille de blé imagée par microtomographie à rayons X

En guise d'introduction à cette partie, rappelons que notre approche est une approche ex-situ, où les échantillons traités par hydrolyse enzymatique sont séchés avant d'être

tomographiés. Lors d'expériences préliminaires (stage de Louison Dumond en 2015-2016 sur financement incitatif INRAE), il a été observé que des dommages mécaniques et/ou des déformations importantes peuvent se produire lorsqu'un même échantillon est soumis à des cycles successifs de traitement enzymatique/imagerie. Cela pose problème quand on cherche à comparer deux endroits identiques sur un échantillon donné, avant et après manipulations de celui-ci. Par conséquent, nous avons utilisé plusieurs échantillons natifs, chacun étant traité une seule fois.

Chaque échantillon est soumis au cocktail enzymatique pendant une durée donnée, puis imagé après séchage. Le cocktail est un mélange commercial d'enzymes (Novozymes A/S) ayant des activités complémentaires pour la saccharification de substrats lignocellulosiques génériques, combinant des enzymes actives sur la cellulose et sur les hémicelluloses [143]. Les différentes durées du traitement enzymatique sont choisies en fonction de la mesure de l'activité du cocktail selon la procédure détaillée dans le Chapitre 2 (§2.2) et dont les résultats ont été présentés précédemment. Au total, nous disposons de six conditions différentes : cinq se situant dans une plage de temps où l'action enzymatique est clairement mesurable et évolue de manière continue dans le temps (30 min à 2 h), et un cas limite où l'échantillon est exposé au cocktail pendant 72 h en rafraichissant le cocktail toutes les 24h, pour obtenir un état de dégradation le plus avancé possible (voir §2.2.4 pour les détails de la préparation de cet échantillon). L'analyse consiste ensuite à comparer les images obtenues pour le même échantillon avant et après le traitement enzymatique.

Les Figures 61 à 63 fournissent des visualisations obtenues respectivement après 30 min, 1 h et 72 h de traitement enzymatique. Sur chaque Figure, deux scans différents sont utilisés (avant et après digestion). Toutes ces images peuvent être comparées en termes de niveau de gris même si elles proviennent de scans différents, grâce à la procédure d'ajustement des histogrammes détaillée dans le Chapitre 1. L'Annexe 1 fournie une visualisation similaire aux Figures ci-dessous pour tous les temps de dégradation enzymatique explorés au cours de ce travail de thèse.

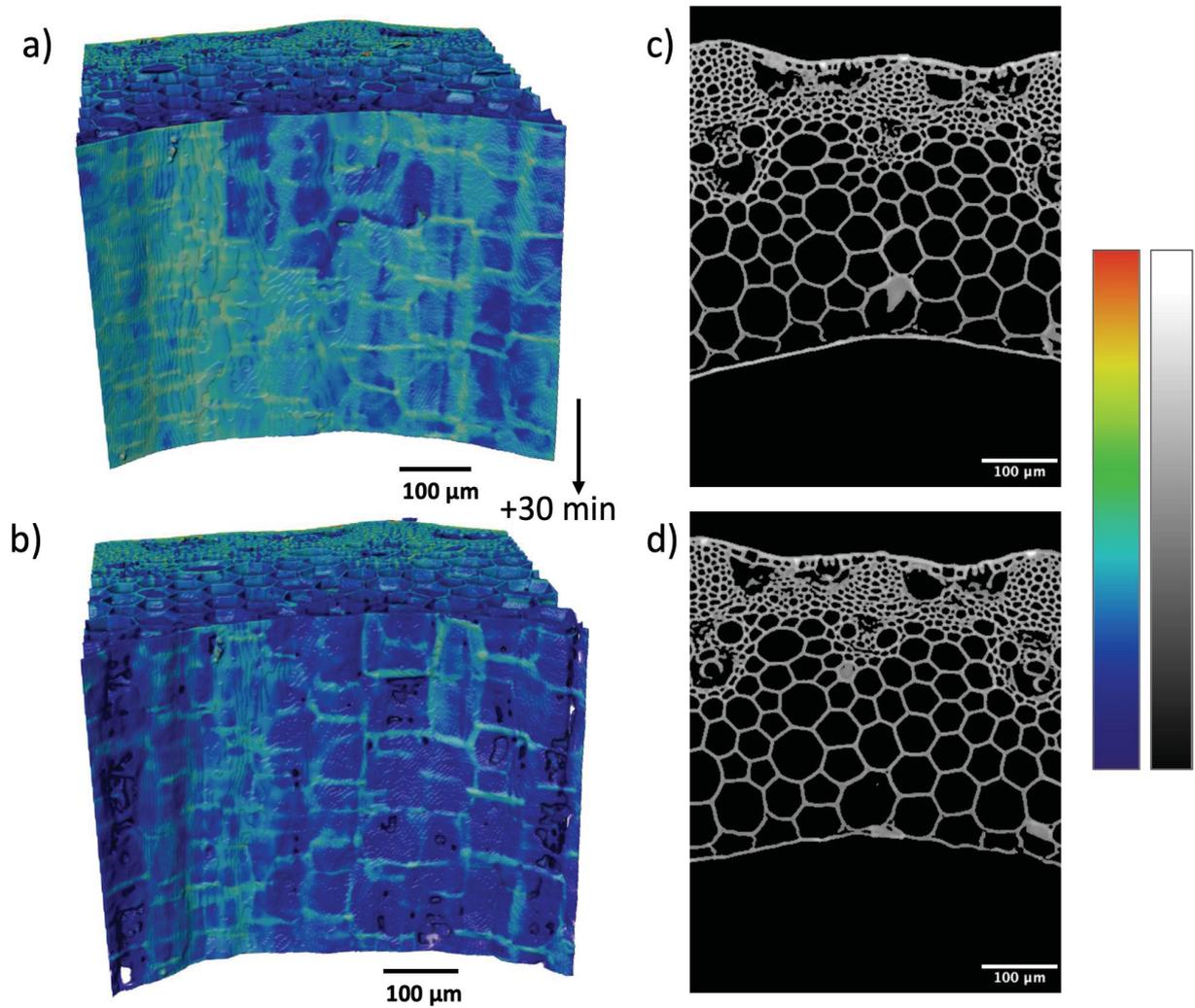


Figure 61 : Images de paille de blé avant et après 30 min de dégradation enzymatique. a) Rendu volumique 3D avant traitement. b) Rendu volumique 3D après traitement au même endroit de l'échantillon. c) Coupe tomographique transversale avant traitement. d) Coupe tomographique transversale après traitement au même endroit de l'échantillon (grâce au recalage spatial des images natives et digérées, Cf. Chapitre 3).

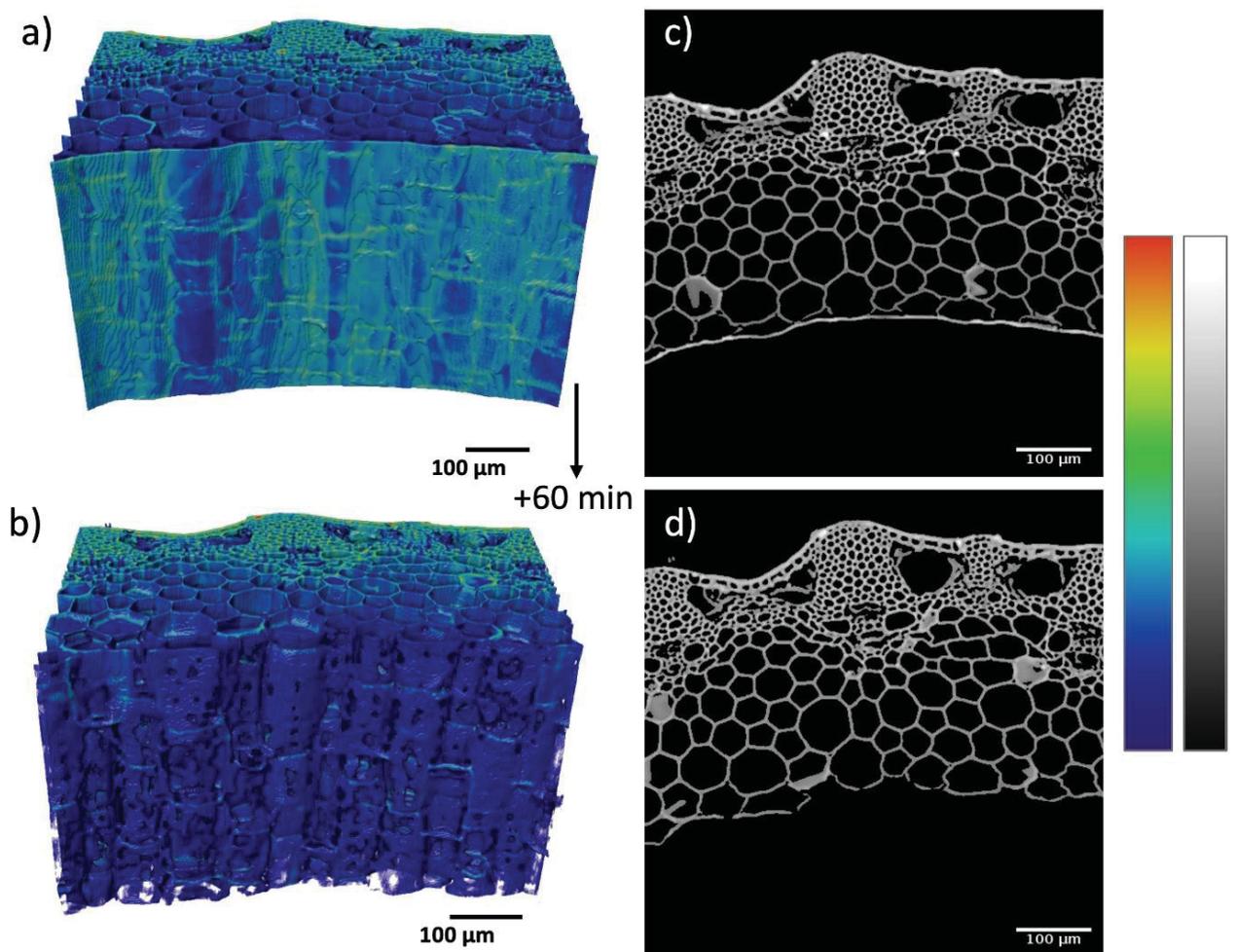


Figure 62 : Images de paille de blé avant et après 1 h de dégradation enzymatique. a) Rendu volumique 3D avant traitement. b) Rendu volumique 3D après traitement au même endroit de l'échantillon. c) et d) Coupes tomographiques transverses respectivement avant et après traitement.

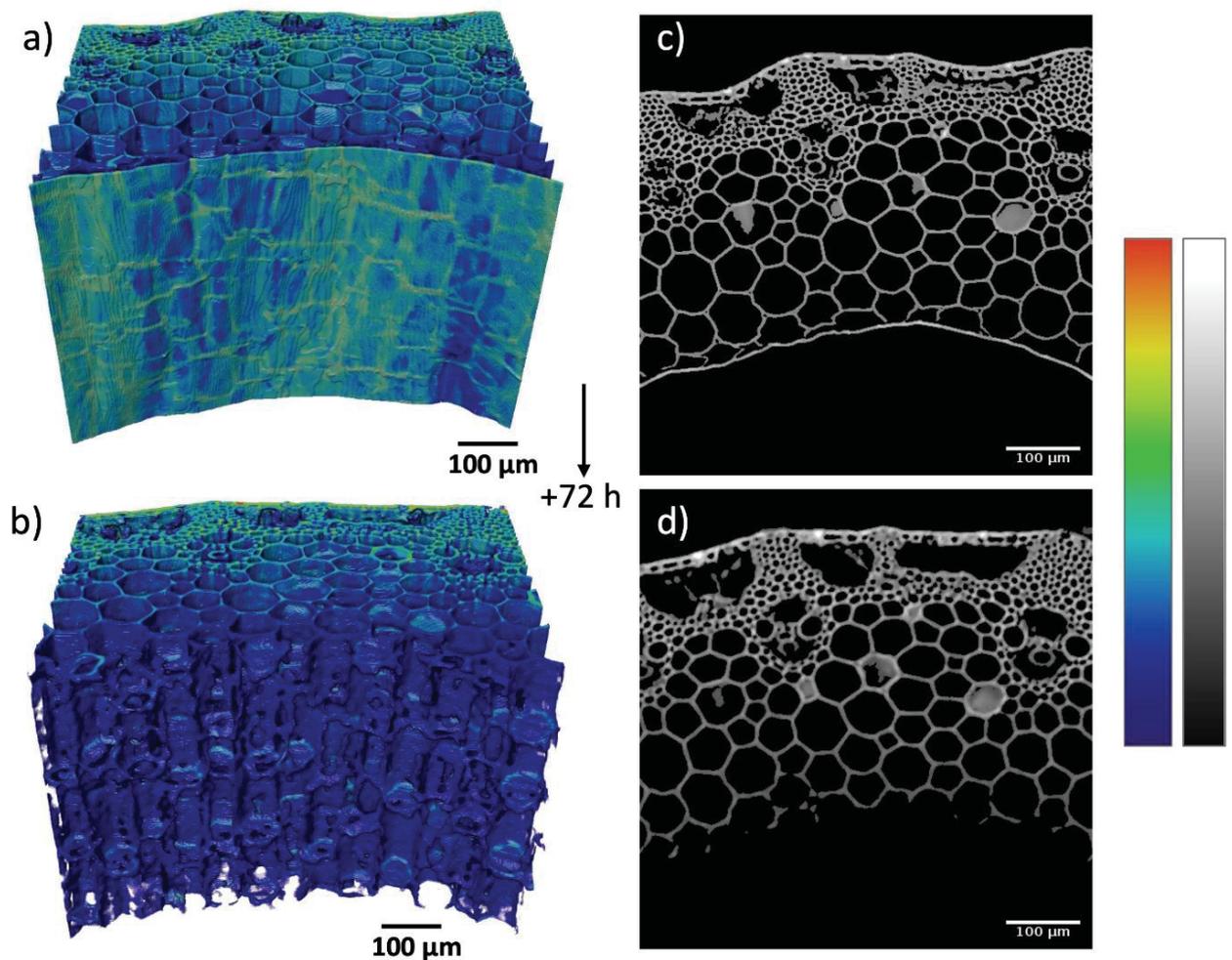


Figure 63 : Images de paille de blé avant et après 72 h de dégradation enzymatique. a) Rendu volumique 3D avant traitement. b) Rendu volumique 3D après traitement au même endroit de l'échantillon. c) et d) Coupes tomographiques transverses respectivement avant et après traitement.

4.3.1. Première discussion générale des images 3D

Une première analyse qualitative, à l'œil nu, des images obtenues par tomographie à rayons X donne déjà une image intéressante de la façon dont la déconstruction se produit. Après 30 min de digestion enzymatique (Figure 61), on observe clairement une diminution de l'intensité moyenne des voxels, c'est-à-dire de la valeur du niveau de gris (GL), au niveau du PCL pour la paille de blé digérée. Sur les coupes tomographiques (Figure 61.c et d), le PCL est toujours présent après l'attaque enzymatique, mais ses valeurs de GL sont maintenant proches de celles des parois cellulaires internes. Le rendu volumique correspondant confirme cette observation (Figure 61.a et b), avec le PCL qui apparaît bleuté sur toute la hauteur de

l'échantillon après le traitement enzymatique. Cependant, nous distinguons toujours le motif maillé du PCL, montrant que ces hétérogénéités de densité, discutée précédemment, subsistent. À 1 h de dégradation (Figure 62), la diminution des GLs au niveau du PCL est encore plus marquée. A certains endroits, le PCL n'est plus visible, comme le montre clairement la Figure 62.d. Cela se traduit par l'apparition de quelques "trous " dans le PCL, comme le montre la Figure 62.b. D'autre part, le motif en treillis du PCL est encore identifiable sur cette image, ce qui signifie que les parties les plus denses du PCL résistent encore à l'attaque après 1 h de dégradation. Enfin, à 72 h de dégradation (Figure 63), le PCL est totalement digéré, et les cellules du parenchyme initialement situées à proximité immédiate du PCL sont également dégradées. Comme ces cellules sont maintenant délestées d'une partie de leur paroi, cela conduit à une surface interne de la paille accidentée, avec une rugosité qui correspond à la taille des cellules. Dans le même temps, on note qu'aucune dégradation enzymatique de l'épiderme n'est mise en évidence. Dans l'ensemble, ces observations à l'œil nu suggèrent que les enzymes du cocktail attaquent la paille de blé depuis sa surface interne, affaiblissent d'abord puis détruisent le PCL, et enfin progressent dans la structure interne de la paille de blé tout en la dégradant. En dehors de cela, l'œil humain n'est pas capable de repérer d'autres changements évidents dans les images obtenues par tomographie, au fur et à mesure que la dégradation se produit.

4.3.2. Marqueurs de la dégradation enzymatique : approche statistique

4.3.2.i Étude statistique sur un ensemble de régions d'intérêt : principe

Pour aller plus loin dans l'analyse, il faut effectuer une analyse automatisée des images de tomographie. Nous allons utiliser une approche statistique visant à donner une évaluation semi-quantitative de l'action enzymatique. L'approche consiste à définir des régions d'intérêt (ROIs) parallélépipédiques dans les échantillons, basées sur les changements observés à l'œil nu. Trois types de ROIs sont ainsi définis. La Figure 64 donne une représentation schématique de leur localisation respective. Elles correspondent à : (1) la partie externe de l'épiderme (en bleu sur la Figure 64), (2) la partie interne du parenchyme (vert), (3) la région du PCL (rouge), avec des volumes de ROI de 1500, 25000 et 1500 μm^3 , respectivement. Les ROIs localisées au niveau du parenchyme sont plus grandes que les autres, de manière à inclure à coup sûr des

parois cellulaires. Les ROIs au niveau du PCL et de l'épiderme sont fines et allongées, et positionnées à cheval sur ces deux éléments anatomiques caractéristiques. On définit 1000 ROIs pour un échantillon donné, chaque ROI étant située aléatoirement le long de la hauteur (direction longitudinale) et de la circonférence de l'échantillon. Les détails complets de la procédure de localisation de ces ROIs ont été donnés dans le Chapitre 1. Il faut noter que grâce au recalage spatial des images 3D (lui aussi détaillé dans le Chapitre 1), les ROIs sont localisées au même endroit (à quelques voxels près) sur les images de l'échantillon natif et celles de l'échantillon après hydrolyse enzymatique.

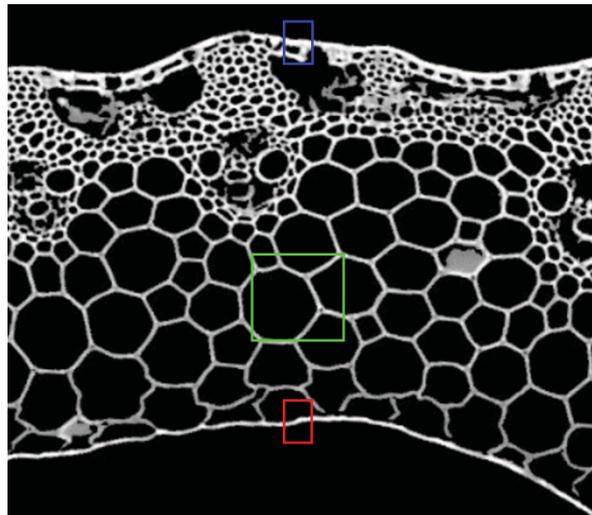


Figure 64 : Localisation des régions d'intérêt (ROIs) utilisées dans l'approche statistique. Les rectangles de couleur donnent la localisation des 3 types de ROIs introduits dans notre étude. Les ROIs sont 3D : elles s'étendent sur 5 voxels dans la direction longitudinale (perpendiculaire à celle du détail de coupe transverse utilisé ici).

Une fois les ROIs définies, tous les pixels appartenant au matériau PCW (*Plant Cell Walls*) au sein de ces ROIs sont extraits : on examine tous les voxels et ceux dont la valeur de niveau de gris est supérieure au seuil de segmentation choisi sont stockés dans un tableau. Le choix du seuil de segmentation a été discuté et analysé au Chapitre 3.

A partir de ces voxels, plusieurs informations peuvent être obtenues facilement : leur distribution de niveau de gris, leur valeur moyenne et leur nombre. Il s'agit des marqueurs de la dégradation enzymatique que nous allons maintenant étudier, en fonction de la durée de l'attaque enzymatique.

4.3.2.ii Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : distribution de niveau de gris

Sur la Figure 65, nous comparons les distributions des niveaux de gris (GL) pour tous les voxels au sein d'un type de ROI donné, avant et après l'attaque enzymatique. Sur cette figure, les valeurs de GL indiquées en abscisse sont obtenues en soustrayant aux données brutes la valeur de GL choisie comme seuil pour séparer le matériau PCW de l'air (qui vaut 10400, cf. Chapitre 3 section 3.1.2). Les valeurs GL sont ensuite divisées en classes de tailles égales (200). Pour des raisons de visibilité, les distributions ne sont pas tracées sous forme d'histogrammes mais de courbes où les valeurs en abscisse donnent le centre de chaque classe, et les valeurs en ordonnée le nombre de voxels dans chaque classe, comme pour les histogrammes déjà présentés dans le Chapitre 3.

Les distributions dans la région de l'épiderme de l'échantillon (courbes bleues) ne sont pas significativement différentes avant et après l'action des enzymes. En d'autres termes, la présente analyse de nos images obtenues par tomographie ne révèle aucun changement dans la distribution de masse volumique à ces endroits de l'échantillon. Une conclusion similaire peut être tirée pour le parenchyme interne pour lequel les distributions sont également similaires avant et après traitement (courbes vertes). La Figure 65 est obtenue pour un échantillon donné (celui subissant une attaque de 90 min), des résultats équivalents sont obtenus quand on travaille sur les autres échantillons utilisés dans notre étude.

En revanche, les résultats obtenus pour les régions du PCL (courbes rouges) montrent un fort déplacement de la distribution vers des valeurs de GL plus faibles après l'attaque enzymatique: les valeurs de GLs dans la plage [2000-6000], représentatives des voxels « brillants » du PCL dans l'image native (droite et croix rouges sur la Figure 65), ne sont plus présentes dans l'échantillon digéré (droite et points rouges).

Un tel effet n'est pas retrouvé pour un échantillon témoin qui a subi le même protocole de préparation que les échantillons utilisées dans notre étude, mais sans être soumis à l'action du cocktail enzymatique (voir le détail dans le 0). En effet, sur la Figure 66, nous comparons la distribution des niveaux de gris obtenue pour l'ensemble des ROIs positionnées au niveau du PCL pour l'échantillon témoin et les échantillons natifs (ROI rouge sur la Figure 64). Les données de l'échantillon témoin (ligne noire pointillée mise en évidence par des points noirs) sont similaires à celles obtenues pour 4 échantillons natifs différents (lignes pointillés noirs).

En particulier, elles affichent des valeurs de GL dans la plage [2000-6000] au-dessus du seuil, représentatives des voxels brillants du PCL qui disparaissent après la digestion (les données d'un échantillon digéré représentatif sont indiquées en rouge). Un tel résultat prouve que les altérations observées sur le PCL, qui se traduisent par la modification de la distribution de GL observée sur la Figure 65, peuvent être attribuées à l'effet du cocktail enzymatique, et non aux autres manipulations subies par l'échantillon pendant le protocole.

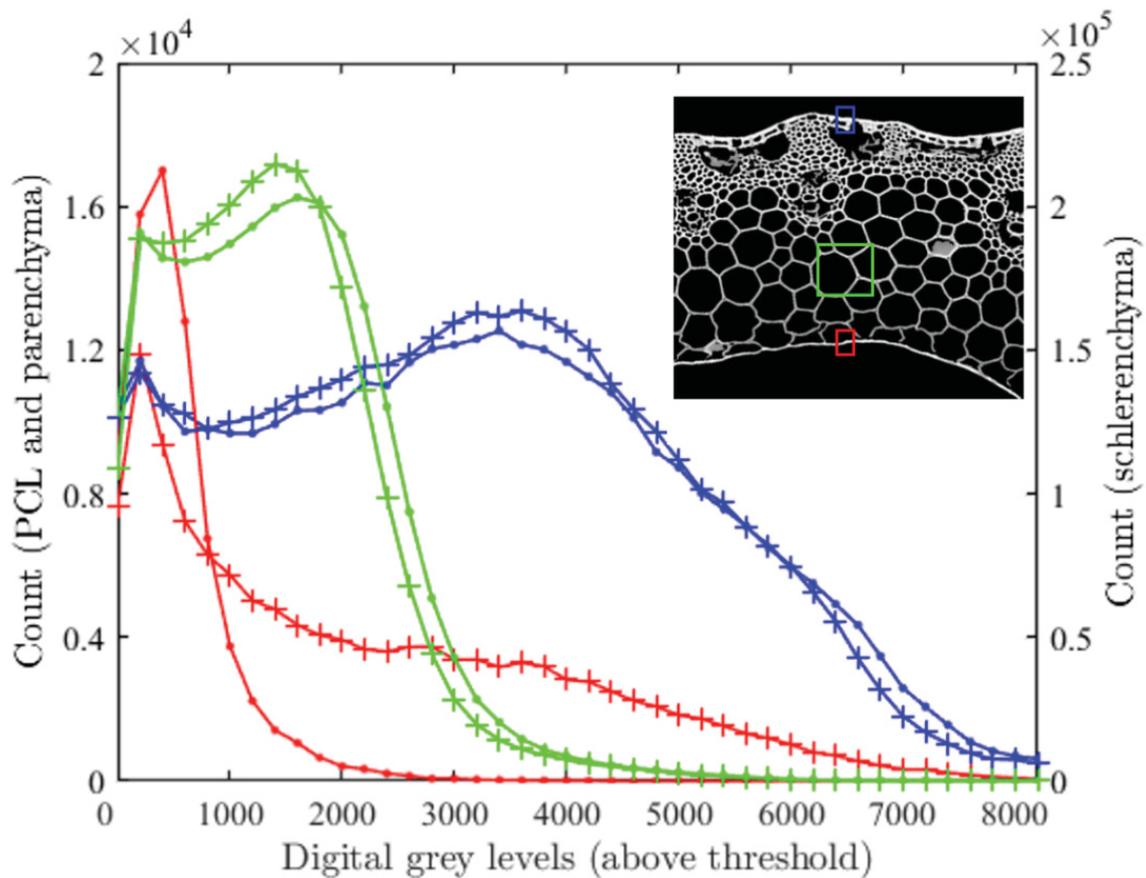


Figure 65 : Distributions de niveau de gris avant (points) et après la dégradation enzymatique (croix), pour une durée d'exposition au cocktail de 90 minutes. Chaque couleur se réfère à un type donné de ROI, comme illustré dans l'encadré : ROIs positionnées à cheval sur le PCL (rouge), à 125 μm du PCL, dans le parenchyme (vert), et à cheval sur l'épiderme (bleu). L'échelle des ordonnées de gauche correspond aux ROIs centrées sur le PCL (rouge) et l'épiderme (bleu), tandis que l'échelle des ordonnées de droite correspond aux ROIs plus larges du parenchyme (vert).

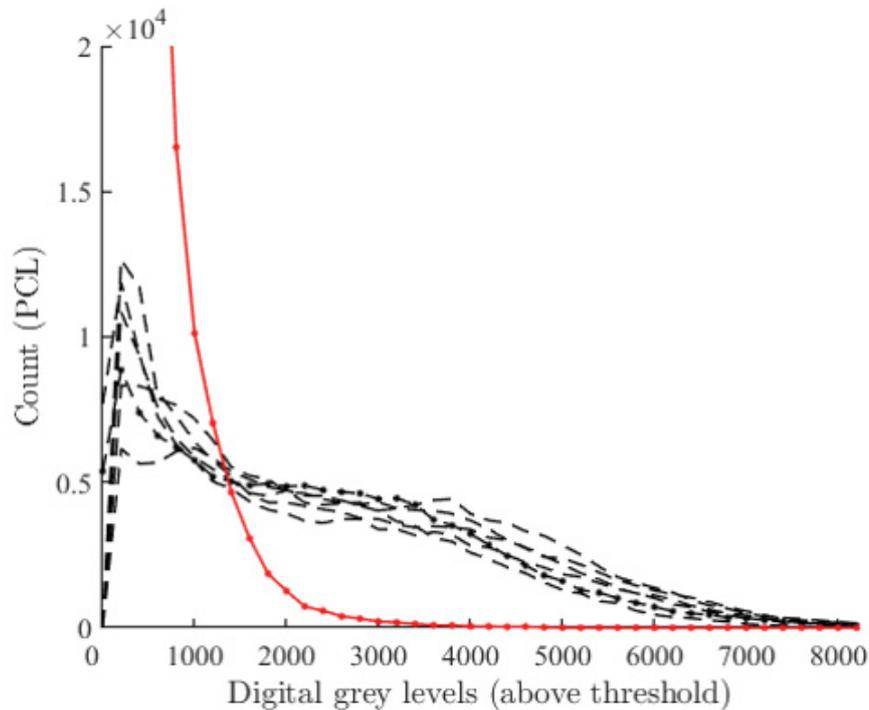


Figure 66 : Distribution des niveaux de gris obtenues pour les ROIs positionnées à cheval sur le PCL. L'échantillon témoin est représenté par la ligne noire en pointillés avec des points noirs. Les 4 autres lignes noires en pointillés correspondent à 4 échantillons natifs différents. Une distribution typique du niveau de gris pour un échantillon digéré est indiquée en rouge.

Avec la Figure 67, nous nous concentrons sur la cinétique du déplacement de la distribution vers les bas niveaux de gris, mis en évidence sur la Figure 65. Pour ce faire, nous traçons sur une même figure plusieurs distributions de GLs obtenues dans les régions PCL, pour différents échantillons correspondant à différentes durées de traitement enzymatique. Les distributions obtenues sont clairement différentes les unes des autres, avec une déformation progressive des distributions vers des valeurs de GLs plus faibles et une diminution significative du nombre de voxels de matériau PCW au fur et à mesure de la déconstruction.

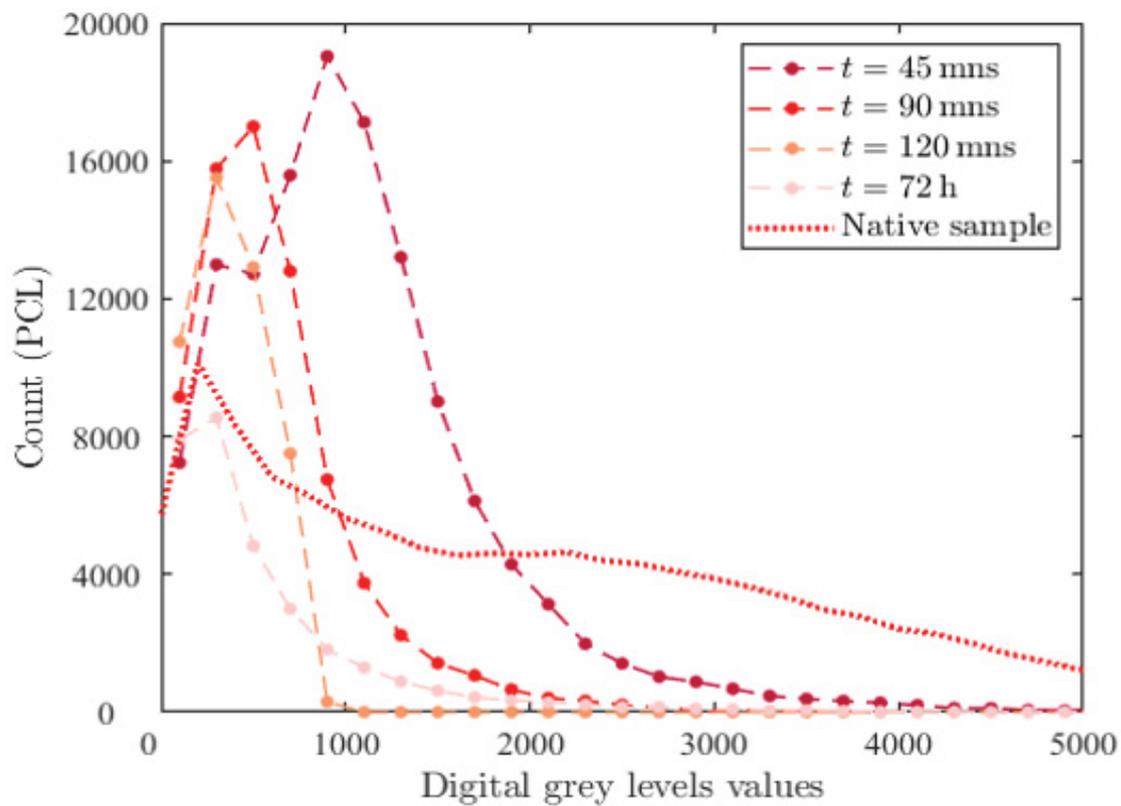


Figure 67 : Distributions des niveaux de gris, dans les ROIs situées à cheval sur le PCL (rouge dans la Figure 64), pour différentes durées de l'attaque enzymatique (voir légende). Une distribution typique pour un échantillon natif est également représentée (pointillés rouges). Les valeurs en ordonnée sont le nombre absolu de voxels dans chaque classe, ce qui signifie que la zone sous la courbe est à peu près égale au nombre total de voxels appartenant au matériau PCW, pour l'échantillon considéré.

De manière générale, deux quantités importantes peuvent être extraites des distributions de GL : (1) le nombre total de voxels dans les ROIs, qui donne une bonne estimation du volume moyen de matériau PCW qui s'y trouve, (2) la valeur moyenne des GLs dans ces ROIs. Nous nous intéressons désormais à ces deux marqueurs et leur évolution dans un premier temps, avant de les relier au mode d'action des enzymes.

4.3.2.iii Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : valeur moyenne et nombre de voxels appartenant au matériau PCW

Dans les Figures 68 et 69 nous présentons l'évolution de ces deux indicateurs en fonction du temps pour tous les échantillons étudiés et pour chaque type de ROI. Chaque indicateur est normalisé par sa valeur avant dégradation enzymatique, afin de s'affranchir de la variation naturelle entre les différents échantillons de paille de blé.

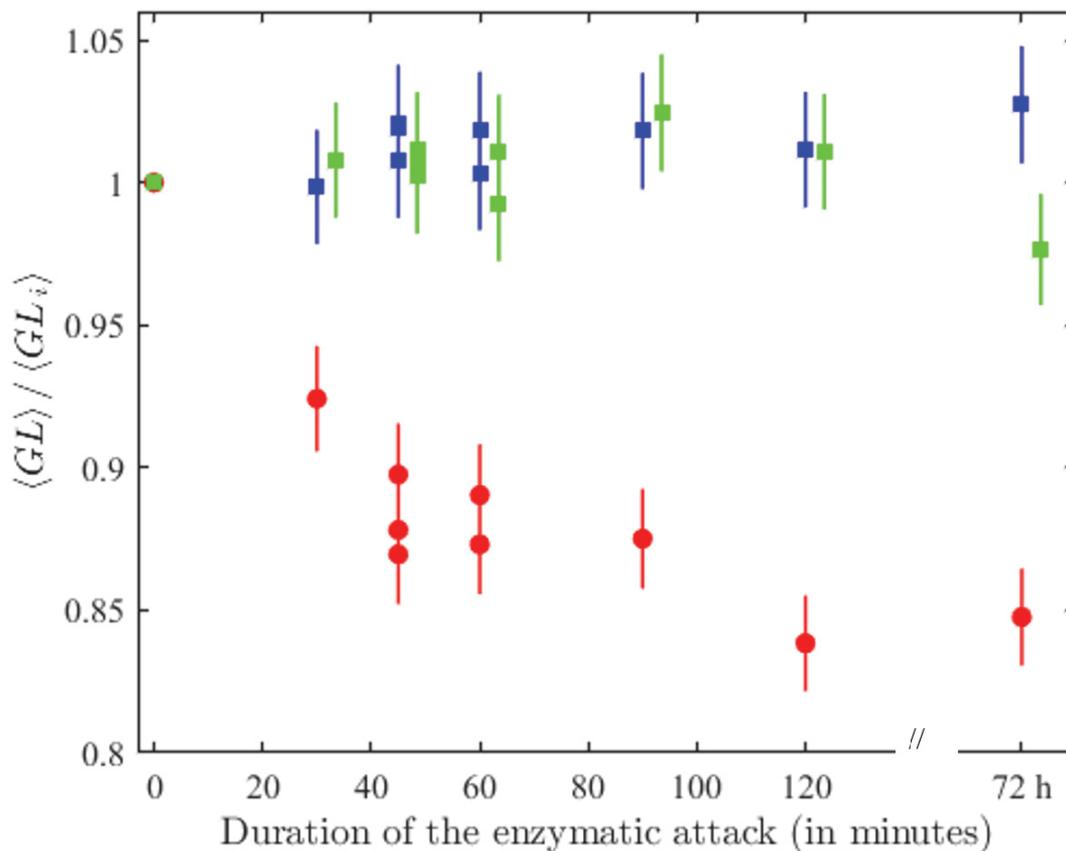


Figure 68 : Valeur moyenne des niveaux de gris pour les voxels appartenant au matériau PCW, $\langle GL \rangle$. Le calcul de la moyenne est effectué sur 1000 ROIs. ROIs PCL : points de données rouges, ROIs de l'épiderme/parenchyme : points de données respectivement bleus et verts. Ces derniers sont légèrement décalés sur l'axe des x pour des raisons de clarté. Pour chaque échantillon, les données sont renormalisées par la valeur mesurée sur l'échantillon natif ($\langle GL_i \rangle$). Les barres d'erreurs proviennent de l'incertitude sur le seuil de segmentation.

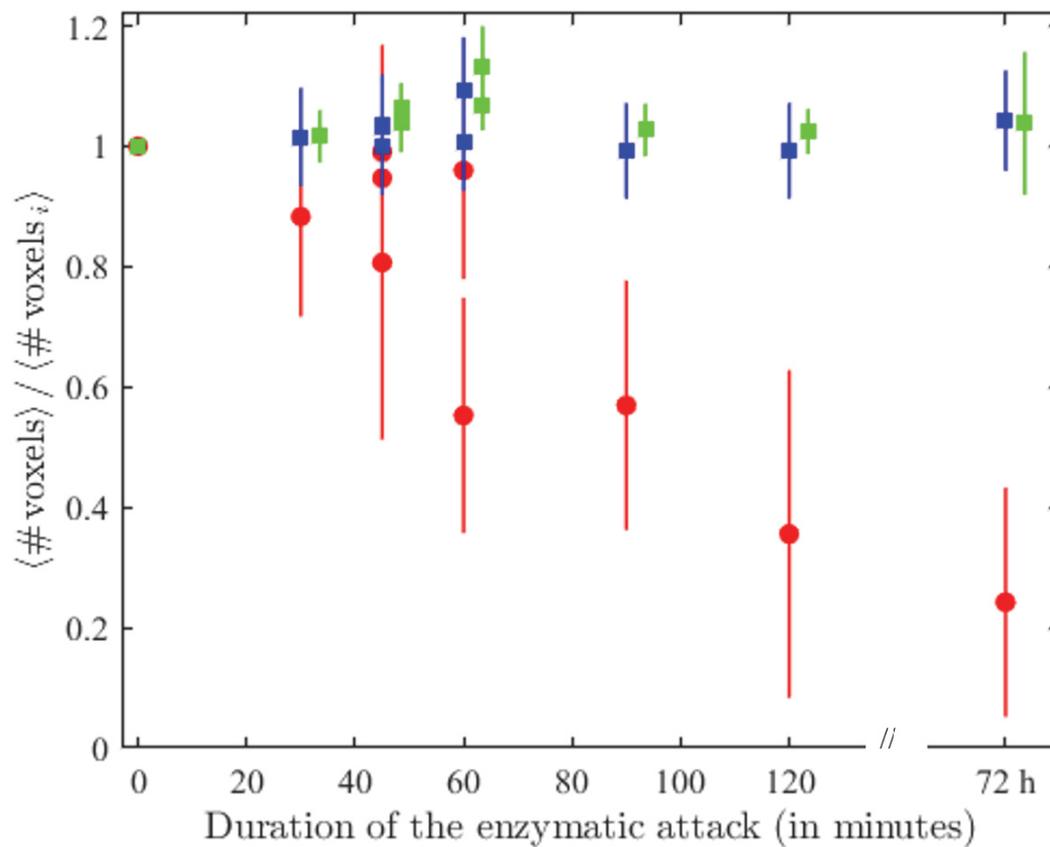


Figure 69 : Nombre total de voxels appartenant au matériau PCW, $\langle \# \text{ voxels} \rangle$, en fonction de la durée de l'attaque enzymatique. Le calcul de la moyenne est effectué sur 1000 ROIs. ROIs PCL : points de données rouges, ROIs de l'épiderme/parenchyme : points de données respectivement bleus et verts. Ces derniers sont légèrement décalés sur l'axe des x pour des raisons de clarté. Pour chaque échantillon, les données sont renormalisées par la valeur mesurée sur l'échantillon natif ($\langle \# \text{ voxels}_i \rangle$). Les barres d'erreurs proviennent de l'incertitude sur le seuil de segmentation.

Les marqueurs des Figure 68 et 69 et leur évolution permettent de reformuler les principaux résultats des Figures 66 et 67 concernant le PCL : l'évolution de la distribution des GLs résultant de l'hydrolyse conduit à une diminution de la valeur moyenne et du nombre de voxels appartenant au matériau PCW, respectivement associée au déplacement de la distribution des GLs vers des valeurs de GLs plus faibles et à la diminution de la zone sous la distribution (voir Figure 66 et 67 respectivement). Cela est dû au fait que les voxels initialement brillants (GLs élevés) du matériau PCW situés dans le PCL deviennent plus pâles après l'hydrolyse (leurs GLs diminuent, comme on l'observe également dans le rendu volumique 3D des Figures 61 à 63) et finissent par disparaître (cette évolution et son interprétation physique sont discutées plus en détail ci-après).

Les barres d'erreur résultent de l'incertitude sur le seuil de segmentation. On peut noter que celles-ci sont plus importantes au niveau du PCL, quand on considère le nombre de voxels, et ce d'autant plus que la durée de l'attaque en grande. En effet, visuellement, on a vu que les voxels du PCL voyaient leur intensité diminuer suite à l'attaque enzymatique, jusqu'à être à peine discernables sur le fond de l'image (matériau air). Il est donc prévisible qu'une variation du seuil de segmentation entraîne une variation notable du nombre de voxels retenus comme faisant partie du matériau PCW. C'est intrinsèquement une conséquence de la résolution spatiale limitée de notre technique d'imagerie et du contraste faible entre le matériau PCW dégradé et l'air.

4.3.2.iv Évolution des marqueurs de la dégradation enzymatique : discussion des résultats

Les résultats des Figure 67 et Figure 68 quantifient directement l'efficacité de l'attaque enzymatique et sa cinétique, et complètent donc bien l'inspection visuelle des images de tomographie. Deux conclusions importantes concernant la physique sous-jacente de la dégradation enzymatique peuvent être tirées à ce stade :

- Tout d'abord, en ce qui concerne la localisation de l'attaque enzymatique, les données de la Figure 67 et de la Figure 68 confirment que la dégradation enzymatique se fait essentiellement à partir du PCL, comme observé qualitativement sur les images. Les marqueurs de la dégradation ne présentent pas d'évolution significative dans l'épiderme et le parenchyme. Seul le PCL est affecté par les enzymes tant en terme de nombre de voxels (volume total) que d'intensité moyenne (densité du matériau). Attention, nous avons vu précédemment (Figure 62) que les cellules du parenchyme à proximité immédiate du PCL commencent à être dégradées après 1 h de traitement enzymatique : ceci n'est pas visible sur les données tracées en vert sur les Figures Figure 67 et Figure 68 car ces parois cellulaires n'appartiennent pas aux ROIs localisées au niveau du parenchyme, qui sont centrées à 125 μm du PCL, au-delà de la zone affectée (Cf Figure 64).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de la littérature. Par exemple, Bertrand et al. ont analysé la décomposition de la paille de blé dans le sol sur la base de caractéristiques biochimiques et histologiques [144]. Comme dans le présent travail, seules les cellules du PCL et du parenchyme disparaissent après l'exposition des échantillons bruts aux

microorganismes du sol pendant 119 jours. Un effet similaire a été observé par Dresbøll et al. après 8 semaines de compostage [145]. En outre, Hansen et al. ont confirmé que les enzymes des cocktails commerciaux adhèrent principalement au PCL et aux cellules du parenchyme, ce qui en fait le facteur le plus important pour déterminer la digestibilité des pailles de blé [111].

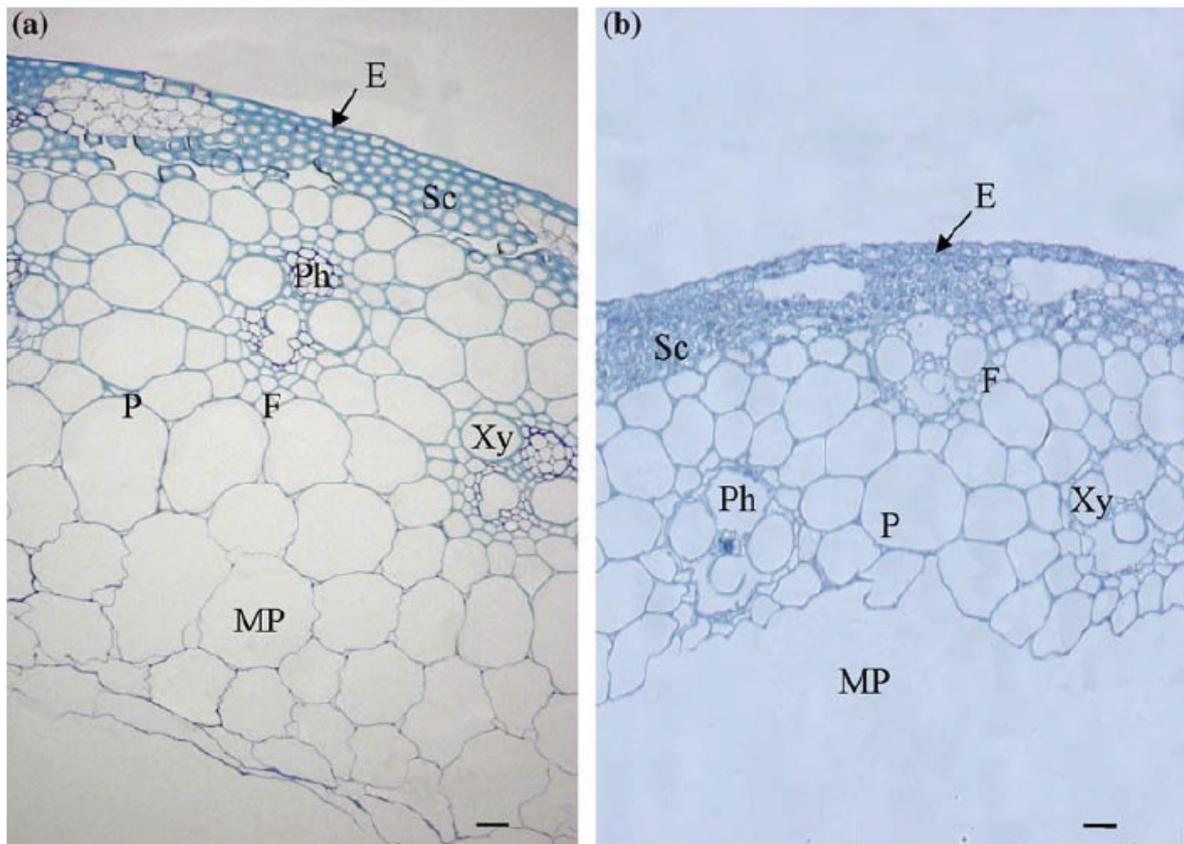


Figure 70 : Figure issue de l'article de Bertrand et al. ([144] Figure 5 de l'article)

Dans notre cas, les durées de traitement enzymatique plutôt courtes par rapport aux études citées permettent d'observer que le PCL est rapidement et fortement attaqué en premier lieu, tandis que le parenchyme se dégrade beaucoup plus lentement avec le temps. Outre le fait que le PCL est le premier élément anatomique (avec l'épiderme) que les enzymes « rencontrent » au cours de l'attaque, il semble donc très probable que le matériau du parenchyme lui-même soit plus résistant à l'action des enzymes que le PCL. Ceci serait dû à certaines différences - encore peu documentées - dans la structure et la composition chimique des deux matériaux. Il est aussi possible que le séchage de la paille de blé entraîne une agrégation des différents polymères constitutifs de la paroi cellulaire, la rendant plus résistante à une digestion enzymatique. La présence et/ou la disposition de la lignine dans les

parois cellulaires du PCL et du parenchyme est également une explication. La lignine, un polymère alkyl-aromatique hétérogène complexe, est incorporée dans la matrice de cellulose/hémicellulose des parois cellulaires des plantes, et est connue pour jouer un rôle crucial dans la récalcitrance des plantes à la déconstruction enzymatique [146]. Concernant l'épiderme, l'absence de dégradation observable est due à la grande récalcitrance de cette paroi, notamment en raison des couches de cutine qui est le principal composant de l'épiderme (aussi appelé cuticule). Ce biopolymère de haut poids moléculaire est connu pour incorporer la cire et les graisses, formant ainsi un bouclier protégeant l'épiderme de l'attaque enzymatique [74].

- Deuxièmement, concernant la façon dont l'attaque enzymatique se déroule concrètement au niveau du PCL, les observations suivantes peuvent être faites. À l'échelle du voxel, le GL est lié à la masse volumique (densité) effective du matériau PCW contenu dans le voxel. Par conséquent, une diminution du GL du voxel peut avoir deux origines différentes :

- (i) une perte de matériau (c'est-à-dire de cellulose et/ou d'hémicellulose),
- (ii) un gonflement local (*swelling*) de la microstructure sans aucune perte de matériau.

Comme le montrent les images de la Figure 61 ou de la Figure 62, et comme quantifié sur la Figure 69, le PCL perd clairement de la matière pour des durées d'attaque supérieures à 60 min et finit par disparaître. Cependant, à des temps plus courts (< 60 min), il est possible que l'agencement de la cellulose en microfibrilles enchevêtrées qui forme le PCL se désorganise puis gonfle sous l'action enzymatique, occupant un espace plus grand, et conduisant ainsi à un matériau équivalent moins dense - et donc moins atténuant - à la résolution du voxel. Cela expliquerait pourquoi le GL moyen du PCL (Figure 68) semble diminuer plus rapidement que le nombre de voxels dans les ROIs correspondants (Figure 69). Les données de la Figure 69 sont trop bruitées pour conclure strictement sur ce point, essentiellement parce que la résolution spatiale actuelle des images de tomographie n'est pas encore suffisante. Cependant, il semble raisonnable de supposer que le gonflement du PCL est la première étape de la dégradation enzymatique, ou du moins joue un rôle important au tout début de l'attaque enzymatique. Le cocktail commercial utilisé dans notre étude contient des hémicellulases, mais aussi un mélange de cellulases (endoglucanases (EG), cellobiohydrolases

(CBH) et glucosidases). Les EG et CBH sont connues pour pénétrer dans les fibres de cellulose et séparer les microfibrilles, perturbant ainsi la surface des fibres [147]. De plus, plusieurs protéines non catalytiques - qui peuvent également composer le cocktail commercial que nous avons utilisé - sont impliquées dans les changements de la structure des microfibrilles de cellulose, comme le pelage et la désorganisation, favorisant ainsi la déconstruction de la cellulose [148]. Le fait que les parois des cellules situées derrière le PCL ne subissent pas le même effet pourrait également venir de l'agencement des cellules, collées les unes aux autres, maintenant par ce réseau une cohésion plus forte des polymères des parois cellulaires. Ces hypothèses sur le mode d'action des enzymes sont renforcées par l'examen d'images obtenues par microscopie confocale, analogues à celles présentées sur la Figure 56 mais obtenues après attaque enzymatique (Cf. Chapitre 2 pour le protocole d'obtention).

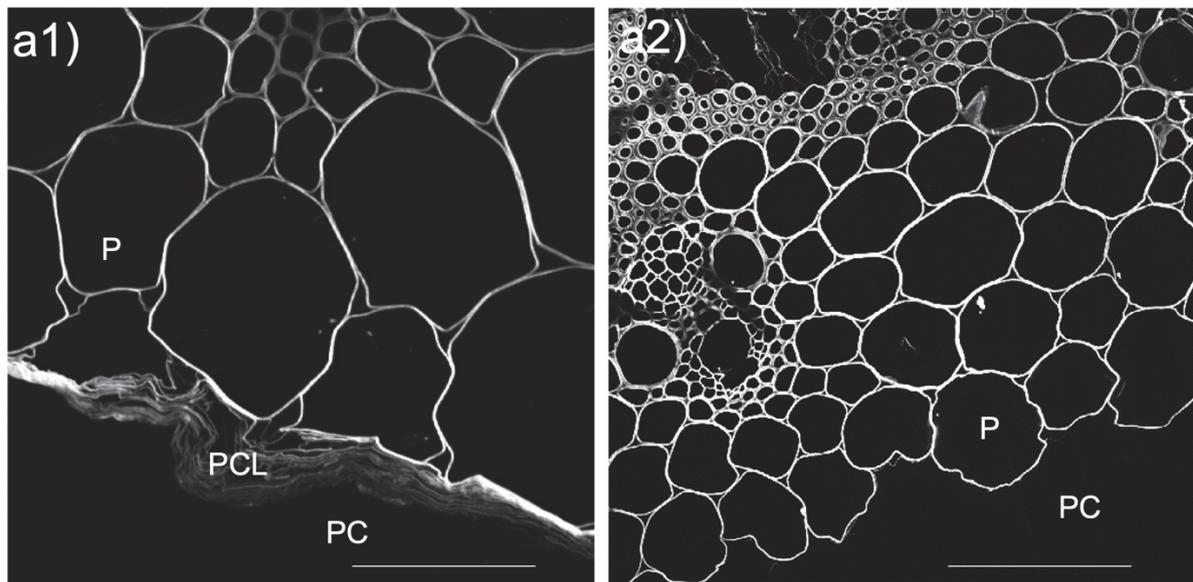


Figure 71 : Images confocales centrées sur le PCL et le parenchyme de la paille de blé. Échantillons de paille de blé exposés au cocktail enzymatique pendant 90 min (a1) et 24 h (a2). La barre d'échelle représente 30 μm pour a1 et 100 μm pour a2. P, parenchyme ; PCL, revêtement de la cavité médullaire (Pith Cavity Lining); PC, cavité médullaire.

Les durées d'exposition aux enzymes entre ces images et nos images tomographiques ne sont pas comparables (car le cocktail a été utilisé à une dilution 10 fois plus grande lors de la préparation des échantillons utilisés en imagerie confocale) mais on retrouve les deux situations que l'on vient de discuter. Aux temps courts, la délamination des feuillets composant le PCL est clairement visible sur la Figure 71.a : celui-ci occupe une portion de

l'espace plus grande et donc localement le matériau effectif est moins dense. Sur une coupe tomographique, les voxels correspondant seront moins clairs voire à la limite de détection. Sur la Figure 71.b, avec une durée d'exposition au cocktail enzymatique plus longue, le PCL a totalement disparu, restent les parois cellulaires de la première couche de cellule du parenchyme, qui ne sont pas encore dégradées. Pour faire le lien entre ces images confocales et les visualisations par tomographie, les Figures Figure 72 et Figure 73 mettent en correspondance les coupes tomographiques avec les images confocales de la Figure 71. Sur la Figure 72, pour un temps d'exposition au cocktail court, nous assimilons les régions du PCL moins claires que sur l'échantillon natif à une délamination locale, non résolue spatialement par la tomographie. A des temps d'exposition plus longs (Figure 73), on retrouve clairement à certains endroits des coupes tomographiques une disparition du parenchyme, comme vue en microscopie confocale.

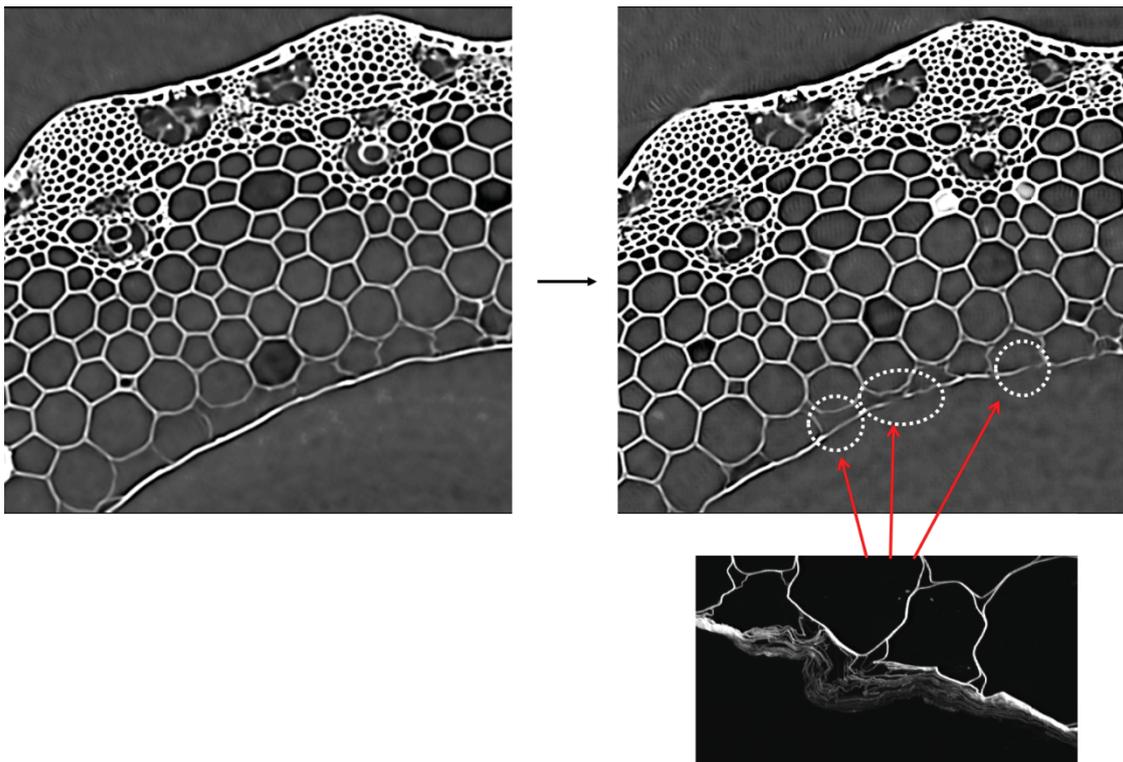


Figure 72 : Échantillon avec un temps de digestion de 30 minutes (natif à gauche et digéré à droite). La diminution localisée de l'intensité du PCL est attribuée à une délamination locale du PCL, non résolue en sur les images tomographiques. Sa signature est la baisse de la densité effective, et donc de l'atténuation, dans le voxel.

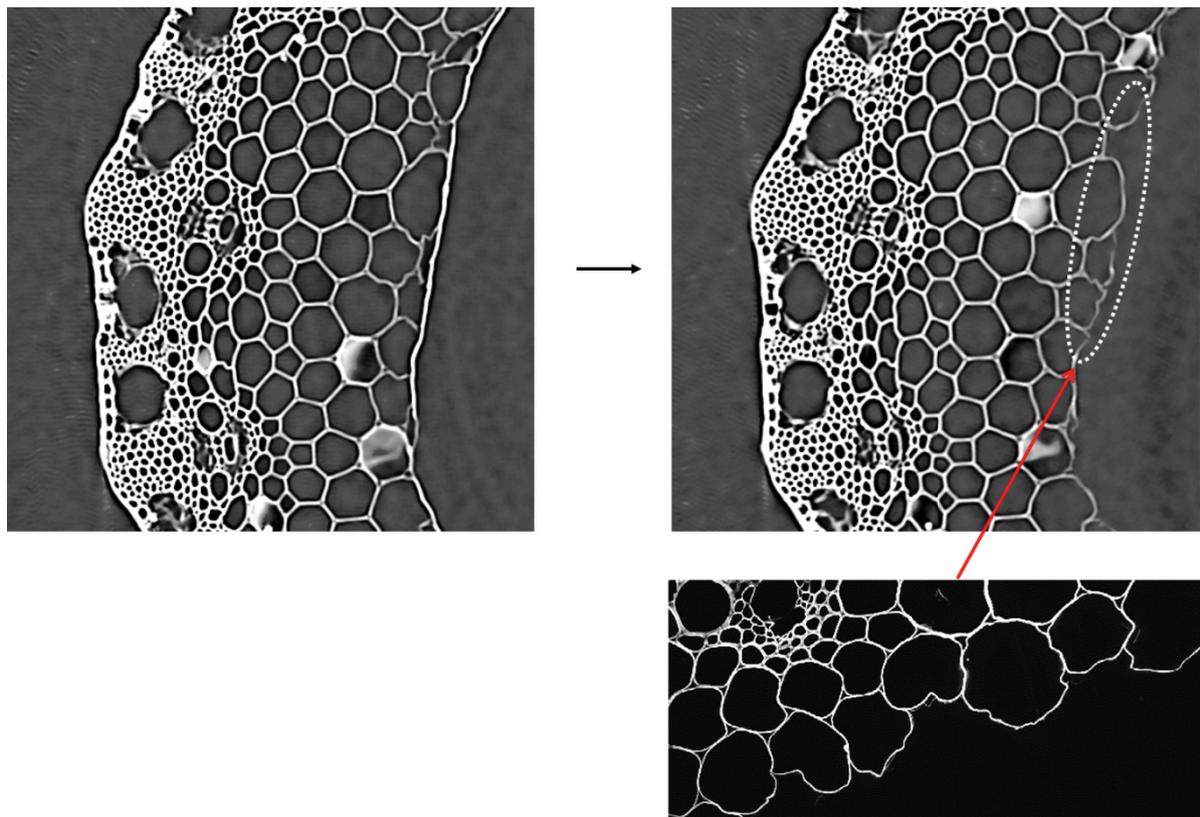


Figure 73 : Échantillon avec un temps de digestion de 45mn (natif à gauche et digéré à droite). Disparition du PCL et exposition des parois cellulaires des cellules du parenchyme les plus proches du bord intérieur de la paille.

Notre approche statistique utilise des données provenant de l'ensemble du volume de l'échantillon, ce qui est rendu possible par le grand volume reconstruit par tomographie à rayons X (équivalent à plusieurs centaines de coupes sériées classiques et à la hauteur de plusieurs cellules). Nous allons maintenant nous concentrer sur une zone donnée d'un échantillon et regarder son évolution suite à l'attaque enzymatique, cette approche locale complétant l'approche statistique et apportant son lot d'information.

4.3.3. Approche locale : un moyen de questionner l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique aux temps courts

4.3.3.i Une représentation 2D du PCL : observations qualitatives

Nous allons maintenant aller au-delà de l'analyse statistique des images de tomographie que nous venons de présenter et nous concentrer sur les changements structurels qui se produisent au niveau du PCL, avec une vision locale. Pour cela, nous produisons des images 2D du PCL en le « déroulant », après l'avoir pavé d'un ensemble de ROIs contiguës (ce traitement est explicité dans le Chapitre 1). Une procédure d'ajustement spatial permet de positionner les images 2D obtenues avant et après la digestion dans le même référentiel spatial (Chapitre 1). Comme nous nous concentrons sur le PCL, cette analyse ne peut être effectuée que si le PCL n'est pas fortement déconstruit, par exemple, avec des parois cellulaires manquantes car le mode d'obtention des images 2D requiert de pouvoir localiser celui-ci. Elle est donc limitée à de courtes durées d'exposition au cocktail enzymatique (≤ 45 min).

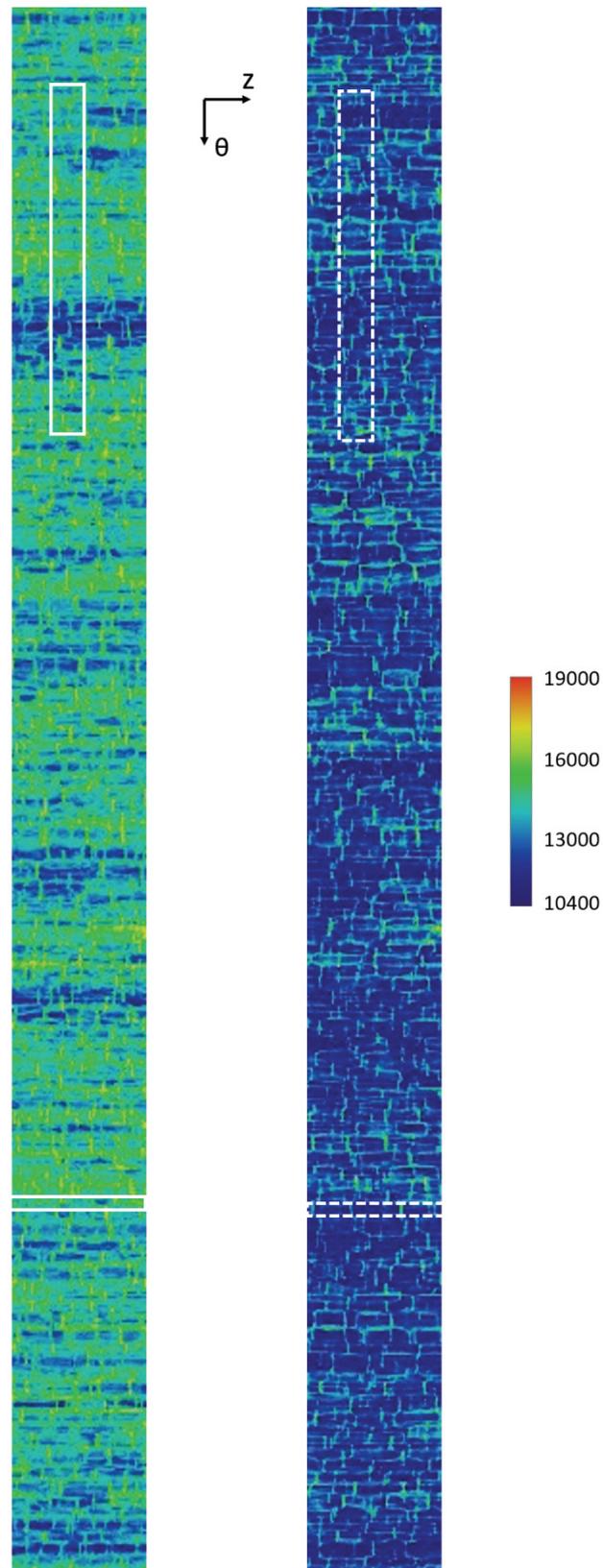


Figure 74 : Dégradation du PCL à l'échelle locale. Visualisations 2D de la surface interne d'un échantillon avant (à gauche) et après (à droite) 45 min d'exposition au cocktail enzymatique. La correspondance entre les niveaux de gris et la carte des couleurs est indiquée à droite.

La Figure 74 présente une visualisation 2D du PCL, pour l'échantillon natif (à gauche) et l'échantillon digéré (à droite, pour un temps de digestion de 45 min). L'échantillon est déroulé de haut en bas : la direction longitudinale z est indiquée entre les deux bandes 2D. L'échelle de couleur est identique à celle utilisée pour les rendus volumiques exposés plus tôt dans ce chapitre. Si on se concentre tout d'abord sur l'échantillon natif, à gauche, il est important de signaler la présence d'hétérogénéités de densité, à différentes échelles spatiales. À grande échelle, on peut discerner plusieurs bandes bleutées qui sont à peu près alignés avec l'axe longitudinal de l'échantillon, avec parfois une largeur variable, qui correspondent à des zones de faible densité. Un profil de niveau de gris le long de la direction θ , calculé sur le cadre blanc continu est représenté par une ligne continue sur la Figure 75.a. Il permet de visualiser l'impact, en termes de GLs, d'une telle hétérogénéité à grande échelle (position de la bande bleue). Si on revient sur les coupes tomographiques, on observe localement qu'en effet le PCL est moins clair, comme s'il avait déjà été digéré. Nous n'avons pas d'explication à proposer à cette observation, mais on peut noter qu'elle rend encore plus pertinente les observations à grande échelle permise par la tomographie X. Avec une échelle d'observation plus petite, on pourrait passer à côté, voire pire, focaliser une étude donnée avec une technique d'imagerie présentant un champ de vue restreint, justement à un endroit non représentatif. Si on revient sur l'image de gauche sur la Figure 74, à plus petite échelle, le réseau en treillis, composé de voxels plus denses (niveau de gris élevés, couleur tendant vers le jaune-vert) dont nous avons parlé au début de ce chapitre est clairement visible. Un profil le long de la direction z du cadre continu blanc positionné en bas de la bande native sur la Figure 74, montré en Figure 75.b reproduit bien une série de pics corrélés avec la traversée du treillis.

Le principal effet observé sur l'image après attaque enzymatique (Figure 74, à droite) et dans les profils extraits de cette image (lignes noires pointillées sur les Figure 75.a et b) est un abaissement global des valeurs de GL. Une inspection plus attentive révèle que les hétérogénéités à grande échelle sont atténuées après la digestion, avec un " lissage " du profil de la Figure 75.a, comme si les régions moins denses étaient moins affectées par la digestion enzymatique. Une autre caractéristique frappante est que le motif en treillis reste encore discernable sur l'échantillon digéré, mais avec des valeurs de GL plus faibles.

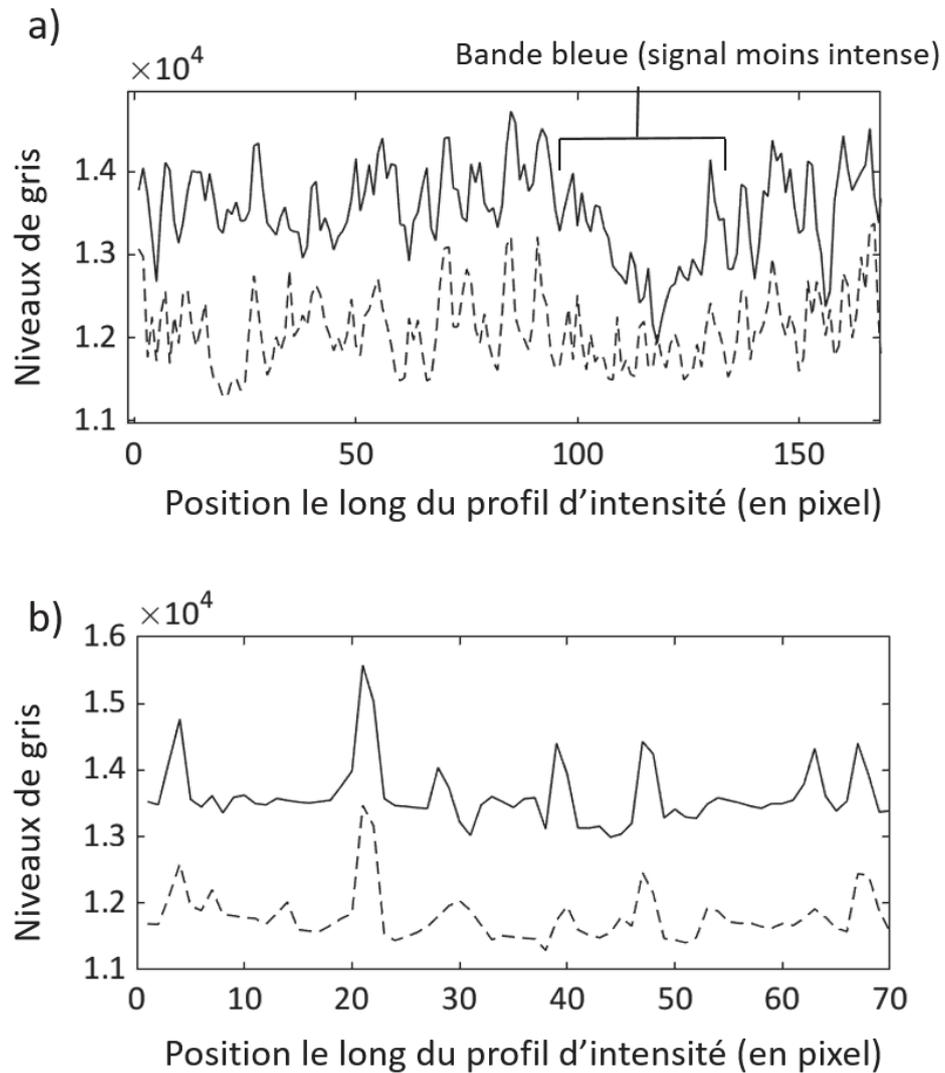


Figure 75 : Profils d'intensité (i.e. de niveau de gris) le long des deux rectangles définis sur la Figure 74. a) Sur le rectangle du haut, profils dans la direction θ (avant et après et après digestion, respectivement en courbe continue et pointillé). b) Sur le profil du bas, profils dans la direction longitudinale z (avant et après et après digestion, respectivement en courbe continue et pointillé.)

4.3.3.ii Représentation 2D du PCL : analyse des corrélations entre les images obtenues avant et après attaque enzymatique.

La Figure 74 et la Figure 75 montrent notamment que, malgré l'effet d'un traitement enzymatique de 45 min, une certaine corrélation spatiale subsiste entre les images 2D du PCL avant et après l'attaque. En d'autres termes, certaines des hétérogénéités originales de densité dans le PCL semblent être conservées après l'attaque.

Nous pouvons étudier ce phénomène plus précisément en analysant le changement des valeurs de GL en fonction de la densité initiale, à différents endroits du PCL. Pour ce faire, nous divisons tout d'abord la distribution de GLs en plusieurs tranches. Sur l'image initiale, nous classons tous les voxels tranche par tranche et pour chaque tranche on calcule la valeur moyenne ($\langle GL_i \rangle$, avant digestion). Tranche par tranche, on retrouve ces mêmes voxels sur l'image finale et on calcule leur valeur moyenne ($\langle GL \rangle$, après digestion).

Sur la Figure 76, nous traçons le rapport $\langle GL \rangle / \langle GL_i \rangle$ en fonction de $\langle GL_i \rangle$ pour deux traitements enzymatiques, c'est-à-dire 30 et 45 min (respectivement points de données noirs et rouges). Alors qu'avec l'approche statistique et ses résultats de la Figure 68, nous examinons l'évolution de $\langle GL \rangle / \langle GL_i \rangle$ sur l'ensemble du matériau PCW (ou plutôt un ensemble représentatif de ROIs localisées à différents endroits de l'échantillon), nous étudions ici l'évolution de ce paramètre à l'échelle locale, en fonction de la densité initiale dans des régions distinctes du PCL, par exemple, la structure maillée dense par rapport aux régions moins denses (par exemple, celles responsables des hétérogénéités à grande échelle vues sur la Figure 74, à gauche).

Sur la Figure 76, les valeurs du ratio obtenues après une réorganisation aléatoire des voxels des images finales sont également montrées (lignes pointillées). Les écarts observés par rapport au cas aléatoire indiquent une corrélation positive entre les GLs les plus élevés, respectivement les plus bas, sur l'image initiale et sur l'image finale. Cette corrélation est clairement marquée à 30 min. À 45 min, les différences ne sont significatives que pour les $\langle GL_i \rangle$ les plus élevés et les plus bas et les données tendent clairement vers le cas aléatoire. Cela suggère une perte de corrélation sur une grande partie de l'échantillon, ce qui correspond à la disparition de la plupart des caractéristiques structurelles distinctives du PCL.

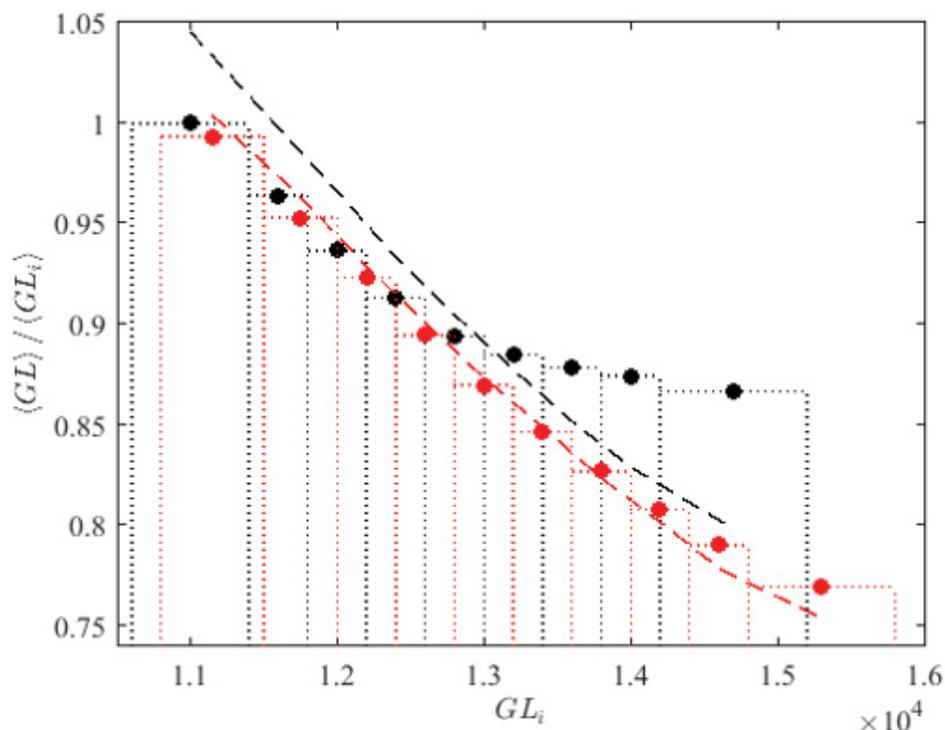


Figure 76 : Analyse de l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique. Rapport des valeurs de GL après et avant l'attaque enzymatique, $\langle GL \rangle / \langle GL_i \rangle$, en fonction des GLs de l'échantillon natif. Chaque point de données est obtenu en faisant la moyenne de tous les voxels dont la valeur initiale de GL appartient à la case correspondante, mise en évidence par les lignes pointillées verticales. Les lignes pointillées montrent le résultat obtenu avec un réagencement aléatoire de l'image obtenue après attaque enzymatique. Les lignes et les points de données noirs, respectivement rouges, correspondent à une durée d'attaque enzymatique de 30 minutes, respectivement 45 minutes.

Une autre façon d'examiner ces résultats est de tracer la valeur absolue de la différence entre les valeurs initiales et finales de GL, $|\langle GL \rangle - \langle GL_i \rangle|$, en fonction de $\langle GL_i \rangle$. Cette représentation offre une vision plus directe du processus car elle donne la perte réelle de densité dans le PCL pendant l'attaque enzymatique, elle est donnée sur la Figure 77. Une première observation importante est que les régions du PCL qui sont initialement les moins denses (~ 11000 en GL) ne montrent aucune perte de densité de masse par rapport à l'état initial. Cela suggère fortement que les enzymes n'ont aucune activité sur ces régions du PCL « lâches », moins denses, dans la période de temps étudiée. La raison de cette résistance est moins évidente mais repose très probablement sur le fait que le substrat des enzymes est absent ou n'est pas accessible à ces endroits précis. A des valeurs initiales de GL plus élevées (11000-13000), l'action enzymatique devient visible avec une perte de densité de masse qui augmente

linéairement avec $\langle GLi \rangle$. Il est alors clair que les enzymes peuvent agir sur ces régions plus denses du PCL. De plus, la pente de cette augmentation linéaire est très proche de 1, suggérant ainsi que les enzymes dégradent le PCL jusqu'à ce que sa structure et sa composition ressemblent à celles des régions « lâches » que nous venons d'évoquer, à GL 11000. De plus, la perte de densité est la même à 30 et 45 min de traitement enzymatique, ce qui indique que 30 min (ou moins) sont suffisantes pour atteindre cet état. Pour des valeurs initiales de GL plus élevées (> 13000), la perte de densité massique augmente encore linéairement avec la densité initiale dans le PCL après une attaque de 45 min. D'autre part, la digestion enzymatique de ces régions n'est clairement pas terminée à 30 min, avec des pertes de densité massique encore plus faibles qu'à 45 min. Pour plus de clarté, nous rappelons que la Figure 76 et les résultats associés proviennent de données obtenues avant que le PCL ne commence à disparaître des images ($t < 45$ min) - car une analyse similaire à l'échelle locale devient trop compliquée et risquée à des temps plus élevés. Par conséquent, les conclusions que nous tirons ne concernent que cette période de temps, mais suggèrent toujours que le PCL est attaqué par les enzymes jusqu'à ce qu'il atteigne un état donné avec une valeur GL de ~ 11000 . Après 45 minutes, le mécanisme de déconstruction est probablement différent d'un "simple" gonflement ou d'une perte de matière de la structure, avec le détachement possible de petits morceaux de PCL par exemple.

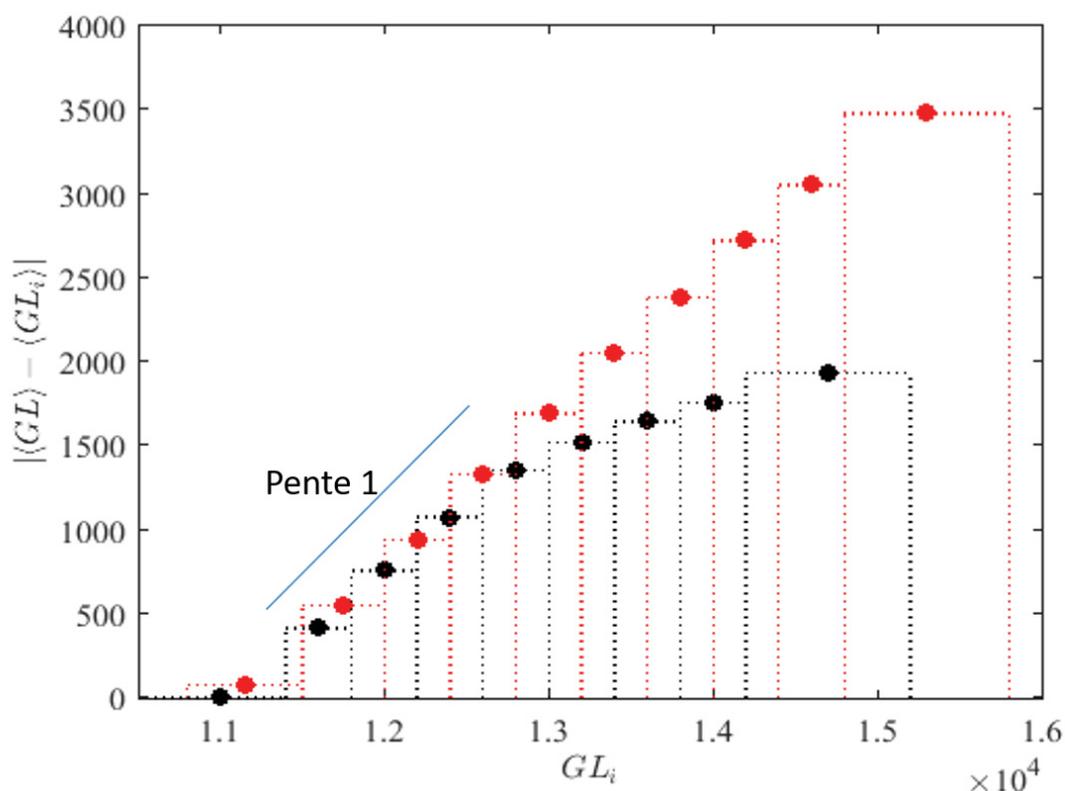


Figure 77 : Analyse de l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique. Valeur absolue de la différence entre les valeurs de GL après et avant l'attaque enzymatique, $|\langle GL \rangle - \langle GL_i \rangle|$ en fonction des GL de l'échantillon natif. Chaque point de données est obtenu en faisant la moyenne de tous les voxels dont la valeur initiale de GL appartient à la case correspondante, mise en évidence par les lignes pointillées verticales. Les lignes pointillées montrent le résultat obtenu avec un réagencement aléatoire de l'image obtenue après attaque enzymatique. Les lignes et les points de données noirs, respectivement rouges, correspondent à une durée d'attaque enzymatique de 30 minutes, respectivement 45 minutes.

4.4. Conclusion

Les résultats de ce Chapitre présentent une méthodologie d'analyse d'images 3D pour étudier la dégradation de la paille de blé par un cocktail enzymatique mélangeant des activités cellulosiques et hémicellulosiques. Une utilisation maximale des images tomographiques est réalisée, et nous nous sommes attachés à utiliser d'autres modalités d'imagerie pour confirmer l'interprétation de nos images tomographiques. En effet, la résolution spatiale de la tomographie est limitée mais elle est selon nous suffisante pour que l'utilisation des marqueurs de la dégradation que nous avons introduits soit pertinente. Par ailleurs, comme

déjà argumenté, elle nous semble être la seule à pouvoir traiter des échantillons réels, dans toute leur complexité, notamment dans leur hétérogénéité de structure et composition, à différentes échelles.

Nos résultats soulignent la pertinence de la tomographie à rayons X comme outil pour étudier la déconstruction enzymatique d'une biomasse lignocellulosique typique, la paille de blé. Cette technique d'imagerie est particulièrement bien adaptée pour révéler la modification des parois cellulaires végétales au sein de notre échantillon, à différentes étapes de la déconstruction enzymatique, tout en prenant en compte les hétérogénéités de l'échantillon en termes de structure et de composition, à différentes échelles de longueur. Dans le cas présent, en travaillant avec un échantillon de paille de blé brute, on montre que l'hydrolyse enzymatique se fait progressivement à partir du PCL alors que l'épiderme reste intact (à la résolution spatiale de la technique). Les marqueurs de dégradation sont extraits d'une analyse approfondie des images 3D et peuvent être utilisés pour suivre la cinétique de l'hydrolyse. De plus, les images 3D obtenues pour un échantillon donné peuvent être comparées à une échelle locale, avant et après la dégradation, révélant l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique, en fonction de l'emplacement sur le PCL, une paroi anatomique hautement hétérogène, en termes de densité du matériau.

Nous pensons donc que le travail présenté dans ce Chapitre est une première étape dans l'utilisation de la tomographie à rayons X afin de comprendre l'action des enzymes sur un substrat réel et dans des conditions plus en lien avec la réalité. L'analyse que nous effectuons - basée sur des outils et des concepts développés spécialement pour cette étude - peut clairement resservir en tant que modèle générique d'analyse, en se concentrant par exemple sur l'étude de l'action d'une ou plusieurs enzymes purifiées plutôt que des cocktails enzymatiques, et/ou la dégradation d'autres types de structures de biomasse végétale. Ces perspectives sont évoquées plus en détails dans la conclusion générale de ce manuscrit.

Références de la partie 1

1. Zoghalmi, A. & Paës, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front Chem* **7**, 874 (2019).
2. Roberts, M. J., Long, S. P., Tieszen, L. L. & Beadle, C. L. CHAPTER 1 - MEASUREMENT OF PLANT BIOMASS AND NET PRIMARY PRODUCTION. in *Techniques in Bioproduktivty and Photosynthesis (Second Edition)* (eds. Coombs, J., Hall, D. O., Long, S. P. & Scurlock, J. M. O.) 1–19 (Pergamon, 1985). doi:10.1016/B978-0-08-031999-5.50011-X.
3. Bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de céréales | Situation alimentaire mondiale | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>.
4. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. & Martínez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* **5**, 53–63 (2002).
5. Alex Berlin, No Barriers to Cellulose Breakdown. *Science* **342**, 1454-1456 (2013).
6. Collins, S. R. *et al.* Variation in the chemical composition of wheat straw: the role of tissue ratio and composition. *Biotechnology for Biofuels* **7**, 121 (2014).
7. Blackstock, J. C. CHAPTER 3 - Carbohydrates. in *Guide to Biochemistry* (ed. Blackstock, J. C.) 20–31 (Butterworth-Heinemann, 1989). doi:10.1016/B978-0-7236-1151-6.50009-1.
8. Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. & Shoham, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 548–557 (1998).
9. Theander, O. Cellulose, Hemicellulose and Extractives. in *Fundamentals of Thermochemical Biomass Conversion* (eds. Overend, R. P., Milne, T. A. & Mudge, L. K.) 35–60 (Springer Netherlands, 1985). doi:10.1007/978-94-009-4932-4_2.
10. Liu, C.-F. & Sun, R.-C. Chapter 5 - Cellulose. in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (ed. Sun, R.-C.) 131–167 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-444-53234-3.00005-5.
11. Madadi, M., Tu, Y., & Abbas, A. (2017). Recent status on enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Electron J Biol*, **13**(2), 135-143.

-
12. Ghaffar S H. (2018) Wheat Straw Biomass and its Anatomical Characteristics. *Food Nutr Current Res*, 1(2): 61-66.
 13. Rennie, E. A. & Scheller, H. V. Xylan biosynthesis. *Curr Opin Biotechnol* **26**, 100–107 (2014).
 14. Heinze, T. & Liebert, T. 10.05 - Celluloses and Polyoses/Hemicelluloses. in *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (eds. Matyjaszewski, K. & Möller, M.) 83–152 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00255-7.
 15. Hsieh, Y. S. Y. & Harris, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. *Mol Plant* **2**, 943–965 (2009).
 16. Pauly, M. & Keegstra, K. Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan. *Annu Rev Plant Biol* **67**, 235–259 (2016).
 17. Obel, N. *et al.* Microanalysis of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Molecular Plant* **2**, 922–932 (2009).
 18. Scheller, H. V. & Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 263–289 (2010).
 19. Ebringerová, A., Hromádková, Z. & Heinze, T. Hemicellulose. in *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (ed. Heinze, T.) 1–67 (Springer, 2005). doi:10.1007/b136816.
 20. Moreira, L. R. S. & Filho, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**, 165–178 (2008).
 21. Kozlova, L. V., Ageeva, M. V., Ibragimova, N. N. & Gorshkova, T. A. Arrangement of mixed-linkage glucan and glucuronoarabinoxylan in the cell walls of growing maize roots. *Ann Bot* **114**, 1135–1145 (2014).
 22. Bonnin, E., Garnier, C. & Ralet, MC. Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 519–532 (2014)
 23. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 519–546 (2003).
 24. Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. & Boerjan, W. Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 278–285 (2008).
 25. Bertella, Stefania, and Jeremy S. Luterbacher. "Lignin functionalization for the production of novel materials." *Trends in Chemistry* 2.5 (2020): 440-453

-
26. San Clemente, H., Kolkas, H., Canut, H. & Jamet, E. Plant Cell Wall Proteomes: The Core of Conserved Protein Families and the Case of Non-Canonical Proteins. *Int J Mol Sci* **23**, 4273 (2022).
 27. Jamet, E. *et al.* Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics* **8**, 893–908 (2008).
 28. Cosgrove, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 162–172 (2015).
 29. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**, D490-495 (2014).
 30. Savelli, B. *et al.* RedoxiBase: A database for ROS homeostasis regulated proteins. *Redox Biol* **26**, 101247 (2019).
 31. van der Hoorn, R. A. L. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 191–223 (2008).
 32. Schaller, A. *et al.* From structure to function - a family portrait of plant subtilases. *New Phytol* **218**, 901–915 (2018).
 33. Edstam, M. M., Viitanen, L., Salminen, T. A. & Edqvist, J. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Mol Plant* **4**, 947–964 (2011).
 34. Seifert, G. J. & Roberts, K. The biology of arabinogalactan proteins. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 137–161 (2007).
 35. Bellande, K., Bono, J.-J., Savelli, B., Jamet, E. & Canut, H. Plant Lectins and Lectin Receptor-Like Kinases: How Do They Sense the Outside? *Int J Mol Sci* **18**, 1164 (2017).
 36. Chen, Y. *et al.* Identification of the Abundant Hydroxyproline-Rich Glycoproteins in the Root Walls of Wild-Type Arabidopsis, an ext3 Mutant Line, and Its Phenotypic Revertant. *Plants (Basel)* **4**, 85–111 (2015).
 37. Paniagua, C. *et al.* Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. *J Exp Bot* **68**, 3287–3301 (2017)
 38. Bornscheuer, U., Buchholz, K., Seibel, J., 2014. Enzymatic degradation of (ligno)cellulose. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 10876–1089
 39. McNeil, M., Darvill, A.C., Fry, S.C., Peter, A., 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625–663.

-
40. Shallom-Shezifi, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–228.
 41. Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res.* 2011, 1–17.
 42. Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Chakrit Tachaapaikoon, Kyu, K.L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y., 2013. Paenibacillus curdlanolyticus strain B-6 multienzyme complex: a novel system for biomass utilization, in: *Biomass Now*. pp. 369–39
 43. Loqué, D., Scheller, H. V., & Pauly, M. (2015). Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Current opinion in plant biology*, 25, 151-161
 44. Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859).
 45. Amos, R. A. & Mohnen, D. Critical Review of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Glycosyltransferase Activities Verified by Heterologous Protein Expression. *Front Plant Sci* 10, 915 (2019).
 46. Lopes, A. M., Ferreira Filho, E. X. & Moreira, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *J Appl Microbiol* 125, 632–645 (2018).
 47. Gilbert, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol* 153, 444–455 (2010).
 48. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry* 59, 1–41 (2015).
 49. Wilson, D. B. Cellulases. in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (ed. Schaechter, M.) 252–258 (Academic Press, 2009). doi:10.1016/B978-012373944-5.00138-3.
 50. Knowles, J., Lehtovaara, P. & Teeri, T. Cellulase families and their genes. *Trends in Biotechnology* 5, 255–261 (1987).
 51. Juy, M., Amit, A.G., Alzari, P.M., Poljak, R.J., Claeysens, M., Béguin, P., Aubert, J.-P., 1992. Three- dimensional structure of a thermostable bacterial cellulase. *Nature* 357, 89–91
 52. Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T.T., Knowles, J.K.C., Jones, T.A., 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* (80-.). 249, 380–386.
 53. de Souza, T. S. P. & Kawaguti, H. Y. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food Bioprocess Technol* 14, 1446–1477 (2021).
 54. Polizeli, M. L. T. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl*

-
- Microbiol Biotechnol* **67**, 577–591 (2005).
55. Thomas, L., Joseph, A., Singhania, R. R., Patel, A. K. & Pandey, A. 6 - Industrial Enzymes: Xylanases. in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (eds. Pandey, A., Negi, S. & Soccol, C. R.) 127–148 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00006-3.
56. Bonechi, C. *et al.* 1 - Biomass: An overview. in *Bioenergy Systems for the Future* (eds. Dalena, F., Basile, A. & Rossi, C.) 3–42 (Woodhead Publishing, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-101031-0.00001-6.
57. Shallom, D. & Shoham, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 219–228 (2003).
58. Moreira, L. R. S., Milanezi, N. vG. & Filho, E. X. F. Enzymology of Plant Cell Wall Breakdown: An Update. in *Routes to Cellulosic Ethanol* (eds. Buckeridge, M. S. & Goldman, G. H.) 73–96 (Springer, 2011). doi:10.1007/978-0-387-92740-4_6.
59. Liberato, M. V. *et al.* Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an induced-fit enzymatic mechanism. *Sci Rep* **6**, 23473 (2016).
60. Gilmore, S. P., Lillington, S. P., Haitjema, C. H., de Groot, R. & O'Malley, M. A. Designing chimeric enzymes inspired by fungal cellulosomes. *Synthetic and Systems Biotechnology* **5**, 23–32 (2020).
61. Fan, Z., Werkman, J.R. & Yuan, L. Engineering of a multifunctional hemicellulase. *Biotechnol Lett* **31**, 751–757 (2009)
62. Hervé, C., Rogowski, A., Gilbert, H. J. & Paul Knox, J. Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *Plant J* **58**, 413–422 (2009).
63. Zeng, Y. *et al.* In situ label-free imaging of hemicellulose in plant cell walls using stimulated Raman scattering microscopy. *Biotechnol Biofuels* **9**, 256 (2016).
64. Devaux, M.-F. *et al.* Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**, (2018).
65. Zoghalmi, A. & Paës, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front Chem* **7**, 874 (2019).
66. Herbaut, M. *et al.* Multimodal analysis of pretreated biomass species highlights generic

-
- markers of lignocellulose recalcitrance. *Biotechnol Biofuels* **11**, 52 (2018).
67. Badruna, L. *et al.* The Jo-In protein welding system is a relevant tool to create CBM-containing plant cell wall degrading enzymes. *New Biotechnology* **65**, 31–41 (2021).
68. Zhang, L., Larsson, A., Moldin, A. & Edlund, U. Comparison of lignin distribution, structure, and morphology in wheat straw and wood. *Industrial Crops and Products* **187**, 115432 (2022).
69. Harper, S. H. T. & Lynch, J. M. The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32**, 1057–1062 (1981).
70. Khan, T. & Mubeen, U. Wheat straw: a pragmatic overview. in (2012).
71. Xu, F. Chapter 2 - Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition. in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (ed. Sun, R.-C.) 9–47 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-444-53234-3.00002-X.
72. Motte, J.-C. *et al.* Morphological structures of wheat straw strongly impacts its anaerobic digestion. *Industrial Crops and Products* **52**, 695–701 (2014).
73. Nassar, R. M. A. *et al.* Physiological and Anatomical Mechanisms in Wheat to Cope with Salt Stress Induced by Seawater. *Plants (Basel)* **9**, 237 (2020).
74. Hansen, M. A. T., Kristensen, J. B., Felby, C. & Jørgensen, H. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) – The impact of lignin relocation and plant tissues on enzymatic accessibility. *Bioresource Technology* **102**, 2804–2811 (2011).
75. Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., 2010. Plant cell walls from chemistry to biology.
76. Ghaffar, S. H. & Fan, M. Revealing the morphology and chemical distribution of nodes in wheat straw. *Biomass and Bioenergy* **77**, 123–134 (2015).
77. McKean, W.T., Jacobs, R.S., 1997. Wheat straw as a paper fiber source, Washington, USA: Clean Washington Center.
78. Evert, R.F., 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development, third ed. John Wiley & Sons. Wiley Online Library.
79. Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2007. The angiosperm plant body: structure and development. *Biology of Plants*, seventh ed. W.H. Freeman & Company/Worth
80. Hornsby, P.R., Hinrichsen, E., Tarverdi, K., 1997. Preparation and properties of

-
- polypropylene composites reinforced with wheat and flax straw fibres Part I Fibre characterization. *J. Mater. Sci.* **32**, 443–449.
81. Zhang, Y., Lu, X., Pizzi, A. & Delmotte, L. Wheat straw particleboard bonding improvements by enzyme pretreatment. *Holz als Roh- und Werkstoff* **61**, 49–54 (2003).
82. LAZAR, T. Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Ann Bot* **91**, 750–751 (2003).
83. Casero, P. J. & Knox, J. P. The monoclonal antibody JIM5 indicates patterns of pectin deposition in relation to pit fields at the plasma-membrane-face of tomato pericarp cell walls. *Protoplasma* **188**, 133–137 (1995).
84. Jeffries, T. W. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 337–342 (1996).
85. Puls, J. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia* **120**, 183–196 (1997).
86. Bacic, A., Harris, P. J. & Stone, B. A. 8 - Structure and Function of Plant Cell Walls. in *The Biochemistry of Plants* (ed. Preiss, J.) 297–371 (Academic Press, 1988). doi:10.1016/B978-0-08-092615-5.50014-X.
87. Zhao, Y., Man, Y., Wen, J., Guo, Y. & Lin, J. Advances in Imaging Plant Cell Walls. *Trends Plant Sci* **24**, 867–878 (2019).
88. Geitmann, A. Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 693–699 (2010).
89. Monniaux, M. & Hay, A. Cells, walls, and endless forms. *Curr Opin Plant Biol* **34**, 114–121 (2016).
90. Knox, J. P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 308–313 (2008).
91. Non-Newtonian Flow and Applied Rheology. (2008). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-7506-8532-0.x0001-7.
92. Deng, F. *et al.* Effect of Cu on Pore Structure of Al–Si Foam. *Met. Mater. Int.* **27**, 5239–5246 (2021).
93. Read, S. M. & Bacic, A. Cell Wall Porosity and Its Determination. in *Plant Cell Wall Analysis* (eds. Linskens, H. F. & Jackson, J. F.) 63–80 (Springer, 1996). doi:10.1007/978-3-642-60989-3_4.
94. Hubbard, J. D., Lui, A. & Landry, M. P. Multiscale and multidisciplinary approach to

-
- understanding nanoparticle transport in plants. *Current Opinion in Chemical Engineering* **30**, 135–143 (2020).
95. Stanish, M. A., Schajer, G. S. & Kayihan, F. A mathematical model of drying for hygroscopic porous media. *AIChE Journal* **32**, 1301–1311 (1986).
96. Penvern, H. *et al.* How Bound Water Regulates Wood Drying. *Phys. Rev. Appl.* **14**, 054051 (2020).
97. Le, K. H., Tsotsas, E. & Kharaghani, A. Continuum-scale modeling of superheated steam drying of cellular plant porous media. *International Journal of Heat and Mass Transfer* **124**, 1033–1044 (2018).
98. Dadmohammadi, Y. & Datta, A. K. Food as porous media: a review of the dynamics of porous properties during processing. *Food Reviews International* **38**, 953–985 (2022).
99. Somssich, M. A Short History of Plant Light Microscopy. *Curr Protoc* **2**, e577 (2022).
100. Hooke, R. (1665). *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses: With observations and inquiries thereupon.* In *Micrographia.* The Royal Society. doi: 10.5962/bhl.title.904
101. Grew, N. (1682). *The anatomy of plants - with an idea of a philosophical history of plants, and several other lectures, read before the Royal Society.* In *The Anatomy of Plants.* W. Rawlins. doi: 10.5962/bhl.title.4]
102. Brisseau de Mirbel, C.-F. (1802). *Traité d'anatomie et de physiologie végétales. In Traité d'anatomie et de physiologie végétales (Vol. 1). De l'Imprimerie de F. Dufart.* Retrieved from <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k96223400.texteImage> ;
103. Brisseau de Mirbel, C.-F. (1808). *Exposition et défense de ma théorie de l'organisation végétale. In Exposition et défense de ma théorie de l'organisation végétale. Les Frères van Cleef.* Retrieved from <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9611708k.r=MirbelExpositiondelathoriedelorga>
104. Brisseau de Mirbel, C.-F. (1835). *Recherches anatomiques et physiologiques sur le Marchantia polymorpha, pour servir a l'histoire du tissu cellulaire, de l'épiderme et des stomates. Mémoires de l'Académie Royale Societie de l'Institut de France, 13, 1–123.* doi: [10.3931/e-rara-24278](https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9611708k.r=MirbelExpositiondelathoriedelorga)]
105. Legland, D., Devaux, M.-F. & Guillon, F. Quantitative imaging of plants: multi-scale data for better plant anatomy. *Journal of Experimental Botany* **69**, 343–347 (2018).
106. Grossmann, G. *et al.* Green light for quantitative live-cell imaging in plants. *J Cell Sci*

-
- 131**, jcs209270 (2018).
107. Walia, A., Waadt, R. & Jones, A. M. Genetically Encoded Biosensors in Plants: Pathways to Discovery. *Annu Rev Plant Biol* **69**, 497–524 (2018).
108. How Fluorescence Microscopy Works - FR. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/how-fluorescence-microscopy-works.html>.
109. Tang, W. *et al.* Revealing migration discipline of lignin during producing fermentable sugars from wheat straw through autohydrolysis. *Industrial Crops and Products* **171**, 113849 (2021).
110. Donaldson, L. Autofluorescence in Plants. *Molecules* **25**, 2393 (2020).
111. Hansen, M. A. *et al.* Enzyme affinity to cell types in wheat straw (*Triticum aestivum* L.) before and after hydrothermal pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* **6**, 54 (2013).
112. Hervé, C., Rogowski, A., Gilbert, H. J. & Paul Knox, J. Enzymatic treatments reveal differential capacities for xylan recognition and degradation in primary and secondary plant cell walls. *Plant J* **58**, 413–422 (2009).
113. Zeng, Y. *et al.* In situ label-free imaging of hemicellulose in plant cell walls using stimulated Raman scattering microscopy. *Biotechnol Biofuels* **9**, 256 (2016).
114. Devaux, M.-F. *et al.* Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**, (2018).
115. Herbaut, M. *et al.* Multimodal analysis of pretreated biomass species highlights generic markers of lignocellulose recalcitrance. *Biotechnol Biofuels* **11**, 52 (2018).
116. Bayguinov, P. O. *et al.* Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Current Protocols in Cytometry* **85**, e39 (2018).
117. Liu, L., Qian, C., Jiang, L. & Yu, H.-Q. Direct Three-Dimensional Characterization and Multiscale Visualization of Wheat Straw Deconstruction by White Rot Fungus. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 9819–9825 (2014).
118. Truernit, E. *et al.* High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**, 1494–1503 (2008).

-
119. Stuppy WH, Maisano JA, Colbert MW, Rudall PJ, Rowe TB, 2003, Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography. *Trends in Plant Science* 8, 2–6
 120. Cloetens P, Mache R, Schlenker M, Lerbs-Mache S. 2006. Quantitative phase tomography of Arabidopsis seeds reveals intercellular void network. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103, 14626–14630
 121. Dhondt S, Vanhaeren H, Van Loo D, Cnudde V, Inzé D. 2010. Plant structure visualization by high-resolution X-ray computed tomography. *Trends in Plant Science* 15, 419–422
 122. Staedler YM, Masson D, Schönenberger J. 2013. Plant tissues in 3D via X-ray tomography: simple contrasting methods allow high resolution imaging. *PLoS One* 8, e75295.
 123. Staedler YM, Kreisberger T, Manafzadeh S, Chartier M, Handschuh S, Pamperl S, Sontag S, Paun O, Schönenberger J. 2018. Novel computed tomography-based tools reliably quantify plant reproductive investment. *Journal of Experimental Botany* 69,
 124. Derome, D., Griffa, M., Koebel, M. & Carmeliet, J. Hysteretic swelling of wood at cellular scale probed by phase-contrast X-ray tomography. *Journal of Structural Biology* **173**, 180–190 (2011).
 125. Suuronen, J.-P., Peura, M., Fagerstedt, K. & Serimaa, R. Visualizing water-filled versus embolized status of xylem conduits by desktop x-ray microtomography. *Plant Methods* **9**, 11 (2013).
 126. Torres-Ruiz, J. M., Cochard, H., Mencuccini, M., Delzon, S. & Badel, E. Direct observation and modelling of embolism spread between xylem conduits: a case study in Scots pine. *Plant, Cell & Environment* **39**, 2774–2785 (2016).
 127. Yancy-Caballero, D., Ling, L. Y., Archilha, N. L., Ferreira, J. E. & Driemeier, C. Mineral Particles in Sugar Cane Bagasse: Localization and Morphometry Using Microtomography Analysis. *Energy Fuels* **31**, 12288–12296 (2017).
 128. Montanier, C. *et al.* Evidence that family 35 carbohydrate binding modules display conserved specificity but divergent function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 3065–3070 (2009).
 129. Présentation à l'ESRF de L.Paolasini, Interaction X-Ray Matter, 2016

-
130. Wang, X. *et al.* Material separation in x-ray CT with energy resolved photon-counting detectors: Material separation with energy resolved photon-counting detectors. *Med. Phys.* **38**, 1534–1546 (2011).
131. Takeya, S. *et al.* X-Ray attenuation and image contrast in the X-ray computed tomography of clathrate hydrates depending on guest species. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 27658–27665 (2020).
132. Document de formation interne RX Solutions
133. Withers, P. J. *et al.* X-ray computed tomography. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 18 (2021).
134. Cakmak, E. *et al.* Non-destructive characterization of additively manufactured components with x-ray computed tomography for part qualification: A study with laboratory and synchrotron x-rays. *Materials Characterization* **173**, 110894 (2021).
135. Rini, J. M. & Watson, R. C. Target Material for Mammographic X-Ray Tubes. **106**, 5 (1973).
136. Murao, S., Ohyama, K. & Arai, M. β -Amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**, 719–726 (1979).
137. Liu, B. & Liu, J. Overview of image noise reduction based on non-local mean algorithm. *MATEC Web Conf.* **232**, 03029 (2018).
138. Buades, A., Coll, B. & Morel, J.-M. A non-local algorithm for image denoising. in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)* vol. 2 60–65 vol. 2 (2005).
139. Débruitage par patchs. *Wikipédia* (2020).
140. Phalempin, M., Lippold, E., Vetterlein, D. & Schlüter, S. An improved method for the segmentation of roots from X-ray computed tomography 3D images: Routine v.2. *Plant Methods* **17**, 39 (2021).
141. Segmentation d'image. *Wikipédia* (2022).
142. Botany of the wheat plant - E.J.M. Kirby. <https://www.fao.org/3/Y4011e/y4011e05.htm>.
143. Marjamaa, K. & Kruus, K. Enzyme biotechnology in degradation and modification of plant cell wall polymers. *Physiologia Plantarum* **164**, 106–118 (2018).
144. Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B. & Recous, S. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant Soil* **281**, 291–307

-
- (2006).
145. Dresbøll, D. B. & Magid, J. Structural changes of plant residues during decomposition in a compost environment. *Bioresource Technology* **97**, 973–981 (2006).
 146. Kim, K. H. & Kim, C. S. Recent Efforts to Prevent Undesirable Reactions From Fractionation to Depolymerization of Lignin: Toward Maximizing the Value From Lignin. *Frontiers in Energy Research* **6**, (2018).
 147. Lee, I., Evans, B. R. & Woodward, J. The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **82**, 213–221 (2000).
 148. Arantes, V. & Saddler, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* **3**, 4 (2010).

Partie 2 :

**Impact de l'hydrolyse
enzymatique sur les
propriétés effectives de la
paille de blé : le cas du
transport diffusif**

Table des matières détaillée - Partie 2

Chapitre 1. Introduction et éléments bibliographiques	161
1.1. État des lieux suite à l'étude par tomographie X	161
1.2. Une expérience d'élution pour aller plus loin : principe et idée conceptuelle	163
1.3. Une expérience d'élution pour caractériser l'action enzymatique à l'échelle submicronique	166
Chapitre 2. Dispositif expérimental.....	Error! Bookmark not defined.
2.1. Mesure de concentration par radiographie X	169
2.1.1. Utilisation de la radiographie X	169
2.1.2. Expériences préliminaires avec une solution de KI : calibration	169
2.1.3. Autres traceurs radio-opacifiants	173
2.2. Protocole et dispositif expérimental	174
2.2.1. Préparation des échantillons	174
2.2.2. Bioréacteur	177
2.2.3. Fluidique et protocole	177
2.2.4. Prise des radiographies et utilisation du tomographe à rayons X	180
2.3. Conclusions	182
Chapitre 3. Modélisations : théorie et interprétation des données expérimentales ...	183
3.1. Modèle de transport du traceur au sein de la paille	183
3.2. Modélisation du signal recueilli par radiographie X et comparaison avec les données expérimentales	187
3.2.1. Profil d'intensité : une mesure simple de l'épaisseur de la paille	187
3.2.2. Modélisation du signal : atténuation	191
3.2.3. Modélisation du signal vs mesures expérimentales	198
3.3. Conclusions	203
Chapitre 4. Résultats expérimentaux et discussion	205
4.1. Résultats obtenus en utilisant le iodure de potassium comme traceur	205

4.2.	Autres traceurs : gastrografine, visipaque et ioméron.	209
4.2.1.	Gastrografine®	210
4.2.2.	Visipaque et ioméron.....	214
4.2.3.	Conclusions sur l'utilisation de ces traceurs	215
4.3.	Conclusions et perspectives.....	215
	Conclusion générale et perspectives.....	219
	Annexe 1 : Pré-étude par FPCL.....	224
	Description du montage expérimental	228
	Traceurs et détecteur.....	228
	Intégration du broyat de paille de blé.....	228
	Montage général	229
	Déroulement d'une expérience	230
	Résultats préliminaires.....	232
	Références de la partie 2.....	235

Chapitre 1. Introduction et éléments bibliographiques

1.1. État des lieux suite à l'étude par tomographie X

Comme vu dans la partie précédente, notre étude par tomographie X a permis de mettre en évidence des modifications structurelles de nos échantillons de paille blé, consécutives à la dégradation enzymatique. Ces modifications sont cohérentes avec celles observées par d'autres techniques d'imagerie et reportées dans la littérature. Les avantages de la tomographie X ont déjà été mentionnés : cette technique permet d'imager des échantillons réellement 3D, sans préparation spécifique et permet donc de proposer aux enzymes un substrat « proche » de celui qu'elles sont amenées à dégrader dans la Nature.

Cependant, la principale limitation de cette technique est sa résolution spatiale. La taille de voxels est $1,25 \mu\text{m}^3$ dans nos expériences. On pourrait descendre à quelques centaines de nanomètres, en utilisant une source nano-foyer plus récente que celle installée sur l'appareil employé, mais cela nécessiterait probablement de découper l'échantillon en bandes longitudinales afin de l'approcher à quelques millimètres (2-3 mm) de la source. Seule l'utilisation d'un rayonnement synchrotron permettrait de descendre en taille de voxels tout en imageant la totalité d'un échantillon. Cette résolution limitée ne permet pas de sonder toutes les évolutions induites dans l'échantillon par l'action des enzymes. Par ailleurs la tomographie ne renseigne pas sur la composition chimique des parois végétales.

Des observations en microscopie confocale, réalisées en collaboration avec Alain Jauneau antérieurement à ce travail de thèse à l'aide d'un marquage au calcofluor, spécifique de la cellulose (Chapitre 2, §2.3), ont mis en évidence une diminution de la fluorescence (et donc de la teneur en cellulose) dans toute l'épaisseur de la paille de blé après hydrolyse enzymatique par le cocktail Cellic HTEC2, du parenchyme à l'épiderme. Donc même dans des tissus bien éloignés du PCL, à un endroit où les marqueurs de dégradation issus de la tomographie ne révèlent aucune évolution. Ceci peut être apprécié de manière qualitative sur

la Figure 1, où l'échantillon de droite, ayant subi une dégradation enzymatique, est clairement moins lumineux que le contrôle présenté à gauche (NB : la dégradation enzymatique a été effectuée sur des échantillons de paille de blé préparés dans des conditions similaires à celles employées pour les expériences de tomographie).

Le même type d'observation est présenté sur la Figure 2 où un marquage de l'arabinoxylane, un polymère de la famille des hémicelluloses caractéristique de la paille de blé (donc ciblé par le cocktail enzymatique), est effectué par un anticorps portant un fluorophore. Par rapport à l'image issue du contrôle, on remarque globalement que l'échantillon traité avec le cocktail est moins lumineux. Outre la disparition du PCL, on a également un gradient d'intensité dans l'épaisseur de la paille, ce qui tend à montrer que la dégradation enzymatique s'est produite au-delà des premières couches de cellules du parenchyme.

Si les techniques à notre disposition ne permettent pas de quantifier / caractériser une action des enzymes qui aurait lieu à l'échelle submicronique, on peut néanmoins s'interroger sur son impact sur les propriétés de la paille.

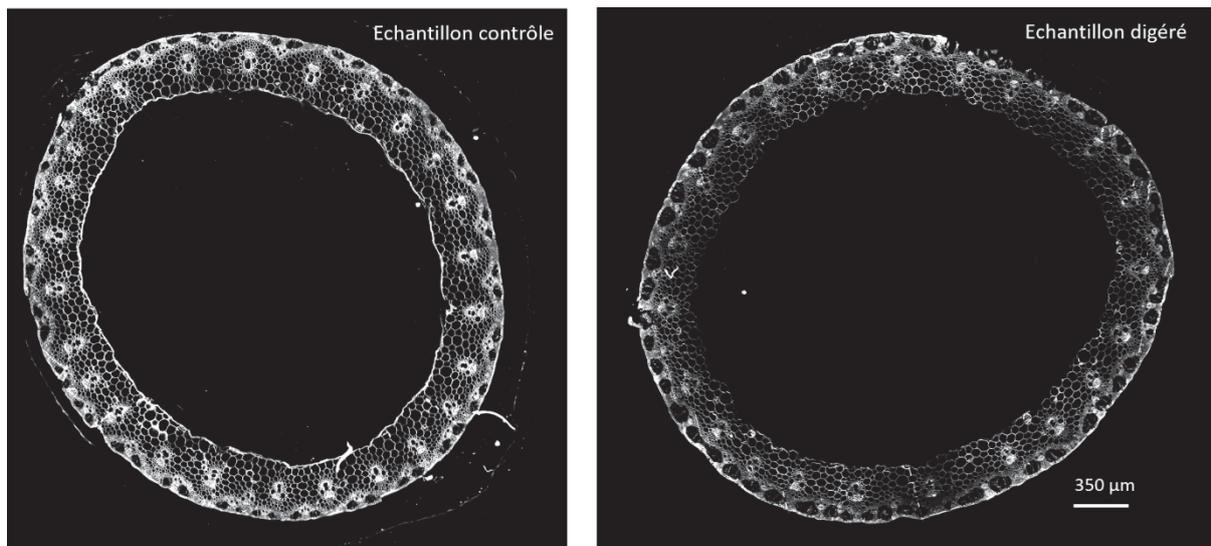


Figure 1 : Images confocale avec marqueurs de la cellulose (calcofluor), voir détails en §2.3. L'échantillon digérée par le cocktail enzymatique Cellic HTEC2 à droite a été soumis à l'action du cocktail durant 24h, alors que celui de gauche est un contrôle incubé en absence d'enzymes. La technique d'imagerie étant destructive, il ne s'agit pas de coupes issues d'un même échantillon.

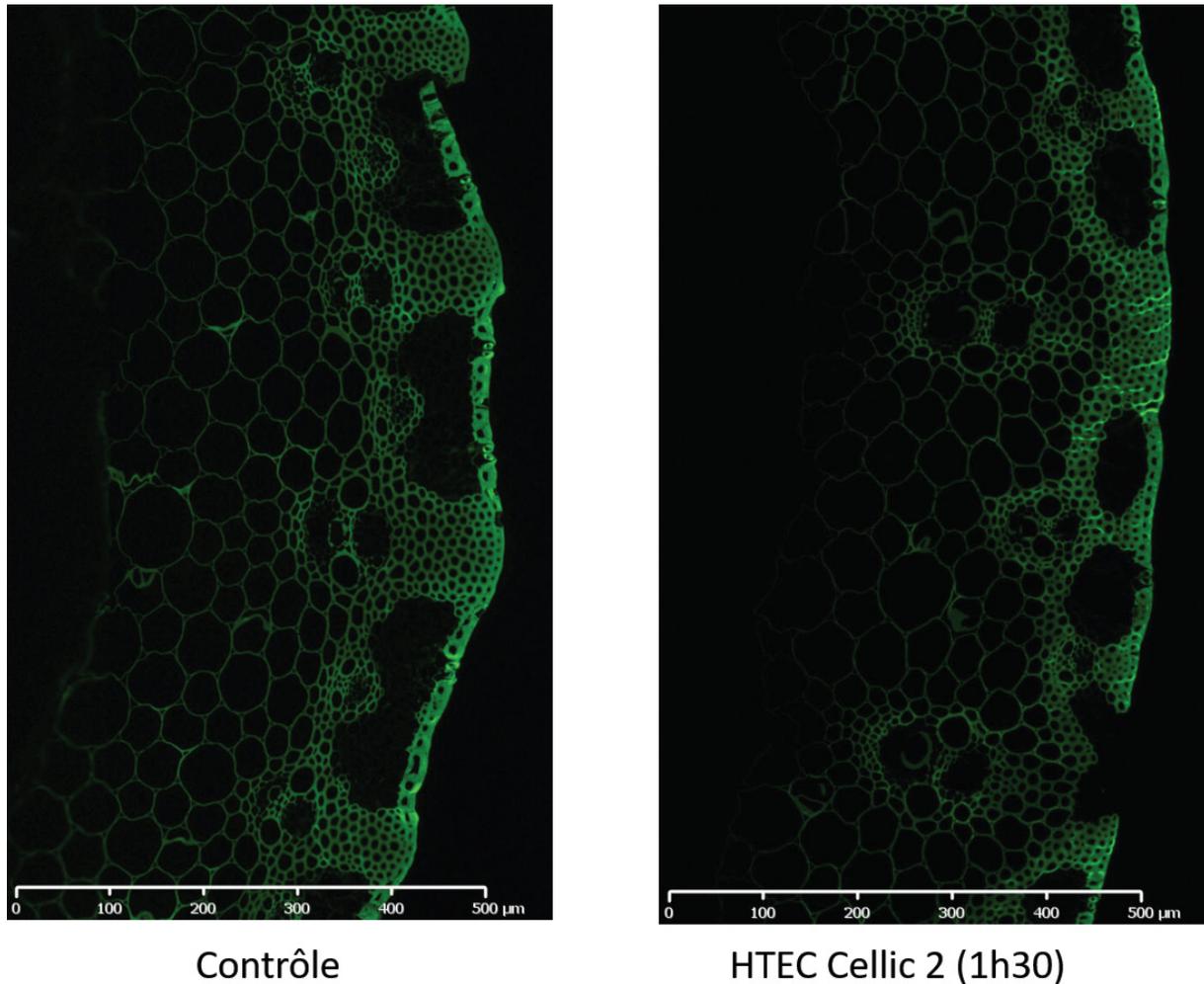


Figure 2 : Visualisation qualitative en microscopie par fluorescence de l'effet de la dégradation enzymatique par marquage de l'arabinoxylane (un polymère constitutif des parois végétales de la famille des hémicelluloses).

1.2. Une expérience d'éluion pour aller plus loin : principe et idée conceptuelle

En gardant l'esprit interdisciplinaire de ce travail, nous allons nous inspirer de techniques expérimentales utilisées dans l'étude des milieux poreux pour essayer de caractériser une évolution des propriétés de la paille de blé pour lesquels les marqueurs issus de la tomographie X évoluent très peu par rapport à l'état natif (c'est le cas « aux temps courts » de dégradation dans notre étude). Plus précisément, nous allons nous intéresser au transport d'un traceur moléculaire au sein de la paille, en phase aqueuse (c'est-à-dire avec la paille

saturée en liquide). On peut imaginer que ce transport soit affecté par l'état des PCW (Plant Cell Wall), et notamment facilité lorsque celles-ci ont subi une dégradation enzymatique. Par exemple, pour reprendre le cas de la Figure 1, on peut s'attendre à ce que le transport d'une espèce moléculaire au sein de l'échantillon de droite soit rendu plus facile par le fait que toutes les parois végétales aient été partiellement hydrolysées durant la digestion enzymatique. La disparition du PCL va sans doute contribuer à cet effet mais peut être de manière marginale, par rapport à celle de toutes les autres parois cellulaires.

Le principe de l'expérience est représenté sur le schéma de la Figure 3. L'échantillon va être saturé avec une solution aqueuse contenant un traceur. Ce traceur sera une molécule chimique de taille variable, contenant des atomes lourd d'iode, absorbant les rayons X. Puis nous allons rincer l'échantillon avec de l'eau pure, sans traceur, tout en mesurant la variation de la concentration en traceur dans la paille. Le rinçage est provoqué par un écoulement d'eau pure au milieu de la paille, dans la direction longitudinale (dans la direction perpendiculaire au plan du schéma de la Figure 3). On s'attend à ce que le traceur diffuse depuis l'intérieur de la paille vers le flux d'eau pure, selon un gradient de concentration décroissant. La mesure de la concentration dans la paille, au cours du temps doit nous renseigner sur le mode de transport (diffusion simple ou « anormale » par exemple) et peut donc être comparé à un modèle de celui-ci.

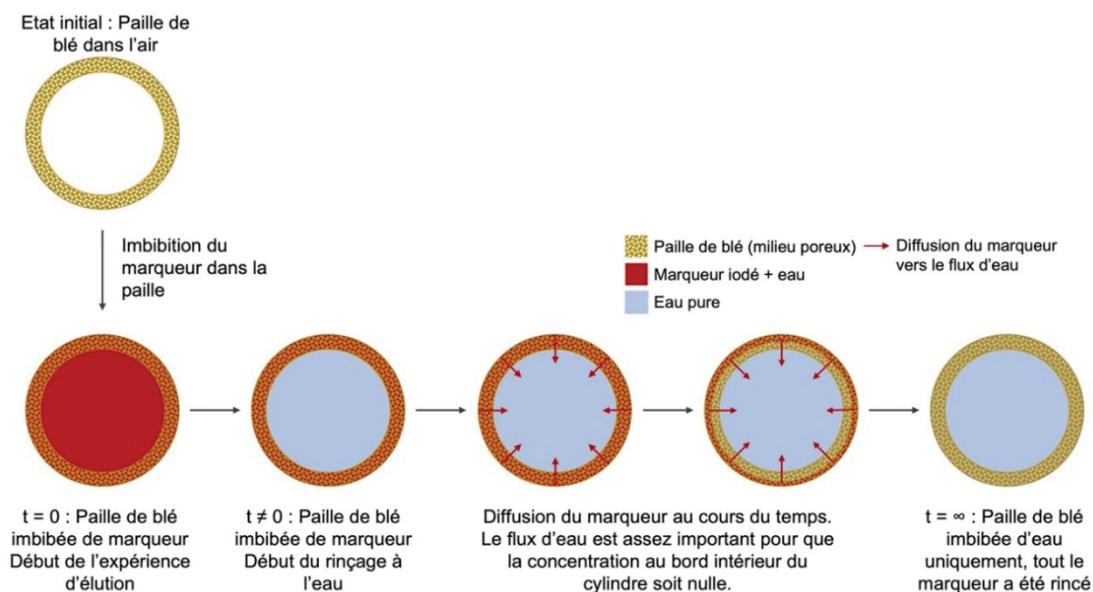


Figure 3 : Schéma de principe de l'expérience décrite : différents instants successifs sont présentés..

Ce type d'expérience peut faire penser à celles basées sur la mesure de courbes de percée en milieux poreux (*breakthrough curves*), où la mesure de la concentration en sortie de milieu poreux, dans le fluide s'écoulant à travers celui-ci peut permettre d'identifier plusieurs régimes selon la composition du milieu poreux. Par exemple, si le milieu poreux est inhomogène car composé de zones de perméabilité différentes, la courbe de percée va permettre de caractériser les échanges de traceur entre ces différentes zones au cours du rinçage et de tester des modèles de transport dans ce type de milieu. A titre d'illustration la Figure 4 reproduit des figures extraites d'une étude de ce type [1]. Une mesure de courbe de percée peut aussi permettre d'inférer des informations sur la structure du milieu poreux, sans connaissance a priori de sa structure interne.

Par la suite, on parlera par abus de langage d'expérience d'élution. L'élution est un procédé d'extraction où un matériau est séparé d'un autre par l'action de rinçage par un solvant. Par exemple, en chromatographie en phase liquide, on sépare différents constituants d'un mélange liquide selon leur affinité avec le matériau constitutif de la colonne, dans lequel le mélange s'écoule. On mesure en sortie un signal dépendant de la concentration des constituants, qui sont élués à des vitesses différentes. La particularité de notre expérience est que l'on mesurera une concentration en traceur au sein du matériau poreux et non en sortie, comme dans la configuration classique des expériences de courbes de percée ou d'élution.

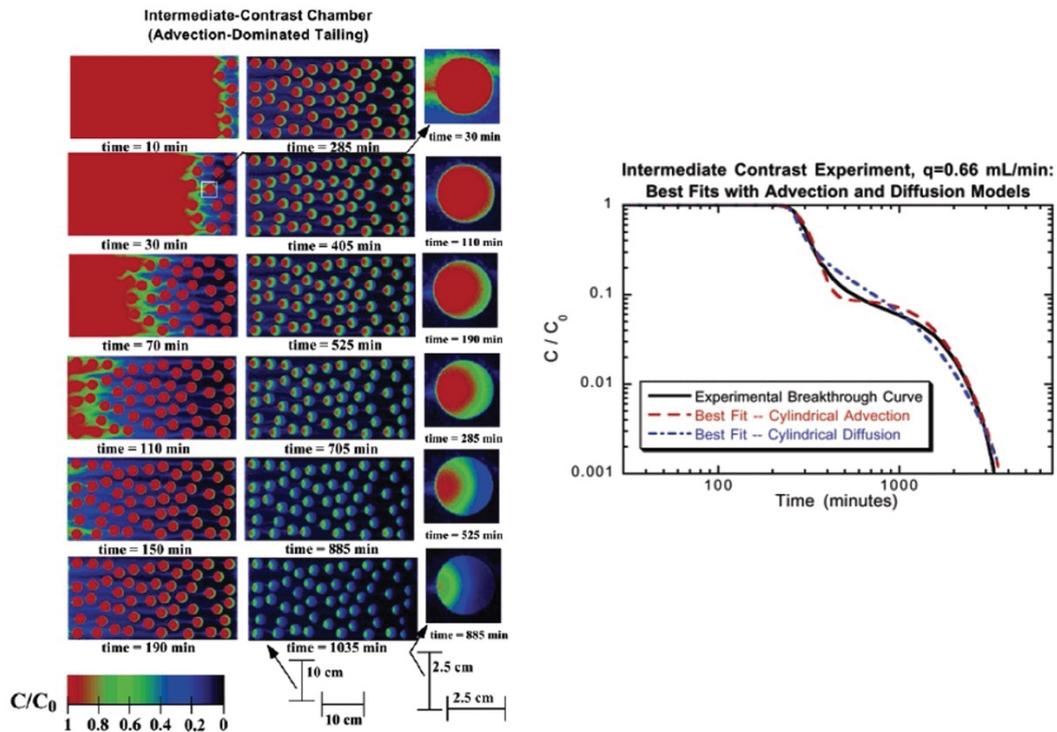


Figure 4 : Données expérimentales extraits de l'article de Zinn et al. 2004 [1]. Un écoulement (de droite à gauche) rince un milieu poreux constitué de grains grossiers, confinés entre deux plaques de verre, au sein duquel on a placé des inclusions constituées de grains plus fins (et donc moins perméables). Initialement le milieu est saturé avec un traceur (en rouge sur les images), et le rinçage élimine progressivement le traceur (d'où le passage à une image bleue). La concentration en traceur est mesurée in situ sur les images et en sortie (courbes de droite), pour être comparé à des modèles de transport au sein du milieu poreux hétérogène considéré.

1.3. Une expérience d'éluion pour caractériser l'action enzymatique à l'échelle submicronique

L'objectif de notre expérience d'éluion est donc de permettre de caractériser le transport d'un traceur moléculaire au sein de notre matériau poreux et de voir si celui-ci est affecté par l'attaque enzymatique. Il s'agit donc d'une caractérisation indirecte des effets de l'hydrolyse enzymatique. Cependant, il faut noter que les informations sur le transport au sein du matériau poreux sont utiles en tant que telles, par exemple dans une optique bio-ingénierie où l'on chercherait par exemple à décrire l'action enzymatique avec un modèle de transport réactif appliqué à un broyat de paille de blé par exemple.

La détermination de la porosité des parois cellulaires est une approche pour comprendre les transports en leur sein. Dans un article de revue, Read et Bacic [2] récapitulent les résultats de plusieurs études visant à déterminer la porosité des parois cellulaires pour plusieurs plantes (dans le cas de cellules vivantes). La taille des pores des parois cellulaires est estimée entre 3 et 10 nm et est généralement obtenue en étudiant la pénétration de différents types de particules (macromolécules et colloïdes) au sein des cellules, lors d'un choc osmotique par exemple. En conclusion, Read et Bacic concluent en indiquant que ces tailles de pores peuvent aussi bien correspondre aux interstices dans les matrices de polymères composant la paroi qu'à des pores spécifiques dans les parois, utiles pour les échanges entre cellules.

Pour explorer la question du transport au sein des parois cellulaires l'étude de la diffusion dans ces parois est une autre approche. Il existe une bibliographie importante sur la diffusion de molécules dans des milieux végétaux, par exemple dans le cadre de l'étude de prétraitement de la biomasse, où l'on souhaite qu'un principe actif se retrouve présent dans celle-ci, par exemple pour favoriser une hydrolyse enzymatique ultérieure. Comme vu sur la Figure 10 du 1^{er} chapitre de la Partie 1 de ce manuscrit, il existe plusieurs types de transport : d'une cellule à l'autre, en passant à travers les parois cellulaires ou bien à travers des canaux de communication dédié (*plasmodesmes*) mais aussi au sein des parois cellulaires (*apoplastic pathway* sur cette Figure) [3]. Plusieurs situations sont possibles, selon la teneur en eau de la biomasse (sèche, humide -avec présence d'eau résiduelle dans les PCWs- ou saturée en eau), et selon aussi le type de biomasse et sa structure à l'échelle cellulaire (ce qui peut jouer sur les modes de transport, par exemple si les cellules présentent des plasmodesmes ou non). Il est donc difficile d'être exhaustif sur le sujet.

Les articles qui nous ont semblés les plus proches de notre étude concernent principalement le transport d'espèce dans les parois végétales, et vise à caractériser un coefficient de diffusion au sein de celle-ci : par exemple le transport de polyéthylène glycol dans les PCWs du pin [4], de sucrose dans les racines de betterave à sucre [5] ou de carboxyfluorescein dans les PCWs des racines d'*Arabidopsis thaliana* [6]. Le coefficient de diffusion mesuré est généralement plus faible que pour la même espèce chimique dans l'eau.

Récemment, Jakes et al. [7] ont montré par microscopie à fluorescence X que le transport d'ions inorganiques dans les PCWs du pin était bien modélisé par un processus de diffusion de Fick, à travers le réseau de polysaccharides amorphes constitutif des parois, et non pas une

diffusion en phase liquide qui se ferait à travers des chemins d'eau préférentiels présents dans les parois lorsque l'humidité résiduelle est suffisante.

Chapitre 2. Dispositif expérimental

Dans ce Chapitre, nous détaillons le dispositif expérimental mis au point au cours de cette thèse et décrivons le protocole suivi pour réaliser une expérience d'élution type, telle que celle présentée conceptuellement sur la Figure 3.

2.1. Mesure de concentration par radiographie X

2.1.1. Utilisation de la radiographie X

Comme vu précédemment, l'expérience d'élution requiert une mesure de concentration. Notre idée initiale était de la mesurer en sortie d'échantillon, comme dans la configuration classique, en utilisant un traceur fluorescent dont la concentration serait mesurée avec un capteur CCD (comme dans l'étude présentée sur la Figure 2). Mais nous avons réalisé que l'utilisation des rayons X permettait une mesure *in situ*. Pour cela il faut utiliser un traceur radio-opacifiant. Dans le milieu médical, il existe un grand nombre de traceurs, généralement des macromolécules contenant des atomes d'iode. Plus simple à utiliser, l'iodure de potassium (KI) se dissout dans l'eau en ions K^+ et I^- . Ci-dessous nous détaillons les premiers essais réalisés avec KI, avant de passer au cas des traceurs médicaux.

2.1.2. Expériences préliminaires avec une solution de KI : calibration

Des essais préliminaires ont été menés avec une solution de KI, pour tester la sensibilité de la mesure. Pour cela, nous avons préparé différentes solutions salines, en partant d'une solution saturée, pour laquelle $C_{sat} = 1.43 \text{ g par cm}^3$, que l'on a diluée progressivement, jusqu'à un facteur 1000. Ces solutions ont été placées dans des cuves de spectrophotométrie (de trajet optique 1 cm), qui ont été ensuite radiographiées.

Une radio typique est montrée sur la Figure 5. La concentration en sel décroît en partant de la gauche. Le profil d'intensité obtenu au niveau du cadre pointillé rouge est montré sous la radiographie. On observe ainsi visuellement la diminution de l'atténuation en fonction de la

concentration. Pour obtenir une courbe de calibration plus propre, on trace le logarithme du rapport entre l'intensité I_0 mesurée sur une zone blanche du capteur et l'intensité I mesurée sur une région d'intérêt centrée sur la partie remplie de la cuve de spectrophotométrie.

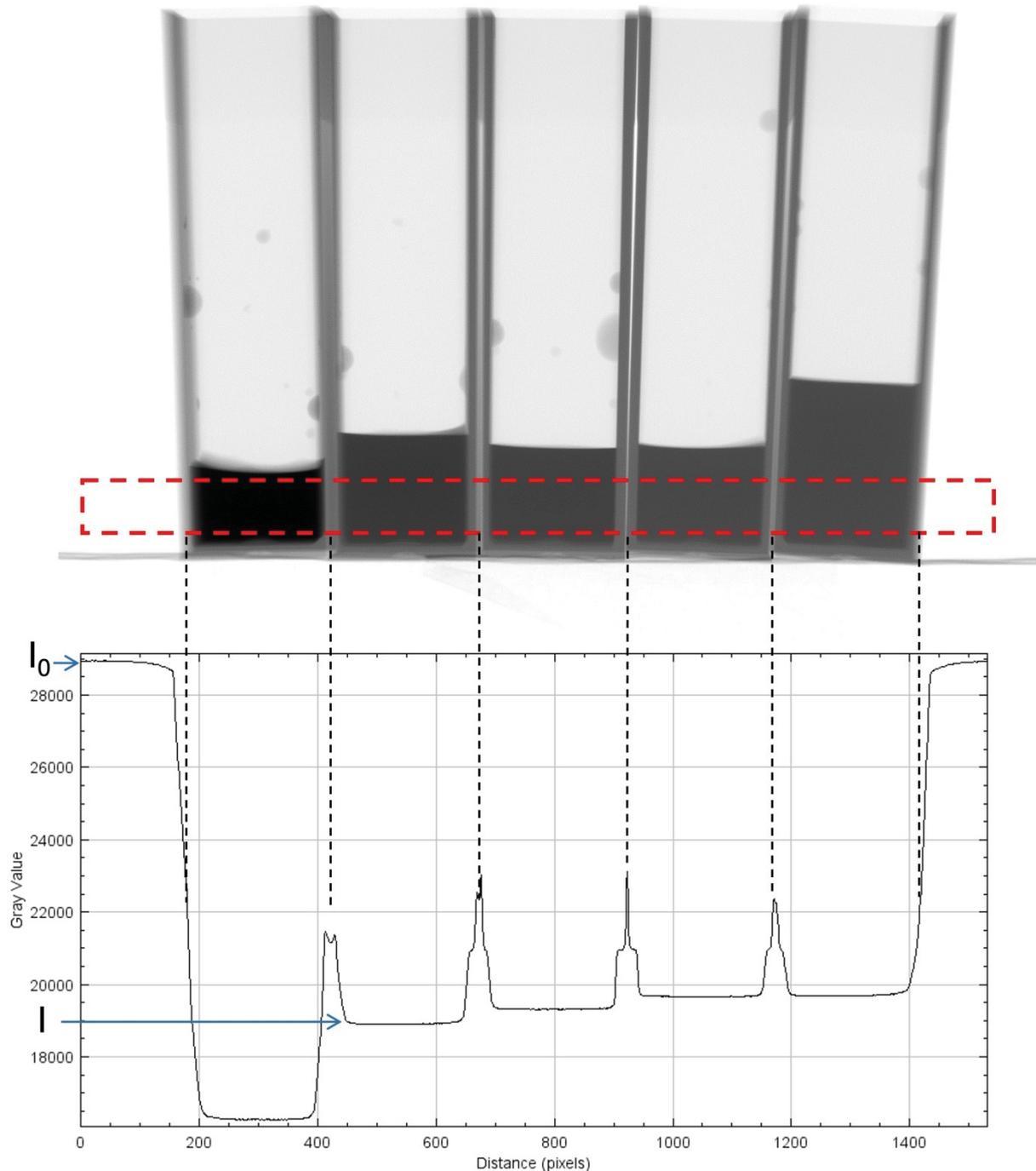


Figure 5 : Expérience de calibration. En haut, radiographie typique des cuves spectrophotométriques remplies de différentes concentrations de KI. Cinq cuves sont tomographiées en même temps, la concentration en KI décroît de gauche à droite. En bas, profil transverse d'intensité (valeur des niveaux de gris) à travers les cuves, au niveau du rectangle en pointillés rouges.

En effet, on s'attend à obtenir une loi d'atténuation de type Beer-Lambert si la concentration en traceur est suffisamment diluée :

$$I = I_0 \exp(- \mu L C) \quad (1)$$

où L est la longueur du trajet optique de la cuve spectrophotométrique et μ le coefficient d'atténuation de l'iode. Dans le cas du tomographe utilisé, le faisceau n'est pas monochromatique donc le coefficient d'atténuation dépend du contenu spectral du faisceau et donc de la puissance de celui-ci.

La Figure 6.a montre nos résultats pour 2 puissances de faisceau. Afin de mieux apprécier les variations d'intensité à forte dilution, ces résultats sont tracés en échelle semi-logarithmique sur la Figure 6.b. A forte concentration, l'intensité transmise ne dépend pas de la concentration : le faisceau est totalement atténué. La sensibilité de la mesure est retrouvée à partir d'une dilution d'un facteur 5 ($C/C_{\text{sat}} = 0.2$). A partir d'une dilution d'un facteur 20 environ, on est dans un régime de type Beer-Lambert, comme mis en évidence sur la Figure 7, qui est un zoom de la Figure 6.a pour les plus fortes dilutions. On observe que la pente de la droite dépend des réglages du faisceau X, comme attendu, avec une plus forte sensibilité à basse puissance. La sensibilité de la mesure s'étend sur près de 3 décades de concentration, c'est-à-dire qu'avec un réglage unique, on peut mesurer des concentration allant de C_{sat} (ou une fraction de C_{sat}) à quelques millièmes de C_{sat} , ce qui est comparable à ce qui est attendu avec un traceur fluorescent dans le visible dont on mesurerait la concentration avec un capteur CCD (Cf. cas de la manip présentée sur la Figure 4) ou par un spectrophotomètre adapté. Nous avons donc opté pour une mesure de concentration par radiographie X, ayant un tomographe à notre disposition. On peut noter dès à présent que l'on n'aura pas à quantifier la concentration dans nos expériences, mais que l'on se contentera d'avoir une évolution temporelle de celle-ci. Cela sera suffisant pour tester le modèle de transport proposé. Ainsi nous n'avons pas cherché à remonter à la valeur du coefficient d'absorption.

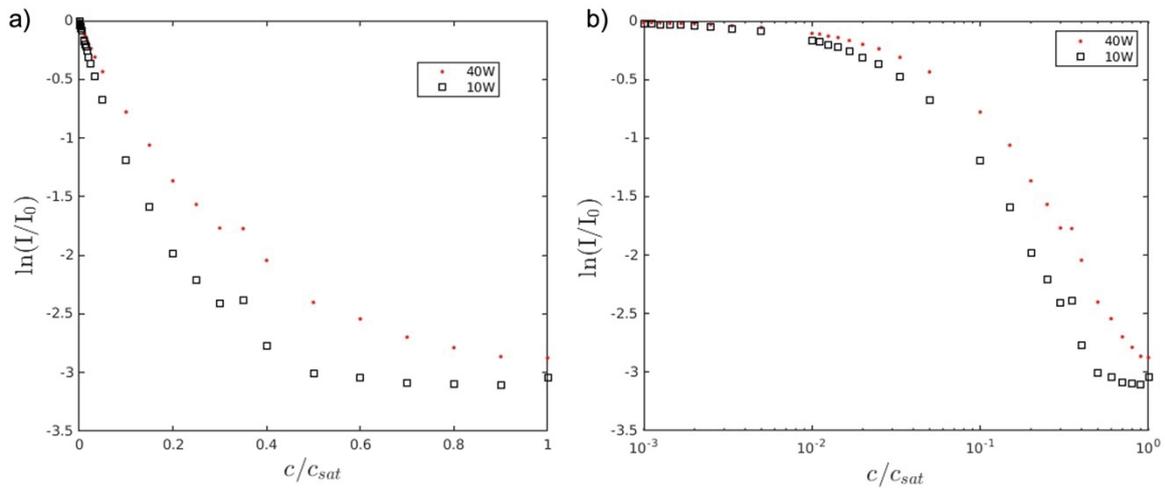


Figure 6 : Évolution du logarithme du rapport entre l'intensité transmise et l'intensité incidente, en fonction de la concentration en iode dans la cuve spectrophotométrique. L'échelle en concentration est logarithmique en b), où sont reprises les données montrées en a).

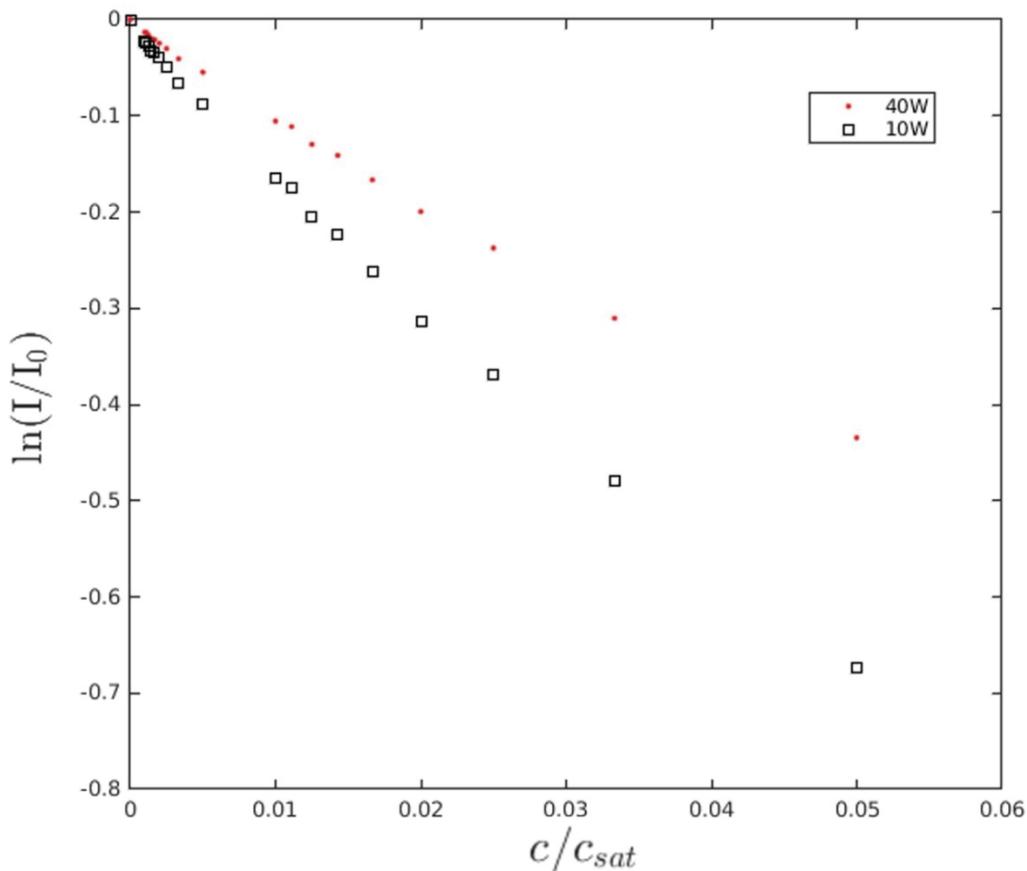


Figure 7 : Courbe de calibration d'atténuation pour l'iode. Les données sont les mêmes que sur la Figure 6, mais on zoome sur la gamme de concentration pour laquelle un régime d'atténuation de type Beer-Lambert est observé.

2.1.3. Autres traceurs radio-opacifiants

Afin de diversifier la taille des traceurs utilisés lors des expériences d'élution et voir son impact dans nos expériences, nous avons décidé d'utiliser des traceurs radio-opacifiants médicaux. Tous les traceurs décrits ci-après nous ont été gracieusement fournis par la Professeur Marie Faruch du Service d'Imagerie du CHU de Purpan à Toulouse.

L'iodure de potassium étant un sel se dissolvant dans l'eau en ion K^+ et I^- , nous pouvons considérer que la taille du traceur est celle de l'ion c'est-à-dire environ 0,5 nm. Nous avons donc voulu explorer des traceurs avec des tailles supérieures jusqu'à trois ordres de grandeurs au-dessus. Pour cela nous avons sélectionné trois traceurs médicaux : la Gastrografine[®], le Visipaque[®] et le Ioméron[®]. Ces trois traceurs contiennent de l'iode qui est l'agent radio-opacifiant. Étant tous trois des traceurs médicaux, nous ne détaillerons pas leurs compositions exactes mais nous nous attarderons sur les molécules porteuses de l'iode car ce sont ces dernières qui agissent comme traceurs dans nos expériences.

La Gastrografine[®] a pour molécule active l'acide diatrizoïque (DTA) mesurant environ 5,5 nm [8]. La solution commerciale a une concentration de 370 mg d'iode/mL. Pour nos expériences, nous diluons la solution commerciale à 50% avec de l'eau déionisée. Nous avons finalement une solution contenant 185 mg d'iode par mL.

Le Visipaque[®] a pour molécule active l'iodixanole, mesurant environ 50 nm [8]. La solution commerciale utilisée contient 270 mg d'iode/mL. De nouveau nous avons diluée cette solution à 50% pour avoir une solution finale à 135 mg d'iode/mL.

Enfin, le Ioméron[®] est un cas particulier car les molécules actives sont des liposomes chargés d'ioméprole. Ces liposomes mesurent environ 400 nm [8]. Un liposome est un vaisseau composé de bicouches lipidiques concentriques emprisonnant entre elles une phase aqueuse où se trouve la molécule active [9]. Cela permet notamment d'augmenter la taille de l'agent de contraste. La solution commerciale de Ioméron[®] est concentrée à 400 mg/mL d'iode et de nouveau nous la diluons à 50% afin d'obtenir une solution finale à 200 mg d'iode/mL.

Le rôle principal de la dilution est de diminuer la viscosité des solutions commerciales afin d'approcher la viscosité de l'eau ($1 \cdot 10^{-3}$ Pa.s). Des mesures de viscosité ont été effectuées à 20°C à l'aide d'un viscosimètre cône-plan disponible à l'IMFT, les résultats sont donnés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Traceurs	Ioméron® 100%	Ioméron® 50%	Visipaque® 100%	Visipaque® 50%
Viscosité (Pa.s)	$1,19.10^{-2}$	$2,51.10^{-3}$	$1,14.10^{-2}$	$2,32.10^{-3}$

Tableau 1 : Viscosités des solutions de Ioméron et Visipaque, avant et après dilution à 50%.

L'impact de la dilution à 50% sur la viscosité est important avec une diminution d'un facteur 6 environ. Malgré une viscosité toujours environ 2,5 fois supérieure à celle de l'eau avec une dilution à 50%, nous avons décidé de ne pas diluer d'avantage les solutions commerciales pour garder une concentration initiale en traceur suffisante.

Maintenant que tous les traceurs utilisés lors de ce travail ont été présentés, nous allons passer à la description du dispositif et à la mise en place concrète de ces expériences.

2.2. Protocole et dispositif expérimental

2.2.1. Préparation des échantillons

Pour ces expériences nous avons utilisé de la paille de blé identique à celle décrite dans le Chapitre 2. Nous avons, de la même manière que décrit dans le Chapitre 2 de la Partie 1 de ce manuscrit, commencé par la laver dans trois bains successifs puis la sécher à 45° C pendant 6 h. De nouveau, nous allons étudier l'effet du cocktail enzymatique en comparant la cinétique d'éluion d'un traceur sur une paille non traitée et une paille digérée. Pour cette étude nous avons fixé un seul temps de dégradation à 45 min. La digestion se fera de la manière décrite dans la première partie de ce travail. Nous avons choisi 45 min, car comme démontré par nos résultats de tomographie, pour ce temps d'exposition au cocktail enzymatique, le PCL commence à être modifié de manière significative. Nous avons donc fait l'hypothèse que le milieu poreux qu'est la paille de blé est modifié suffisamment pour détecter un impact sur le coefficient de diffusion effectif des traceurs en son sein.

Une fois la paille séchée (digérée ou non), nous l'enroulerons dans du ruban PTFE (téflon) afin d'assurer l'étanchéité entre la paroi interne du bioréacteur et de l'extérieur de la paille de blé. Ainsi, la diffusion ne se fera que vers le cœur de la paille comme décrit sur la Figure 3 : une condition de flux nul est imposée sur la paroi extérieure de l'échantillon. Une fois cette étape effectuée, la paille de blé est immergée dans une solution aqueuse contenant le traceur iodé

aux concentrations décrites en §2.1. Cette immersion prend place dans un tube Eppendorf® de 2 mL. Ce tube sera ensuite placé dans une cloche à vide pendant 4h sous une pression de 100 mbar afin de forcer la dissolution de l'air encapsulé dans les cellules de la paille de blé et le remplacer par la solution contenant les traceurs. Ensuite la paille de blé est laissée dans la solution pendant 12h à pression atmosphérique. L'échantillon est maintenant prêt à être positionné transféré dans le bioréacteur décrit ci-dessous, et qui sera installé au cœur du montage expérimental décrit dans la section 2.2.3.

Afin de vérifier la bonne imbibition de la paille de blé par la solution contenant le traceur, nous avons effectué des scans rapides. Le protocole décrit ci-dessus est le protocole appliqué pour toutes les pailles de blé sans distinction de traceurs. Cependant ce dernier a été optimisé pour le premier marqueur utilisé : le KI. Pour vérifier l'état d'imbibition de nos échantillons nous avons effectué des scans tomographiques rapides (9 min de temps de scan) à une puissance de 5W, une tension d'accélération de 100 kV et un courant de 50 μ A. Les radiographies sont prises à une fréquence de 2Hz sans moyennage à l'acquisition et avec une résolution spatiale de 5 μ m. Comme ces scans ont pour objectif de vérifier l'état d'imbibition et non destinés à des fins d'analyse précise, aucun traitement d'images n'est appliqué après la reconstruction tomographique.

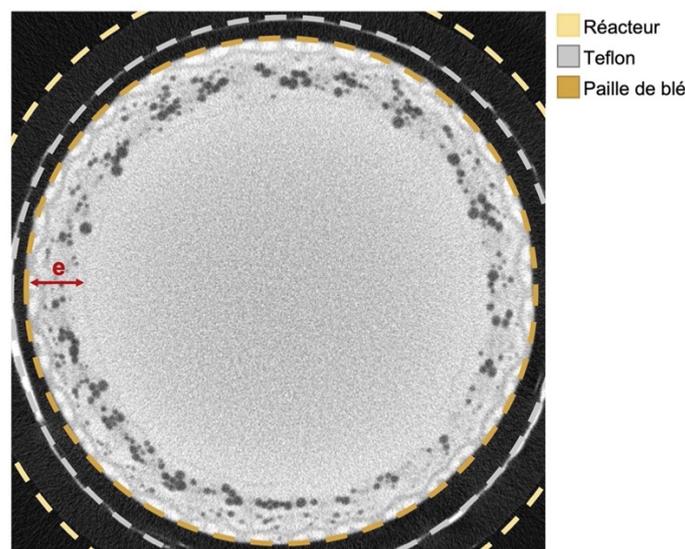


Figure 8 : Coupe tomographique typique illustrant l'état d'imbibition d'une paille de blé par une solution aqueuse de KI. Les pointillés soulignent les positions des différents éléments de la coupe. La double flèche rouge indique l'épaisseur e de la paille (on distingue à peine le PCL, qui apparaît comme une fine ligne noire). L'intérieur du cylindre creux qu'est la paille de blé est rempli de liquide (ici solution aqueuse de KI).

La Figure 8 montre l'efficacité de notre protocole d'imbibition. Malgré la présence de bulles d'air qui occupent des cellules non imbibées (voxels plus sombres à l'intérieur de la paille de blé), on remarque que la solution contenant le traceur a pénétré de manière relativement homogène dans la structure de la paille. Certes l'imbibition n'est pas parfaite, mais c'est avec un état initial tel que montré sur la Figure 8 que nous avons réalisé nos expériences.

Comme dit précédemment, nous avons appliqué le même protocole pour toutes les solutions utilisées, quel que soit le traceur. Cependant, nous avons remarqué après coup que ce protocole n'était pas optimal pour les autres traceurs. L'impact sur les résultats sera discuté dans la partie 4.2. La Figure 9 illustre les différents états d'imbibition en fonction des traceurs utilisés : celle-ci est moins homogène que dans le cas du KI (Figure 8).

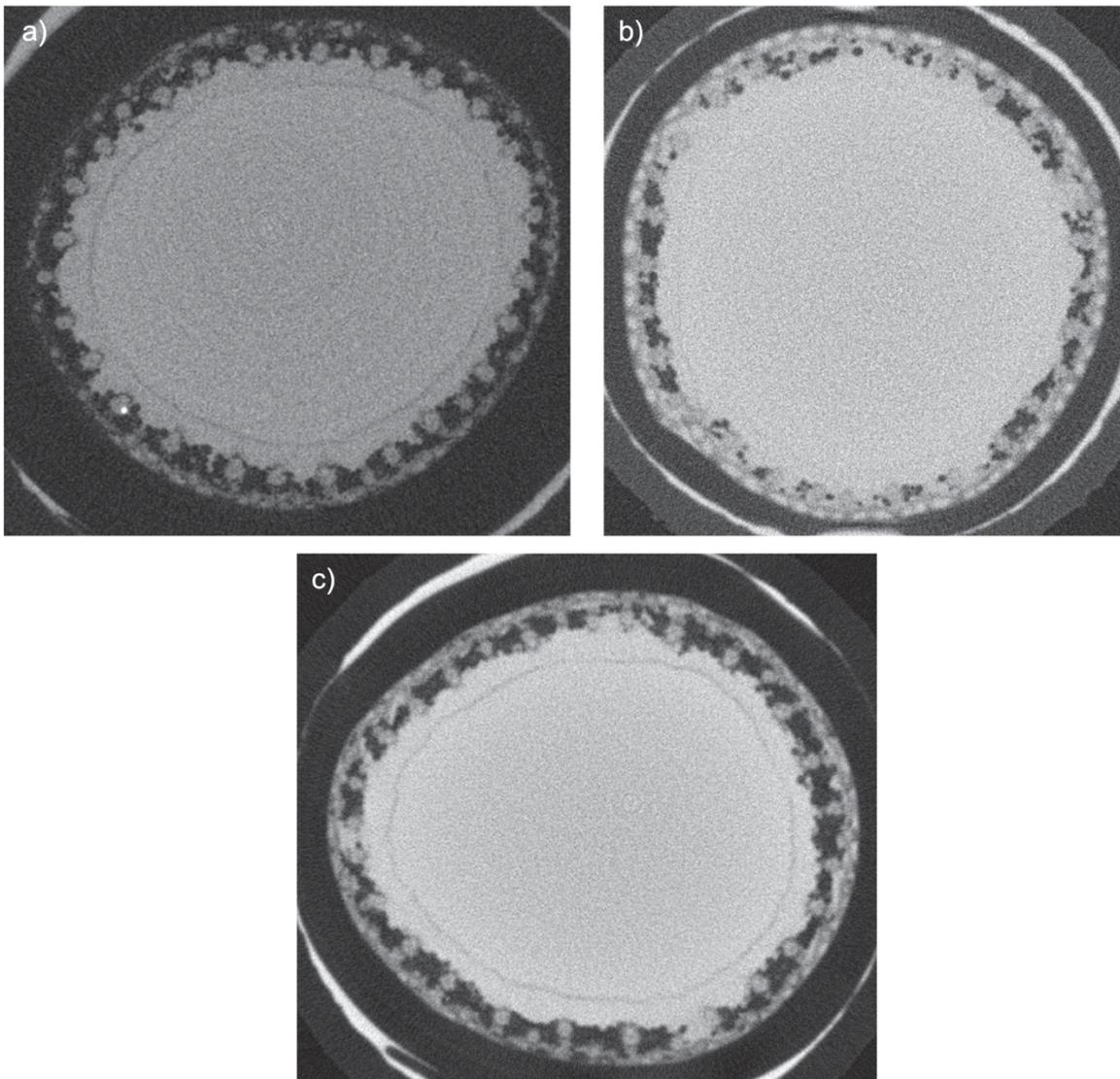


Figure 9 : Coupes tomographiques de pailles de blé imbibées avec différentes solutions aqueuses contenant des traceurs radio-opacifiants : Gastrografine® (a), Visipaque® (b) et Ioméron® (c).

2.2.2. Bioréacteur

La paille de blé est insérée dans un bioréacteur imprimé en 3D, schématisé sur la Figure 10. L'écoulement va se faire à l'intérieur de la paille de blé. Celle-ci est entourée de téflon, pour ajuster son diamètre au diamètre intérieur du bioréacteur : la paille ne bouge pas en cours d'expérience. Par ailleurs la fine couche de téflon imperméabilise le pourtour extérieur de l'échantillon. Le traceur initialement contenu dans la paille ne pourra diffuser que vers le cœur de celle-ci, comme mentionné précédemment. Le bioréacteur est composé de deux parties distinctes : le capot ajusté est inséré dans la partie inférieure, après mise en place de l'échantillon.

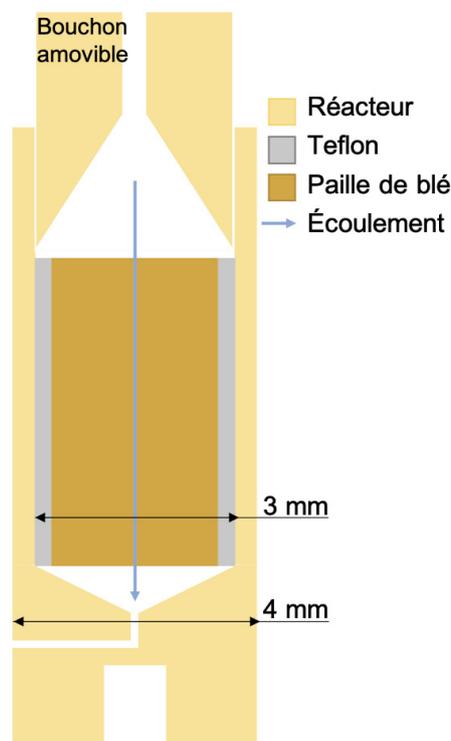


Figure 10 : Vue en coupe du bioréacteur, avec la paille de blé enroulée dans le téflon positionnée à l'intérieur.

2.2.3. Fluidique et protocole

Le montage permettant de piloter l'expérience en termes d'écoulement est représenté sur la Figure 11. Pour cela nous allons utiliser un contrôleur de pression Fluigent® Flow EZ™ ainsi que deux interrupteurs fluidiques (de type Switch-Fluigent). Le contrôleur de pression est relié

à un switch permettant de pressuriser soit le récipient contenant de l'eau déminéralisée pure (pour le rinçage) soit celui contenant la solution chargée en traceur radio-opacifiant. Les deux sorties des bouteilles sont elles aussi connectées à un deuxième switch, afin de faire circuler l'un ou l'autre des deux fluides (eau pure ou solution avec traceur) jusqu'au bioréacteur contenant la paille de blé. Le fluide circulant est ensuite évacué dans un béccher poubelle. Cela permet d'utiliser un contrôleur de pression n'ayant qu'une seule sortie, tout en contrôlant à distance quel liquide circule dans notre montage.

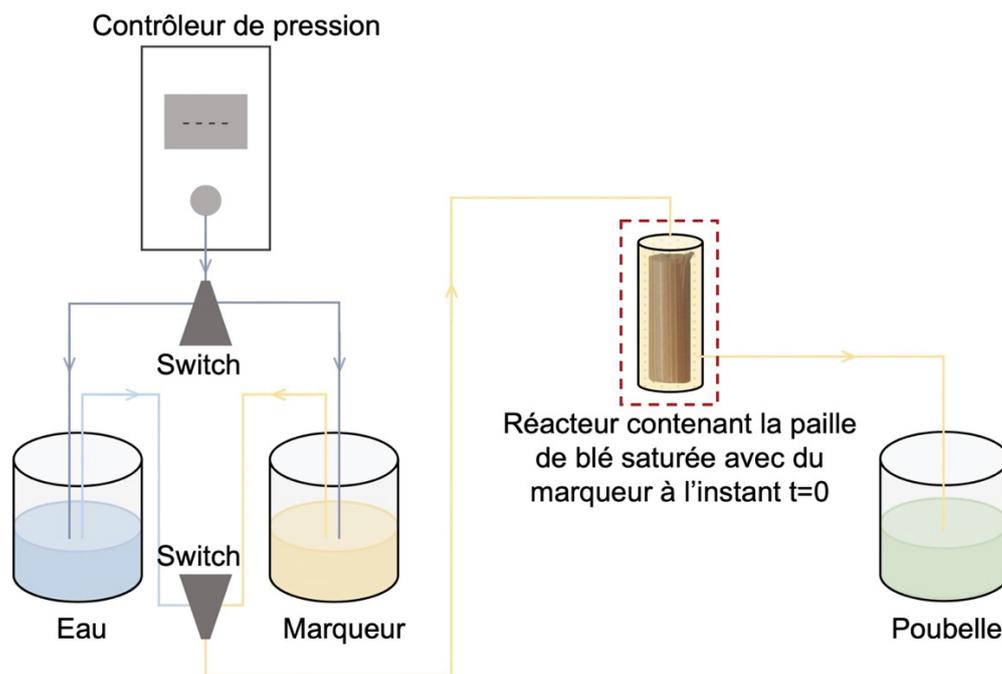


Figure 11 : Schéma du montage expérimental se trouvant à l'intérieur du tomographe à rayon X. Le rectangle en pointillés représente le champ de vue du tomographe lors de la prise des radiographies.

La Figure 12 montre une photo du montage positionné dans l'enceinte du tomographe à rayons X, ce qui va nous permettre de suivre l'évolution de la diffusion à l'intérieur de la paille de blé au cours du rinçage grâce à une succession de radiographies X.

Une fois la paille de blé saturée avec une solution concentrée en traceur radio-opacifiant, elle est mise en place dans le bioréacteur, qui est ensuite monté sur une tige support positionnée face à la source à rayons X. Juste avant de connecter le réacteur, le montage est rempli avec de la solution contenant le traceur afin d'éviter au maximum la présence de bulles d'air. Une fois le réacteur branché, on fait circuler de la solution chargée en traceur dans les circuits et dans le réacteur afin d'éliminer toute les bulles d'air. Une fois cette étape terminée, la prise d'image, et donc l'expérience d'éluion, peuvent commencer. A l'instant initial, paille de blé

et réacteur sont donc saturés avec la solution contenant le traceur. On fait circuler la solution de traceur pendant un court instant, puis le switch est enclenché pour effectuer le rinçage du réacteur et l'élution du traceur contenu dans la paille avec de l'eau déminéralisée. Idéalement, on aimerait que le traceur soit remplacé immédiatement par l'eau mais on verra que même si le switch fonctionne correctement, le front de rinçage n'est pas parfaitement net, probablement dû au trajet effectué entre le switch et le réacteur (même si on a cherché à minimiser la longueur de tube parcourue). Le rinçage à l'eau dure plusieurs dizaines de minutes, afin de permettre la diffusion du traceur depuis le milieu poreux vers le flux d'eau.

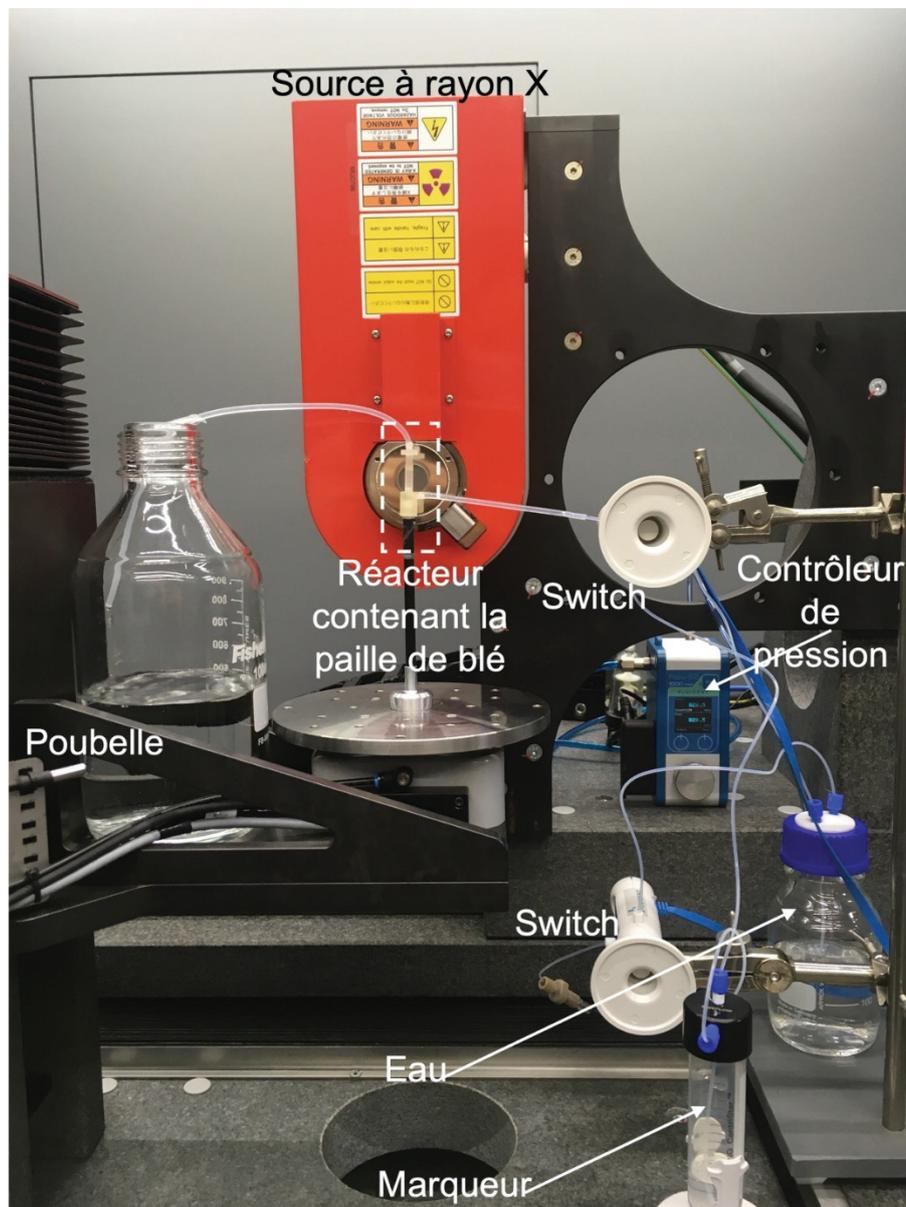


Figure 12 : Photographie du dispositif expérimental schématisé sur la Figure 11 placé à l'intérieur du tomographe à rayons X.

2.2.4. Prise des radiographies et utilisation du tomographe à rayons X

Afin de suivre l'évolution de la concentration en traceur radio-opacifiant à l'intérieur de la paille de blé, nous acquérons une série de radiographies X au cours du temps. La seule modification au cours du temps est la concentration en traceur présent dans la paille de blé, ce qui induit une évolution de l'absorption des rayons X et donc une variation de l'intensité en niveaux de gris mesurée sur l'image. Ceci est illustré sur la Figure 13, qui montre plusieurs radiographies prises en cours d'expérience. Les variations de signal vues sur ces images seront discutées de manière plus quantitative dans le Chapitre 3 suivant.

Pour prendre les radiographies nous avons utilisé le mode radio du tomographe à rayon X combiné avec une macro afin d'automatiser les prises de vue. Pour ce faire nous avons utilisé la source à rayons X avec une puissance de 10 W, un courant d'accélération de 100 μA et un voltage de 100 kV. Les images ne sont pas moyennées. La macro fonctionne en deux séquences. Une première prenant une image toutes les demi-secondes pendant 500 images, donc pendant environ 4 min. Puis une seconde séquence prenant une image toutes les 15 secondes pendant 200 images, soit une durée totale de 50 min.

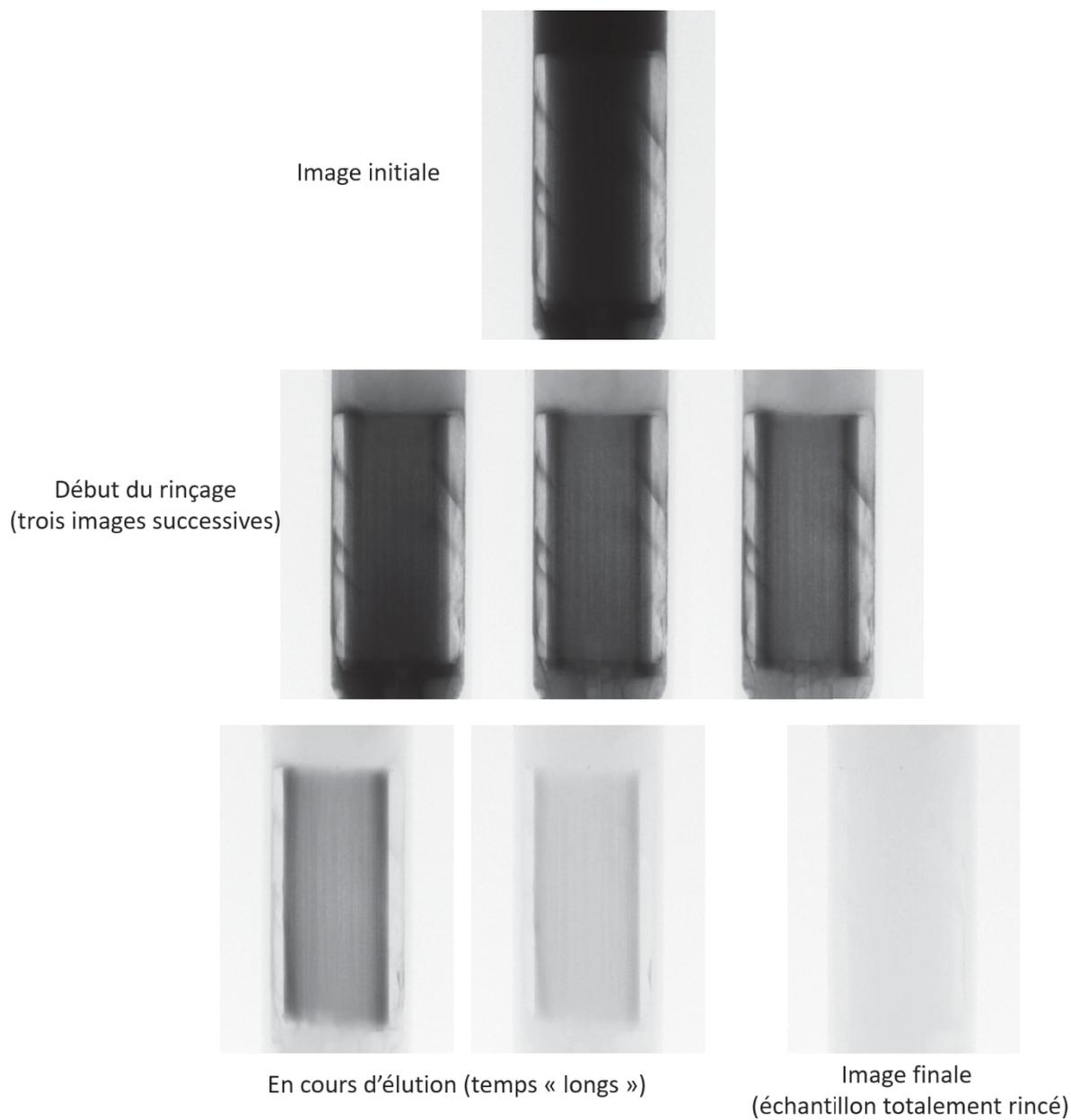


Figure 13 : Radiographies X en cours d'expérience d'élution. L'état initial est en haut : la solution saturée en traceur est présente partout dans le réacteur. Le passage du front de rinçage se fait en quelques images, la fréquence d'acquisition étant de 2 Hz.

2.3. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons détaillé le dispositif expérimental ainsi que le protocole. Nous avons vu la méthode d'imbibition des échantillons de paille de blé ainsi que leur état d'imbibition dont nous discuterons des conséquences lors du Chapitre 4. Nous avons aussi discuté de la calibration entre l'intensité mesurée par radiographies X et la concentration en traceur et nous avons pu établir que ces grandeurs étaient liées grâce à la loi d'atténuation de Beer-Lambert.

Dans le chapitre suivant nous allons discuter d'une modélisation du transport diffusif d'un traceur radio-opacifiant au sein de la paille de blé. Nous mettrons en relation cette modélisation avec les observations et mesures faites au cours de nos expériences.

Chapitre 3. Modélisations : théorie et interprétation des données expérimentales

Ce Chapitre s'articule en 2 sections. Dans la première, nous allons présenter la manière dont le transport diffusif au sein de la paille de blé a été modélisé. Puis nous présenterons la manière dont les données extraites des radiographies ont été analysées. Des hypothèses seront validées en utilisant les résultats d'expérience faites en utilisant KI comme traceur.

3.1. Modèle de transport du traceur au sein de la paille

Théoriquement, on est en présence d'un problème de diffusion au sein d'un matériau poreux, notre paille de blé, celui-ci étant saturé en eau. La nature cellulaire de ce matériau, la paroi des cellules étant poreuse, a déjà été discuté à de nombreuses reprises dans ce manuscrit. On fera l'hypothèse que la différence de pression appliquée entre l'entrée et la sortie de l'échantillon (c'est-à-dire entre l'entrée et la sortie du bioréacteur) est insuffisante pour qu'il y ait un écoulement longitudinal au sein de la paille (qui traverserait donc les plafonds cellulaires). En fait, il y a deux résistances hydrauliques à l'écoulement en parallèle : celle pour l'écoulement dans la cavité médullaire centrale de la paille (écoulement de type Poiseuille) et celle pour l'écoulement de perméation à travers le matériau végétal, évoqué ci-dessus, très probablement très supérieure. Ainsi on néglige une composante convective au transport, au sein du matériau poreux. Il faut cependant noter qu'il est possible d'avoir un écoulement dans les vaisseaux de la paille de blé, qui sont eux traversants sur toute la hauteur de l'échantillon. La dimension transverse caractéristique de ces vaisseaux est de l'ordre de quelques dizaines de microns, comme on peut l'apprécier sur les images obtenues par tomographie X. On s'attend donc à avoir des écoulements avec de très faibles débits, vu la faible différence de

pression imposée, et on les négligera. En toute rigueur, on peut imaginer que le rinçage du traceur puisse être affecté localement, au voisinage des vaisseaux, par ces écoulements.

En première approche, on va modéliser la diffusion dans la paille comme un processus diffusif, dans un matériau poreux homogène, caractérisé par un coefficient de diffusion effectif unique. Il s'agit de l'approche la plus simple que l'on puisse imaginer et de nombreux raffinements sont envisageables (Figure 14). On s'attend à ce que la diffusion soit ralentie par la traversée des parois cellulaires dont l'épaisseur et le nombre varie en fonction de la position radiale (on pourrait extraire un taux de présence en parois cellulaires par unité de surface d'une analyse des coupes tomographiques transverses). Un modèle plus sophistiqué consisterait assez naturellement à prendre en compte un coefficient de diffusion effectif qui varie selon la position dans la paille. Cela n'est pas totalement satisfaisant, vu la faible séparation d'échelle entre la largeur de la paille et la taille des cellules. On pourrait alors simuler numériquement la situation, avec deux coefficients de diffusion, l'un pour l'intérieur des cellules (égal au coefficient de diffusion du traceur dans l'eau) et un autre pour le transport au cœur des parois cellulaires (respectivement notés D_0 et D_{PCW} sur la Figure 14). Ce dernier pourrait être alors accessible par approche inverse, à partir des données expérimentales. Il faut noter que la simulation pourrait s'effectuer directement à partir des images tomographiques, en suivant l'approche développée lors du travail de thèse d'Adel Moreno, encadré par P. Assemat, P. Swider et M. Quintard du groupe Milieux Poreux et Biologiques de l'IMFT [10].

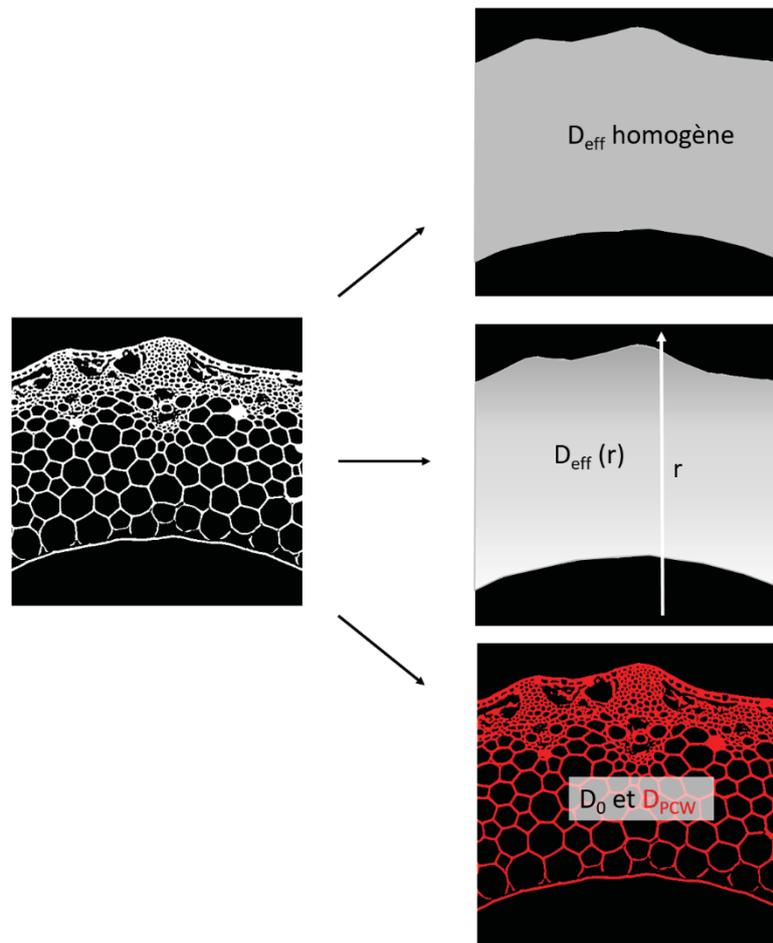


Figure 14 : Les trois niveaux de modélisation envisagés dans ce manuscrit, sachant qu'uniquement le premier sera mis en œuvre avec prise en compte d'un coefficient de diffusion effectif homogène sur l'épaisseur de la paille.

La littérature offre une panoplie complète de solutions au problème de diffusion dans un matériau, pour un grand nombre de géométries de domaines et de jeu de conditions aux limites (dans le cas d'un coefficient de diffusion constant et homogène dans le matériau). Nous allons considérer le problème comme étant 1D, avec une diffusion dans la direction radiale uniquement. Ceci revient à négliger la courbure de la paille, ce qui semble justifié, vu le rapport entre l'épaisseur de la paille et son diamètre extérieur, de l'ordre de 1/10.

Par ailleurs, on va approximer la paille par une géométrie cylindrique parfaite (cylindre creux, avec une épaisseur égale à l'épaisseur moyenne de la paille). La paille étant entourée d'un film de téflon, le flux est nul à tout instant sur le pourtour extérieur. Sur le contour intérieur, on fait l'hypothèse que la concentration est nulle à tout instant, pour modéliser le fait que l'écoulement imposé est suffisamment rapide pour effectuer un rinçage « parfait ». Dans ces conditions, la couche limite de concentration est infiniment fine, traduisant le fait que le

nombre de Péclet, comparant le transport convectif par le flux de rinçage au transport diffusif, est très grand devant 1.

Dans ces conditions, l'ouvrage de Carslaw & Jaeger [11] propose une solution générique : il s'agit de la solution présentée dans la section 3.4 de cet ouvrage (Chapitre *Linear flow of heat in a solid bounded by two parallel planes*, page 101). On note e l'épaisseur de la paille (typiquement quelques centaines de microns) et C_0 la concentration initiale dans la paille, qui est considérée comme étant homogène (ne dépendant pas de x). Le flux en $x=0$ est nul et la concentration en $x=e$ est nulle à tout instant. La solution s'écrit alors :

$$c(x, t) = \frac{2}{e} \sum_{n=0}^{\infty} e^{-D(2n+1)^2 \pi^2 t / 4e^2} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2e} \left\{ \int_0^e c_0 \cos \frac{(2n+1)\pi x'}{2l} dx' \right\} \quad (2)$$

Ce qui se simplifie en :

$$c(x, t) = \frac{4}{\pi} c_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} e^{-D(2n+1)^2 \pi^2 t / 4e^2} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2e} \quad (3)$$

On peut moyenniser sur l'épaisseur e de la paille pour obtenir la concentration moyenne $\langle c \rangle (t)$:

$$\langle c \rangle (t) = \frac{1}{e} \int_0^e c(x', t) dx' = \frac{8}{\pi^2} c_0 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{-D(2n+1)^2 \pi^2 t / 4e^2} \quad (4)$$

$$\langle c \rangle (t) = \frac{8}{\pi^2} c_0 \left\{ e^{-D\pi^2 t / 4e^2} + \frac{1}{9} e^{-9D\pi^2 t / 4e^2} + \frac{1}{25} e^{-25D\pi^2 t / 4e^2} + \dots \right\} \quad (5)$$

On remarque que la solution s'écrit comme une suite infinie de termes dont la contribution est de plus en plus faible. Approximer la solution par le seul premier terme est par ailleurs d'autant plus justifié que le temps est long. Si on fait cette approximation, le logarithme de la concentration moyenne décroît linéairement avec le temps, le coefficient de linéarité étant directement proportionnel au coefficient de diffusion :

$$\ln(\langle c \rangle (t)) = \ln\left(\frac{8}{\pi^2} c_0\right) - \frac{D\pi^2 t}{4e^2} \quad (6)$$

C'est cette expression simplifiée que nous utiliserons principalement par la suite pour analyser nos données expérimentales.

3.2. Modélisation du signal recueilli par radiographie X et comparaison avec les données expérimentales

Dans cette section, on présente la manière dont nous allons modéliser et donc interpréter concrètement le signal mesuré sur les radiographies X. Des mesures expérimentales typiques seront présentées, pour discuter la modélisation et justifier certaines approximations.

3.2.1. Profil d'intensité : une mesure simple de l'épaisseur de la paille

En première approximation, on considère la paille comme ayant une forme parfaitement annulaire, d'épaisseur e . Une vue en coupe est présentée sur la Figure 15. L'épaisseur L de paille traversée par le faisceau de rayons X dépend de x . La coordonnée x est reliée à l'angle polaire θ par la relation $\cos \theta = x/r$.

Si $x < R_i$ (Figure 15.a) :

$$L = R_e \sin\theta_e - R_i \sin\theta_i \text{ avec } \theta_e = \arccos(x/R_e) \text{ et } \theta_i = \arccos(x/R_i) \quad (7)$$

Si $R_i < x < R_e$ (Figure 15.b) :

$$L = R_e \sin\theta_e \text{ avec } \theta_e = \arccos(x/R_e) \quad (8)$$

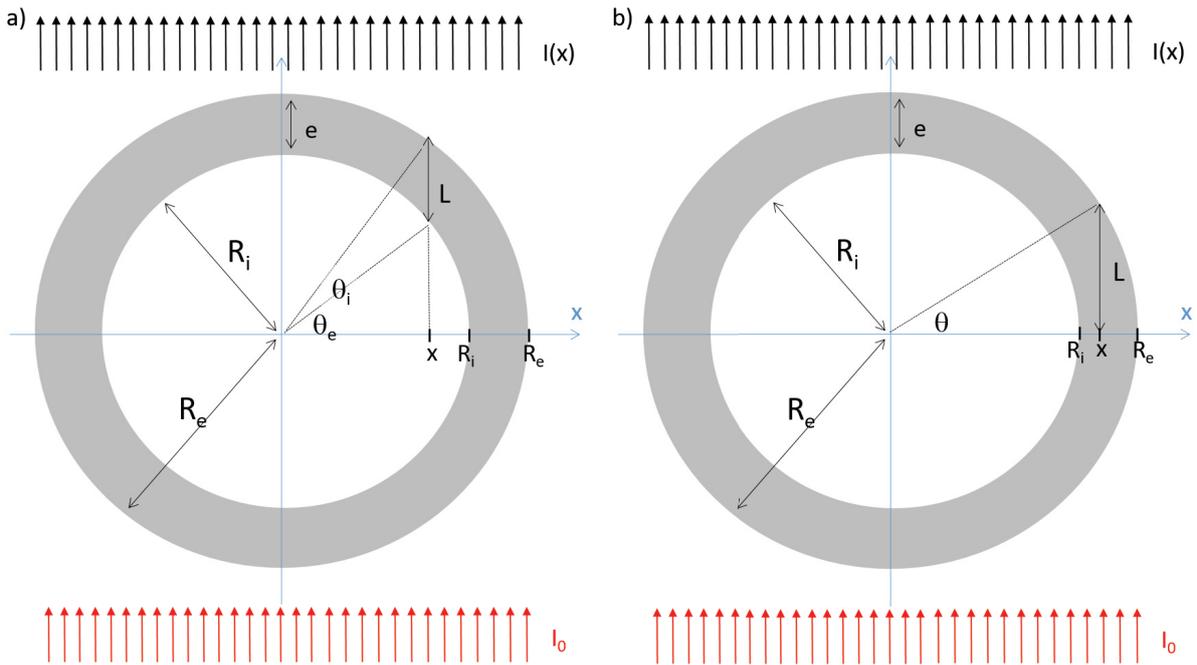


Figure 15 : Schémas illustrant le calcul de l'épaisseur de paille traversée L en fonction de la position x .

Si on trace l'épaisseur L en fonction de x (pour $x > 0$), on obtient une forme caractéristique représentée sur la Figure 16 avec un maximum en $x = R_i$.

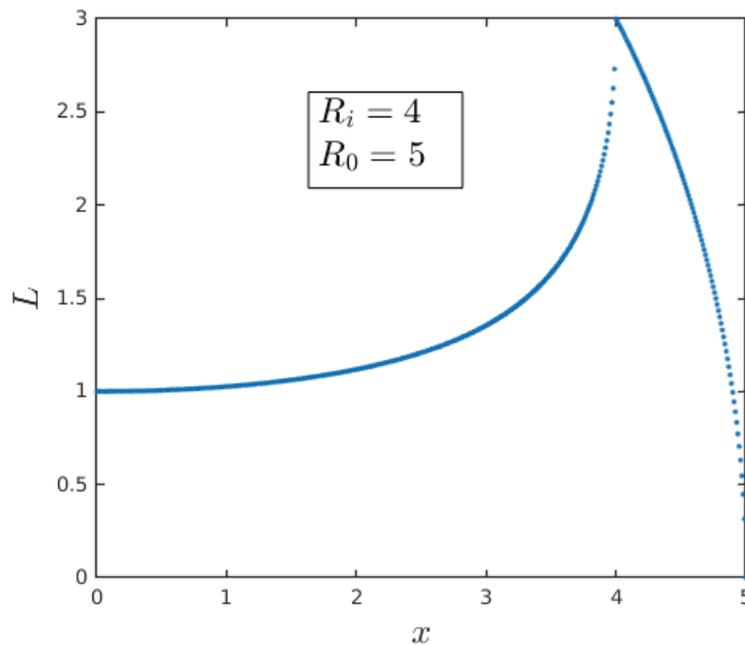


Figure 16 : Epaisseur L de paille traversée, en fonction de la position transverse x (en se limitant à $x > 0$, soit en quelque sorte la moitié droite de la paille telle que schématisée sur la Figure 15).

Juste après le début du rinçage, on s'attend à ce que l'atténuation soit principalement provoquée par le traceur radio-opacifiant dilué dans l'eau saturant la paille, et présentant une concentration homogène (car la rétrodiffusion depuis la paille vers l'eau de rinçage n'a pas débutée), d'où un profil d'intensité :

$$I(x) = I_0 K \exp(-2 L(x) \mu_c C_0) \quad (9)$$

où K est une constante dépendant des matériaux traversés (cette écriture sera précisée dans la sous-section suivante).

On s'attend donc à trouver un profil de forme similaire à celui calculé théoriquement, présentant un maximum d'atténuation localisé au niveau des parois internes de la paille, ce que l'on vérifie expérimentalement (Figure 17).

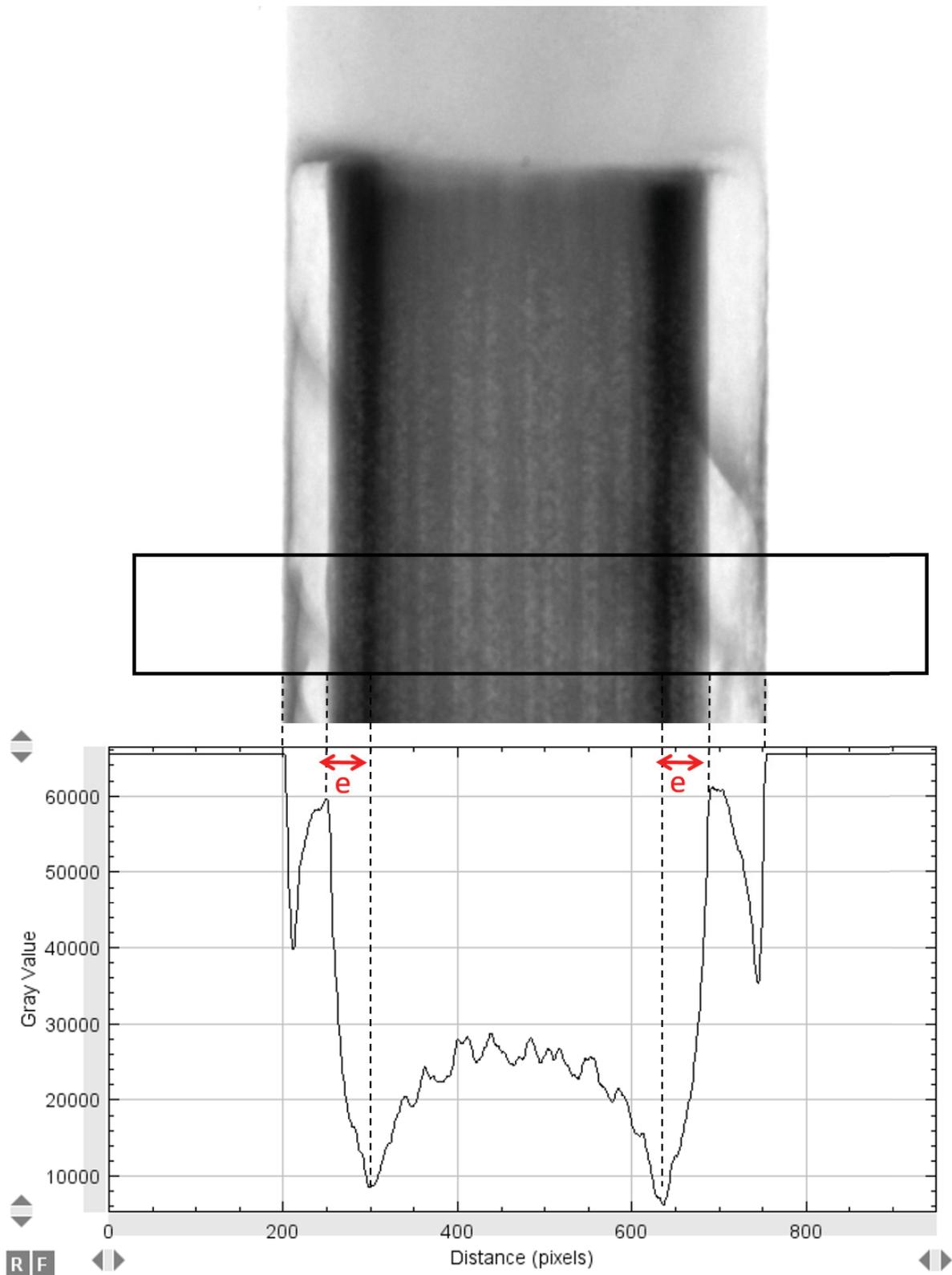


Figure 17 : Profil transverse d'intensité, avant rinçage. En haut, une radiographie prise juste après le passage du front de rinçage. En bas, le profil d'intensité mesuré avec ImageJ au niveau du cadre noir superposé à la radio, en moyennant sur la hauteur de celui-ci. L'épaisseur e de la paille est déduite de la forme caractéristique de ce profil.

La mesure de profils d'intensité ouvre la voie à une détermination expérimentale de l'épaisseur de la paille sans avoir à réaliser de scan 3D. Cela s'avère être pratique lorsque plusieurs échantillons sont utilisés à la suite. En effet, il est alors préférable d'éviter les manipulations du dispositif expérimental (déconnexion des tubes, etc.) préalables à toute tomographie.

Cette technique de mesure de l'épaisseur de la paille a été validée en comparant l'épaisseur déterminée à partir de l'examen d'un profil transverse d'intensité à l'épaisseur mesurée à partir d'une coupe tomographique transverse, lors d'une expérience dédiée à cette vérification (c'est-à-dire avec tomographie des échantillons de paille de blé). On estime la précision de la mesure sur les radiographies à $\pm 5\%$.

	Paille 1	Paille 2	Paille 3
Ep. sur coupe (μm)	372 ± 22	420 ± 26	398 ± 24
Ep. sur radio (μm)	345 ± 17	414 ± 21	417 ± 21

Tableau 2 : Mesures des épaisseurs de trois échantillons de paille de blé en utilisant les radiographies comme décrit dans la Figure 17 et une mesure directe sur des coupes tomographiques transversales.

L'épaisseur sur les coupes tomographiques a été mesurée comme indiquée en rouge sur la Figure 6. Nous avons pris une dizaine de mesures d'épaisseur à des endroits différents de la paille afin d'estimer une valeur moyenne, l'erreur sur la mesure est la déviation standard de ces mesures.

3.2.2. Modélisation du signal : atténuation

On part de l'écriture simplifiée de la loi d'atténuation présentée dans le Chapitre 2, où l'on considère que l'intégration sur la polychromaticité du faisceau X a été effectuée :

$$I = I_0 \exp\left(-\int_l \mu(l) dl\right) \quad (10)$$

où l'intégration se fait le long du chemin optique suivi par les rayons X.

Concrètement, on va effectuer les mesures d'intensité I sur des régions d'intérêt rectangulaires centrées sur l'axe de symétrie du dispositif et relativement fines (en largeur).

La Figure 18.a présente une coupe longitudinale du réacteur, sur laquelle on a schématisé

différentes régions d'intérêt ($I_{e,1}$, I_1 , I_2 , etc.) sur lesquelles seront mesurés plusieurs intensités I . Sur la Figure 18.b, on a une vue simplifiée en coupe, au centre de la paille, illustrant le fait que les régions d'intérêt sont fines, et que donc les rayons traversent une épaisseur $2e$ de paille de blé. Les valeurs d'intensité I sont obtenues en moyennant les niveaux de gris sur la région d'intérêt considérée. I_0 est l'intensité incidente.

Comme on peut le voir sur la vue de coupe de la Figure 18.a, le faisceau de rayons X (considéré comme étant parallèle, on néglige ici son l'aspect conique) traverse plusieurs matériaux : la résine composant le réacteur, la fine couche de téflon enrobant l'échantillon, la paille et l'eau. Pour ce dernier matériau, on va séparer la contribution de l'eau de celle du traceur radio-opacifiant, présent dans la paille uniquement après le début du rinçage. La concentration en traceur radio-opacifiant dans la paille varie selon la position le long du trajet optique, en raison des gradients de concentration que l'on s'attend à voir apparaître dès que le rinçage commence. On peut préciser alors la formule ci-dessous :

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\mu_{resine}L_{resine} - \mu_{teflon}L_{teflon} - \mu_{eau}L_{eau} - \mu_{paille}e_{paille} - \int_l \mu_c C(l, t) dl\right) \quad (11)$$

où $C(l,t)$ est la concentration en traceur radio-opacifiant. Il faut aussi noter que l'unité du coefficient d'atténuation du traceur utilisé, μ_c , est différente de celle des autres coefficients d'atténuation introduits.

On peut réécrire cette expression en introduisant une constante K :

$$I(t) = I_0 K \exp\left(-\int_l \mu_c C(l, t) dl\right) \quad (12)$$

La « constante » K dépend à priori de l'échantillon considéré : l'épaisseur de paille (ici on parle de l'épaisseur cumulée en parois végétales, e_{paille}) peut varier d'un échantillon à l'autre, ce qui a aussi un impact sur l'épaisseur d'eau L_{eau} traversée. La quantité de téflon ajoutée peut elle aussi varier légèrement. Mais on s'attend raisonnablement à ce que K varie relativement peu d'une expérience à l'autre.

Comme vu sur le schéma, la région d'intérêt considérée sera centrée sur l'axe de symétrie du dispositif et relativement fine, ainsi on peut effectuer l'intégration le long du chemin optique, en notant que la zone traversée par le chemin optique et occupée par de l'eau chargée en traceur a une épaisseur $2e$:

$$I(t) = I_0 K \exp(-\mu_c 2e \langle C(t) \rangle) \quad (13)$$

où $\langle C(t) \rangle$ est la concentration moyenne dans la paille, modélisée par l'expression théorique (5).

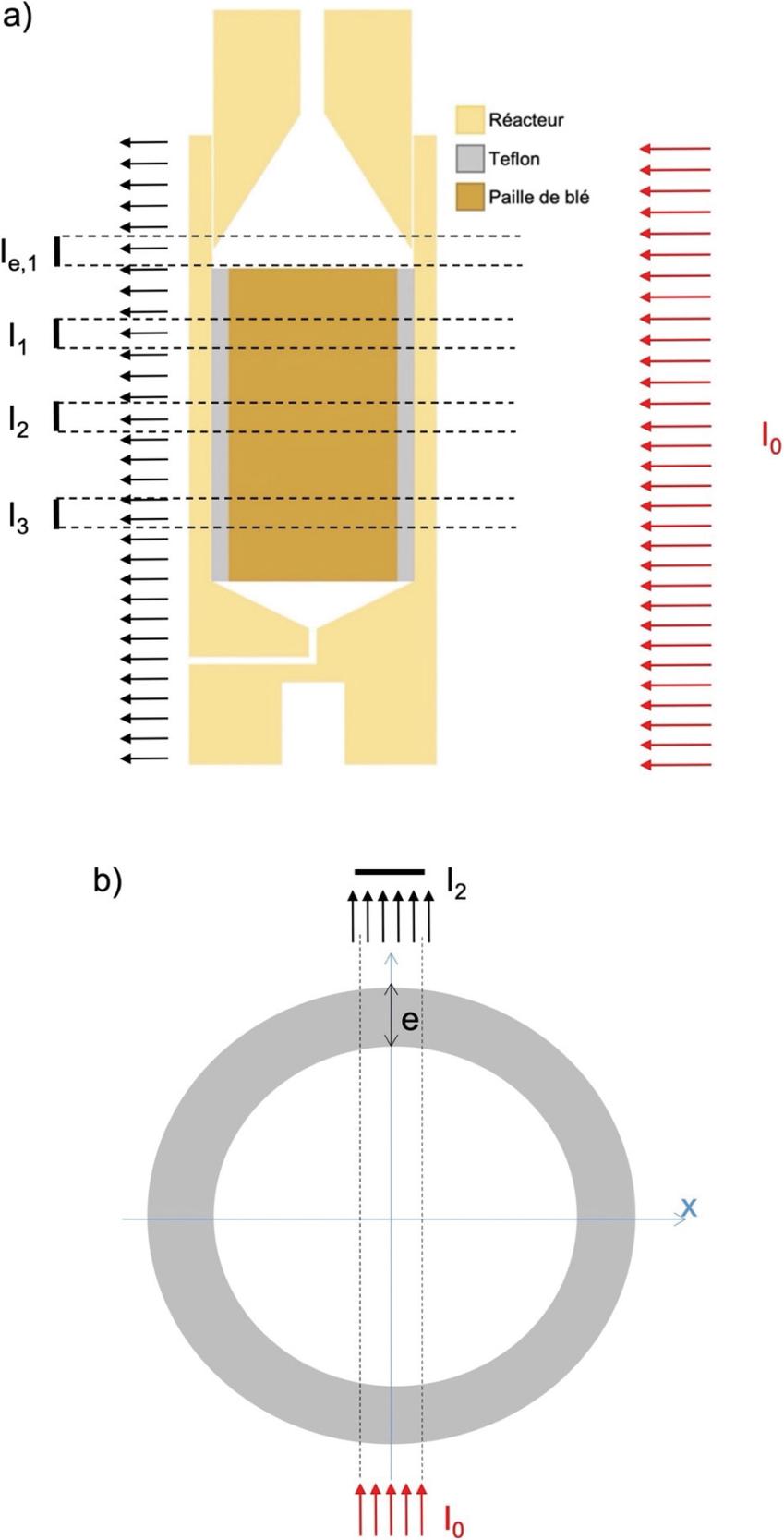


Figure 18 : Coupes longitudinale (a) et transverse (b) illustrant le positionnement des régions d'intérêt utilisées pour nos mesures.

On ne peut pas mesurer l'intensité incidente I_0 , en « amont » de la zone donnant le signal I . On fait l'hypothèse que celle-ci peut être obtenue par moyenne sur une région d'intérêt située « à côté » de l'échantillon sur les radiographies X. On constate généralement que celle-ci dépend du temps, à cause de fluctuations dans le fonctionnement de la source, et ce d'autant plus qu'elle est allumée depuis un temps relativement court quand l'expérience est lancée. On notera donc explicitement $I_0(t)$ désormais.

Elle dépend aussi de l'endroit où l'on se trouve sur l'image (en dehors de la zone occupée par l'échantillon). La variabilité spatiale de l'intensité est cependant faible : elle est corrigée lors de la phase de mise au point du tomographe mais peut réapparaître progressivement au cours du temps. On verra plus loin comment on corrige au mieux cette faible variabilité spatio-temporelle de $I_0(t)$.

Quand $t \rightarrow \infty$ (aux temps suffisamment longs), $\langle C(t) \rangle \rightarrow 0$

$$I_\infty \equiv I(t \rightarrow \infty) = I_{0,\infty} K \quad (14)$$

d'où une manière d'avoir accès expérimentalement à la constante K . L'équation (13) peut s'écrire :

$$\ln\left(\frac{I(t)/I_0(t)}{I_\infty/I_{0,\infty}}\right) = -2e\mu_c \langle C(t) \rangle \quad (15)$$

$$\langle C(t) \rangle \propto \ln(K) - \ln\left(\frac{I(t)}{I_0(t)}\right) \quad (16)$$

En combinant ce résultat avec l'expression théorique (5), on voit que l'on peut avoir une mesure de coefficient de diffusion effectif du traceur D à partir des mesures expérimentales d'atténuation. Même si notre modèle de diffusion s'avère être faux, ou trop simpliste, les données expérimentales obtenues sur l'évolution temporelle de la concentration moyenne pourraient être utilisées pour tester un modèle plus sophistiqué.

Une des difficultés expérimentales mentionnées dans la description du dispositif expérimental est que le rinçage n'est jamais parfait : la concentration en traceur dans l'écoulement ne passe pas instantanément de C_0 à 0 (cela sera illustré plus loin, à partir de données expérimentales). Si du traceur reste présent dans l'eau après le début du rinçage, l'atténuation mesurée n'est

pas due seulement à la présence de l'agent de contraste dans le matériau poreux mais aussi à celui présent dans l'écoulement :

$$I(t) = I_0(t)K \exp(-\mu_c(L_{eau}\langle C_e(t) \rangle + 2e\langle C(t) \rangle)) \quad (17)$$

où $\langle C_e(t) \rangle$ est la concentration moyenne dans l'eau en cours de rinçage et L_{eau} l'épaisseur d'eau traversée, égale au diamètre intérieur de la paille, dans notre modèle de paille à la géométrie annulaire.

On peut effectuer une mesure de l'intensité sur une région d'intérêt située juste en amont de l'échantillon, au-dessus de la paille : le traceur n'est présent que dans la partie occupée par l'eau (la lame d'eau a à cet endroit une épaisseur notée $L_{eau,e}$) :

$$I_e(t) = I_0(t)K_e \exp(-\mu_c\langle C_e(t) \rangle L_{eau,e}) \quad (18)$$

Attention, la constante K_e est différente de K : en entrée les épaisseurs de matériaux traversés diffèrent (pas de téflon ni de paille au niveau de l'entrée). De plus, si le rinçage est trop lent, il peut y avoir un décalage temporel sur la concentration dans l'eau, qui peut dépendre alors de la hauteur : il faudrait alors prendre en compte le temps mis pour le signal de concentration pour traverser le dispositif. On verra que ceci est négligeable.

Diviser $I(t)$ par $I_e(t)$ apparait comme une solution naturelle pour corriger cet effet d'entrée, tout en incluant la correction par $I_0(t)$:

$$\frac{I(t)}{I_e(t)} = \frac{K}{K_e} (-\mu_c(\langle C_e(t) \rangle)(L_{eau} - L_{eau,e}) + 2e\langle C(t) \rangle) \quad (19)$$

mais la correction n'est pas parfaite à cause de la différence d'épaisseur d'eau traversée.

Si on repart de l'expression (17) de $I(t)$, on peut obtenir :

$$I(t) = I_0(t)K \exp\left(\ln\left(\frac{I_e(t)}{I_0(t)K_e}\right)\frac{L_{eau}}{L_{eau,e}}\right) \exp(-\mu_c 2e\langle C(t) \rangle) \quad (20)$$

Globalement, on verra que l'expression (13) est suffisante, par rapport à l'expression (20) plus compliquée. En effet, vu notre modèle diffusif, on peut obtenir l'information qui nous intéresse aux temps longs, pour lesquels la concentration d'entrée est à coup sûr négligeable. Par ailleurs, le rinçage effectué, même s'il n'amène pas un front de rinçage parfait, n'est pas

si mauvais : on verra la concentration $\langle C_e(t) \rangle$ est faible après le passage du front de rinçage. Enfin, il faut noter que la différence dans les épaisseurs de lames d'eau traversées $L_{eau} - L_{eau,e}$ est faible elle aussi.

En résumé, si le rinçage est « parfait » :

$$I(t) = I_0(t)K \exp(-\mu_c 2e \langle C(t) \rangle) \quad (21)$$

$$\langle C(t) \rangle = \frac{1}{2e\mu_c} [\ln(K) - \ln(I/I_0)] \quad (22)$$

Si le rinçage n'est pas instantané, il y a une concentration en traceur en entrée :

$$I_e(t) = I_0(t)K_e \exp(-\mu_c L_e \langle C_e(t) \rangle) \quad (23)$$

$$\langle C_e(t) \rangle = \frac{1}{L_e\mu_c} [\ln(K_e) - \ln(I/I_e)] \quad (24)$$

et donc au niveau du réacteur :

$$I(t) = I_0(t)K \exp(-\mu_c L \langle C_e(t) \rangle - \mu_c 2e \langle C(t) \rangle) \quad (25)$$

$$\langle C(t) \rangle = \frac{1}{2e\mu_c} \left(\ln(K) - \ln(I/I_0) + \frac{L}{L_e} \ln(I_e/(K_e I_0)) \right) \quad (26)$$

On peut noter pour finir que K_e est sans doute la même d'une manip à l'autre car mesurée au même endroit dans le bioréacteur, avec une expression indépendante de la paille, c'est-à-dire de l'épaisseur de l'échantillon et de la couche de téflon entourant celui-ci.

3.2.3. Modélisation du signal vs mesures expérimentales

Dans cette partie, on va analyser les résultats d'une expérience d'éluion type dans laquelle le traceur est l'ion I^- , obtenu en diluant du iodure de potassium (KI) dans l'eau. Il s'agit notamment de tester les hypothèses et l'analyse du signal présentée précédemment.

La Figure 13 introduite précédemment présente des radios prises à différents instants. Initialement, la solution d'eau radio-opacifiante occupe tout le volume du bioréacteur. Puis, le front de rinçage pénètre dans le champ visualisé et l'intensité sur les images évolue rapidement (en quelques radios, prise à une fréquence de 2 Hz). Enfin s'ensuit une phase assez longue où le signal relaxe progressivement. Pour analyser le signal, on définit plusieurs régions d'intérêt, introduites sur la Figure 19 : on définit plusieurs régions permettant d'obtenir I_0 ($I_{0,1}, \dots, I_{0,10}$), deux régions pour l'entrée ($I_{e,1}$ et $I_{e,2}$), une à la sortie de la paille (I_s) et 3 centrées sur la partie centrale de la paille (I_1, I_2 et I_3).

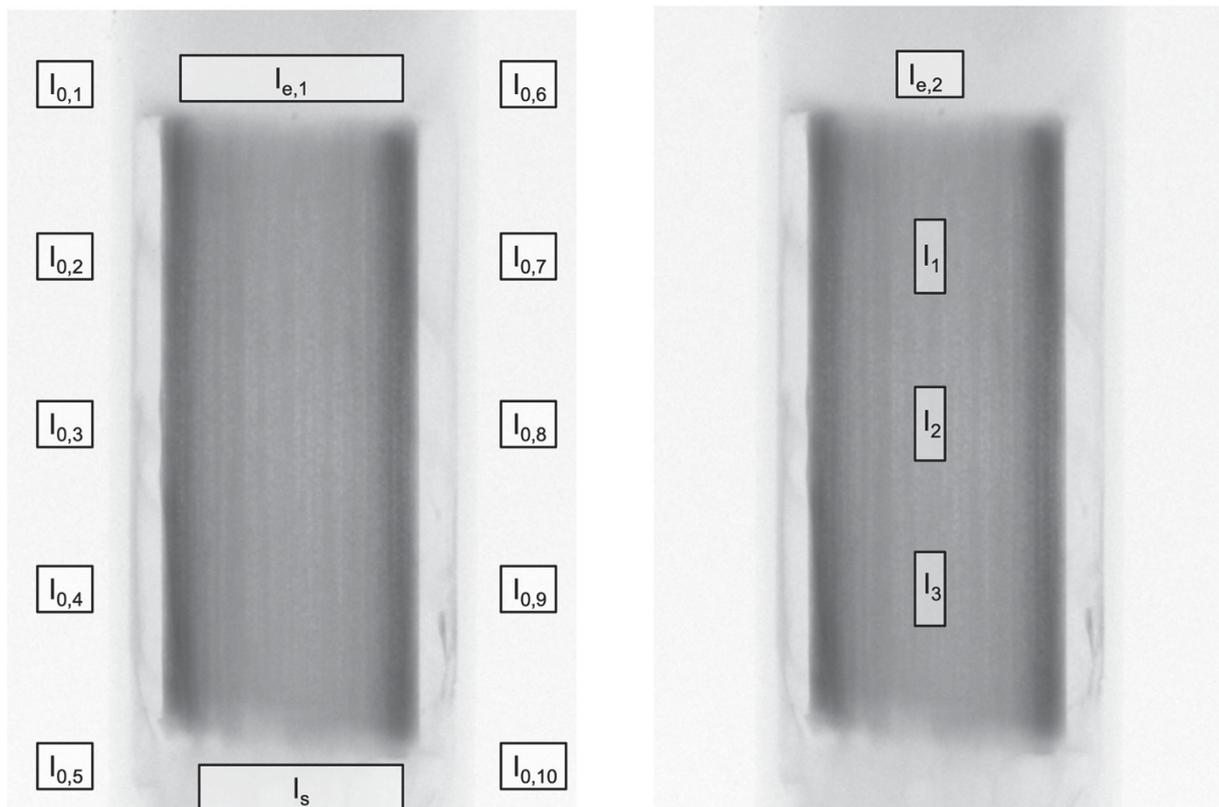


Figure 19 : Les différentes régions d'intérêt utilisées pour tester la modélisation et les hypothèses faites.

Sur la Figure 20 on trace quelques signaux $I_{0,i}(t)$: 3 pris à gauche de la paille (en bleu) et 3 à droite (en rouge). Lorsque l'expérience commence, la source X est encore en train de se

stabiliser, d'où la variabilité des signaux sur les 100 premières secondes environ. Le signal est plus intense sur la partie basse de l'image, la différence gauche-droite est moins marquée. Pour compenser cette variabilité spatiale, on prendra soin, à chaque fois qu'un signal $I_i(t)$ sera renormalisé par $I_0(t)$, de prendre le signal I_0 de référence à la même position verticale sur l'image (ainsi, dans le cas des régions d'intérêt introduites sur la Figure 19, on utilisera $I_2/I_{0,3}$). Cependant, il faut bien noter que les différences d'un signal $I_{0,i}(t)$ à l'autre sont très faibles, relativement aux variations vues sur les signaux de type I_i , comme on va le voir sur la Figure suivante.

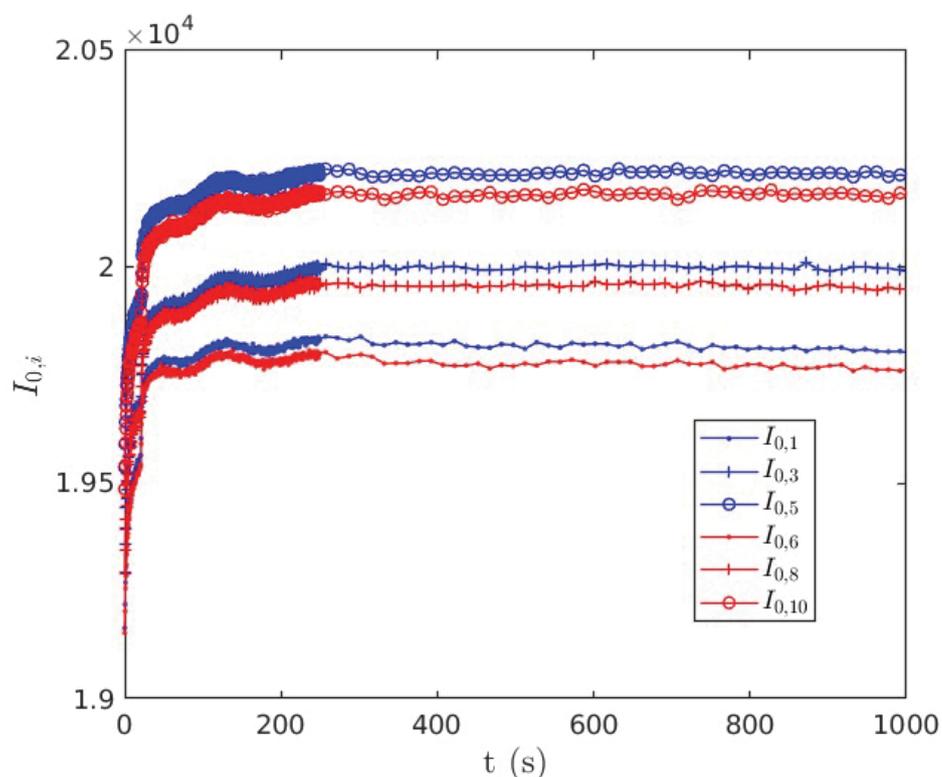


Figure 20 : Mesure de l'intensité en fonction du temps dans différentes régions d'intérêt illustrées sur la Figure 19.

Sur la Figure 21.a, on a tracé les deux entrées, la sortie et les trois signaux I_i . On a aussi tracé un des signaux I_0 , pour mettre en perspective ce que l'on disait ci-dessus : les variations des signaux $I_{0,i}$ sont très faibles par rapport aux autres. On observe tout d'abord que les signaux I_1 , I_2 et I_3 sont quasiment identiques. De même, nous n'observons pas de différences sur les deux entrées. La Figure 21.b reprend les données de la Figure 21.a mais se concentre aux temps courts, au moment du passage du front de rinçage. En comparant les signaux d'entrée (qui sont eux aussi similaires) et le signal en sortie, on note un décalage correspondant à une

image, mettant en évidence le fait que le temps de passage dans le réacteur est de l'ordre de la seconde. Le signal en entrée est relativement « propre » : il ne s'agit pas d'un créneau net mais le passage à une concentration d'entrée n'évoluant plus se fait en quelques dizaines de seconde.

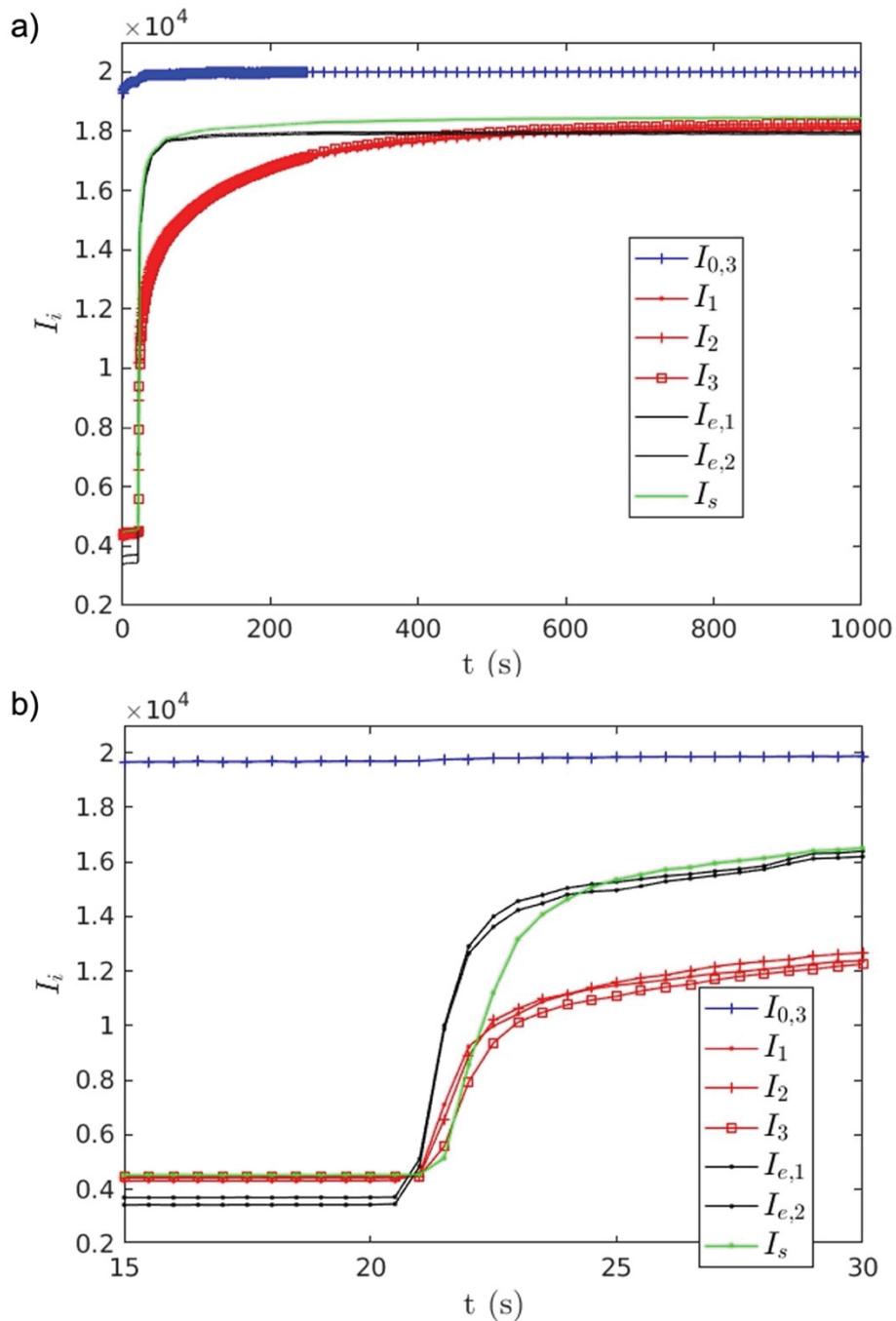


Figure 21 : Mesures de l'intensité transmise au niveau de plusieurs régions d'intérêt (définies sur la Figure 19), en fonction du temps.

Une autre manière d'examiner la propreté du rinçage est de tracer un diagramme spatio-temporel sur un profil d'intensité positionné sur la largeur de l'entrée, Cf Figure 22. Le front de rinçage est net en première approximation mais on observe la présence de trainées plus sombres, de volutes au niveau de l'entrée, après le passage du front. On fait l'hypothèse que ce phénomène est causé par le mélange entre la solution chargée en traceur et l'eau pure, dans le tube en aval du switch et en amont du réacteur.

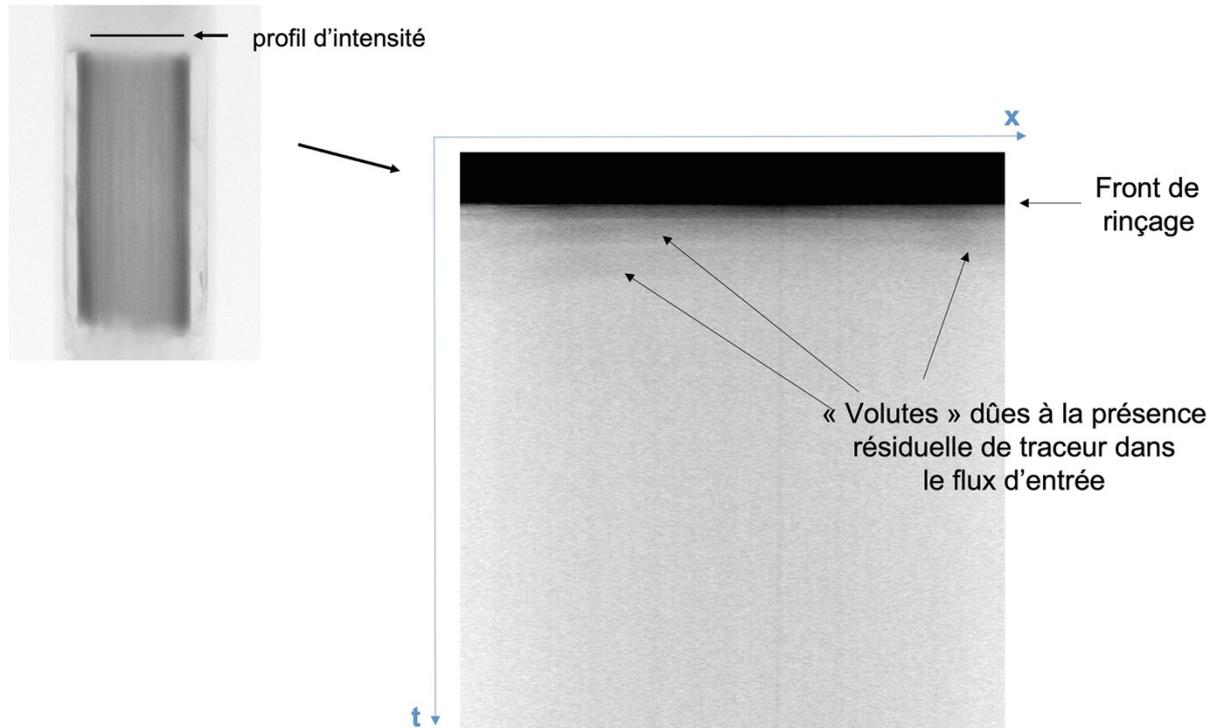


Figure 22 : Diagramme spatio-temporel obtenu à partir du profil d'intensité montré sur la radiographie en haut à gauche. Le passage du front est mis en évidence par le passage de la zone sombre (présence de traceurs au niveau du profil d'intensité) à la zone claire. Les volutes sombres que l'on peut discerner au niveau de la zone claire sont responsables du rinçage non parfait.

Pour finir, on peut tracer les différentes expressions donnant la concentration moyenne, voir Figure 23. Le signal de concentration obtenue, en faisant l'hypothèse que le front de rinçage est un créneau parfait (équation (22)) est donné par les points bleus (il s'agit du signal I_2). Le résultat obtenu en considérant que l'intensité du fond est constante (avec une valeur de 19980, voir Figure 21) est très proche, ce qui montre le faible impact des fluctuations du fond. L'utilisation de la formule (24) permet d'estimer la concentration en entrée, qui tend rapidement vers 0. Enfin, si on estime le rapport L/L_e , on peut utiliser l'équation (26) pour corriger le signal de la concentration moyenne dans la paille des effets d'entrée. Connaissant

les dimensions de notre dispositif et les dimensions typiques de échantillons de paille de blé, on peut estimer que le rapport L/L_e est toujours supérieur à 0.8 (1 étant une borne supérieure). Les résultats pour $L/L_e = 0.8$ et 1 sont montrés sur la Figure 23). Par rapport à l'équation (22), la prise en compte de la concentration en entrée conduit à diminuer la concentration dans la paille (équation 26 sur la Figure 23). Cependant, après une minute d'expérience, les effets du rinçage non parfait deviennent négligeables : la concentration d'entrée est quasi nulle et la concentration moyenne est donc la même, que l'on utilise les équations (22) ou (26).

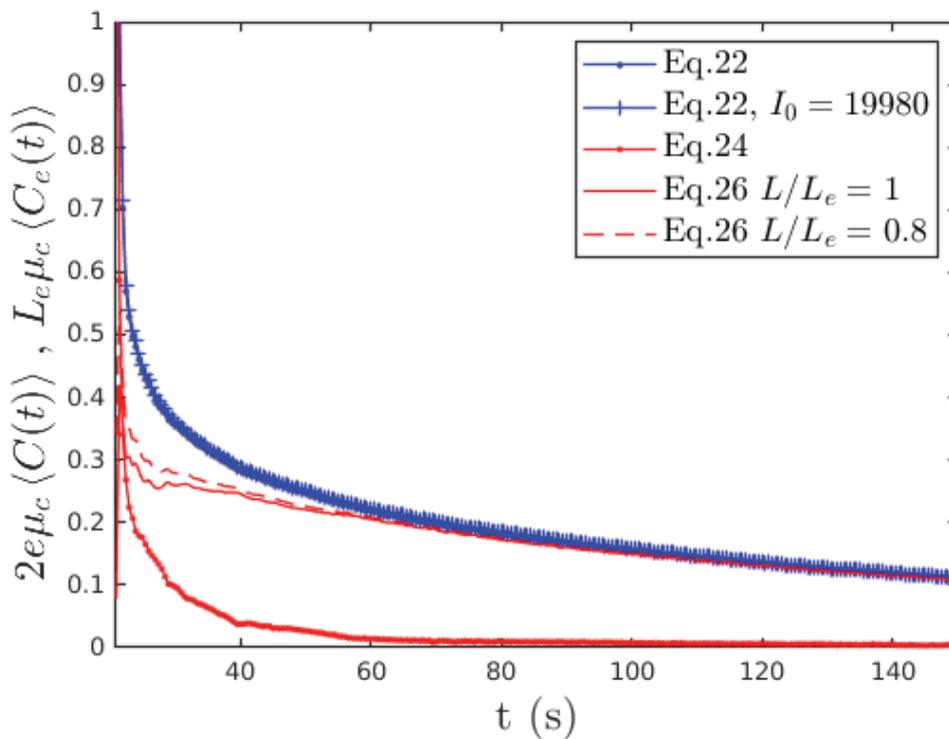


Figure 23 : Signaux expérimentaux proportionnels aux concentrations moyennes dans la paille - équation (22) (en bleu) et équation (26) pour deux valeurs du rapport L/L_e (droites continue et pointillée en rouge)-, et dans le flux d'eau en entrée, équation (24) (points et droite continue rouges).

3.3. Conclusions

Dans ce Chapitre, nous avons présenté le cadre théorique dans lequel nous allons nous placer pour l'interprétation de nos expériences. L'utilisation de la radiographie X permet de remonter à la concentration moyenne en traceur dans la paille de blé, en cours de rinçage et cette évolution peut être reliée relativement simplement au coefficient de diffusion effectif du traceur considéré, dans le cadre du modèle simple utilisé. Le Chapitre suivant présente l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion.

Chapitre 4. Résultats expérimentaux et discussion

Dans ce Chapitre, nous présentons les résultats expérimentaux obtenus, en suivant l'analyse des données présentée dans le Chapitre précédent, dans le cadre théorique présenté. Nous verrons que ceux-ci ne sont pas entièrement satisfaisants et appellent à discussion.

4.1. Résultats obtenus en utilisant le iodure de potassium comme traceur

Sur la Figure 24, on montre les données typiques pour une expérience d'élution réalisée avec du KI comme traceur. La Figure 24.a montre le signal sur toute la gamme temporelle, l'allure d'exponentielle décroissante est bien mise en évidence. La Figure 24.b zoome sur le signal aux temps longs. Autour de $t=1000s$, l'intensité du signal montrée en ordonnée de ces figures a diminué d'un facteur 100 par rapport à sa valeur initiale. La concentration au sein de la paille a donc diminué environ d'un facteur 100. La Figure 24.c reprend les mêmes données avec une échelle logarithmique en ordonnée, de manière à mettre en évidence la décroissance linéaire prévue par l'équation (6).

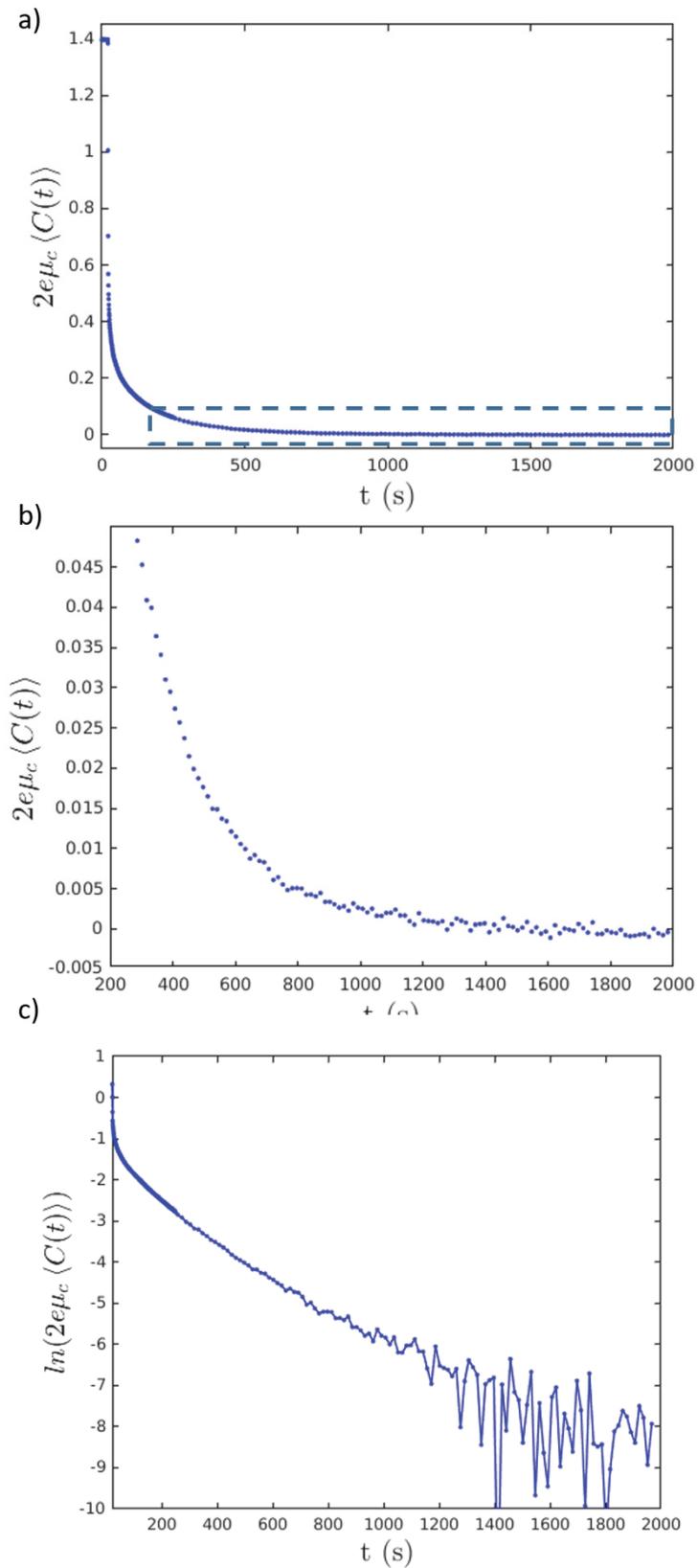


Figure 24 : Évolution d'une grandeur proportionnelle à la concentration en traceur au cours du temps. (a) dans toute la gamme temporelle de l'expérience, (b) aux temps longs et (c) en échelle logarithmique.

On cherche désormais à déterminer la pente P de la zone linéaire, qui est homogène à l'inverse d'un temps. La valeur du temps caractéristique $1/P$ dépend de l'intervalle de temps utilisé pour l'ajustement des données, comme récapitulé dans le Tableau 3. La Figure 25 montre l'ajustement linéaire calculé, superposé aux données expérimentales, pour deux intervalles de temps. Plus l'intervalle de temps est décalé vers les temps courts, plus la pente augmente. Cependant, à cause des effets d'entrée mis en évidence sur la Figure 23, on a tendance à plus faire confiance aux données issues du traitement sur les temps longs (même si le signal est plus faible), en excluant les données bruitées au-delà de 1200 secondes, correspondant à des concentrations très faibles, à la limite de détection. On pourrait également se poser la question d'un changement de régime : un aux temps courts et un au temps longs, mais ceci n'est pas considéré dans cette étude. Cela aurait peut-être un lien avec la nécessité d'un modèle plus sophistiqué du transfert dans la paille.

Intervalle de temps utilisé pour ajustement	1/P (en s)
[100 - 1000]	220
[200 - 1000]	229
[300 - 1000]	236
[300 - 1200]	247
[400 - 1000]	243
[100 - 500]	187
[200 - 500]	196
[100 - 400]	177

Tableau 3 : Évolution de la pente obtenu par un ajustement des données, en fonction de l'intervalle de temps utilisés. Les données ajustées sont celle montrées en Figure 24.

A partir des données du Tableau 3, on estime une constante de temps typique et l'incertitude sur cette valeur à $1/P = 240 \text{ s} \pm 5\%$. Il faut noter que l'on peut aussi comparer les ajustements en comparant les résidus : pour le cas discuté, l'ajustement est légèrement meilleur pour l'intervalle [400 s – 1000 s] mais pas significativement par rapport aux autres intervalles.

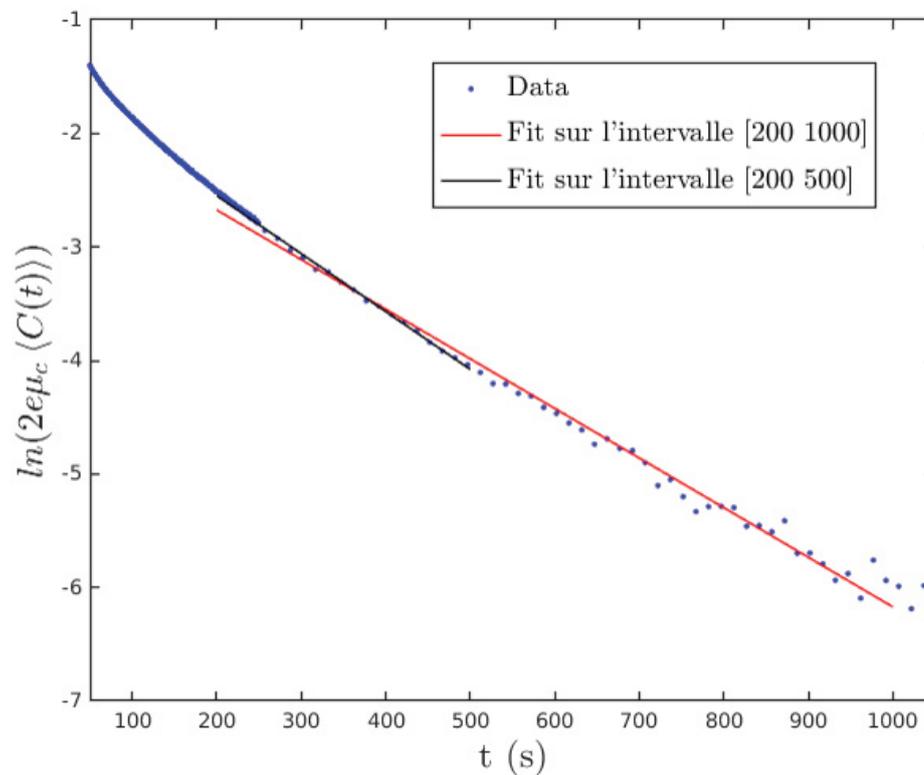


Figure 25 : Évolution d'une grandeur proportionnelle à la concentration en KI au cours du temps lors d'une expérience d'éluion (points bleus). En rouge et en noir, ajustement de la pente sur deux intervalles de temps, respectivement [200s 1000s] et [200s 500s].

Pour remonter au coefficient de diffusion, on utilise la formule :

$$D = \frac{(2e)^2}{\pi^2} P \quad (27)$$

où l'épaisseur e est déterminée sur les radiographies comme présenté précédemment. On estime l'incertitude sur e à quelques pixels soit une erreur relative de 5%.

L'incertitude sur D découle des incertitudes sur P et e :

$$\frac{\delta D}{D} = \sqrt{\left(\frac{\delta P}{P}\right)^2 + 4\left(\frac{\delta e}{e}\right)^2} \quad (28)$$

Elle vaut 11% au vue des incertitudes sur e et P estimées ci-dessus. Le Tableau 4 regroupe l'ensemble des données sur D , pour les 6 expériences réalisées avec KI comme traceur, pour tous les échantillons, natifs (d0) ou digérés (d45).

4.2 Autres traceurs : gastrografine, visipaque et ioméron.

Traceur-temps-#	1/P [s]	Épaisseur (e)[μm]	D [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$]
KI-d0-1	240	370	$(2,3 \pm 0,2).10^{-10}$
KI-d0-2	248	366	$(2,2 \pm 0,2).10^{-10}$
KI-d0-3	163	374	$(3,5 \pm 0,35).10^{-10}$
KI-d45-4	250	370	$(2,2 \pm 0,2).10^{-10}$
KI-d45-5	201	382	$(2,95 \pm 0,3).10^{-10}$
KI-d45-6	245	383	$(2,4 \pm 0,25).10^{-10}$

Tableau 4 : Recensement de toutes les pentes et de tous les coefficients de diffusions effectifs pour les échantillons de paille de blé ayant comme traceur le KI.

Nous n'observons que peu de différences entre les échantillons natifs et ceux digérés, si on exclut l'échantillon KI-d0-3 qui semble se démarquer des autres. La valeur du coefficient de diffusion du KI dans l'eau est $D_0 = 2.10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ d'après les travaux de Robinson and Stokes [12]. Malgré la dispersion dans les échantillons, nous sommes systématiquement en deçà de cette valeur, avec différence significative d'environ un ordre de grandeur entre les coefficients de diffusion effectifs D dans la paille de blé sans distinction de son état et le coefficient de diffusion D_0 dans l'eau.

D'une part, le fait que nous ne voyons pas de différence avant et après dégradation enzymatique nous fait penser que les ions I⁻, qui sont tracés par la mesure, sont trop petits pour « ressentir » d'éventuels changements impliqués par la dégradation enzymatique. Cependant, le fait que leur coefficient de diffusion effectif soit plus faible que celui dans l'eau implique que les parois végétales traversées ont un effet, en quelque sorte en ralentissent la diffusion.

Ce résultat nous a poussé à utiliser des traceurs plus gros pour savoir quel sera leur comportement. C'est cela que nous allons explorer dans la partie suivante.

4.2. Autres traceurs : gastrografine, visipaque et ioméron.

Dans cette section nous allons discuter des résultats obtenus avec les autres traceurs radio-opacifiants utilisés dans notre étude, et qui ont la particularité d'avoir des tailles différents.

4.2.1. Gastrografine®

Pour rappel (section 2.1.3), le DTA (molécule active) présent dans la gastrografine mesure environ 5,5 nm et est donc environ 10 fois plus grand que les ions issus de la dissociation de KI. Cette taille est équivalente à la taille typique des enzymes.

Pour calculer le coefficient de diffusion du DTA dans l'eau, nous utilisons la loi de Stokes-Einstein pour la diffusion [13]:

$$D = \frac{RT}{N} \times \frac{1}{6\pi\mu_f r} \quad (29)$$

Ici R est la constante des gaz parfaits, T la température, N le nombre d'Avogadro, μ_f la viscosité du milieu (ici de l'eau) et r le rayon de la particule qui diffuse. Dans le cas de la gastrografine à 20°C, le coefficient de diffusion dans l'eau est égal à $D_0 = 4,6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Nous avons acquis et traité les données de la même façon que pour les expériences menées avec KI.

Sur la Figure 26.a, on trace l'évolution d'un signal proportionnel à la concentration, similaire à celui présenté sur la Figure 24.a pour KI. On observe que sur la durée totale d'acquisition, le signal n'a pas relaxé vers une concentration nulle. Il est difficile de déterminer l'état initial à cause du rinçage non parfait et donc d'estimer le moment exact où l'on peut avoir la valeur de la concentration initiale. Cependant, en ordre de grandeur, la concentration en traceur a été réduite d'un facteur 2 environ, durant la durée de l'élution.

Nous avons donc décidé d'ajuster ces résultats par une courbe exponentielle résultant de la combinaison des équations (5) et (21). Il s'agit donc d'un ajustement sur 3 paramètres (K, a et P) :

$$\frac{I(t)}{I_0} = K \exp(-A e^{-Pt}) \quad (30)$$

Comme précédemment, nous privilégions les données aux temps longs, pour s'affranchir de tous les effets dus à un rinçage non parfait. Par ailleurs, le signal reste marqué aux temps longs, contrairement à ce que l'on observe lorsque le KI est utilisé comme traceur.

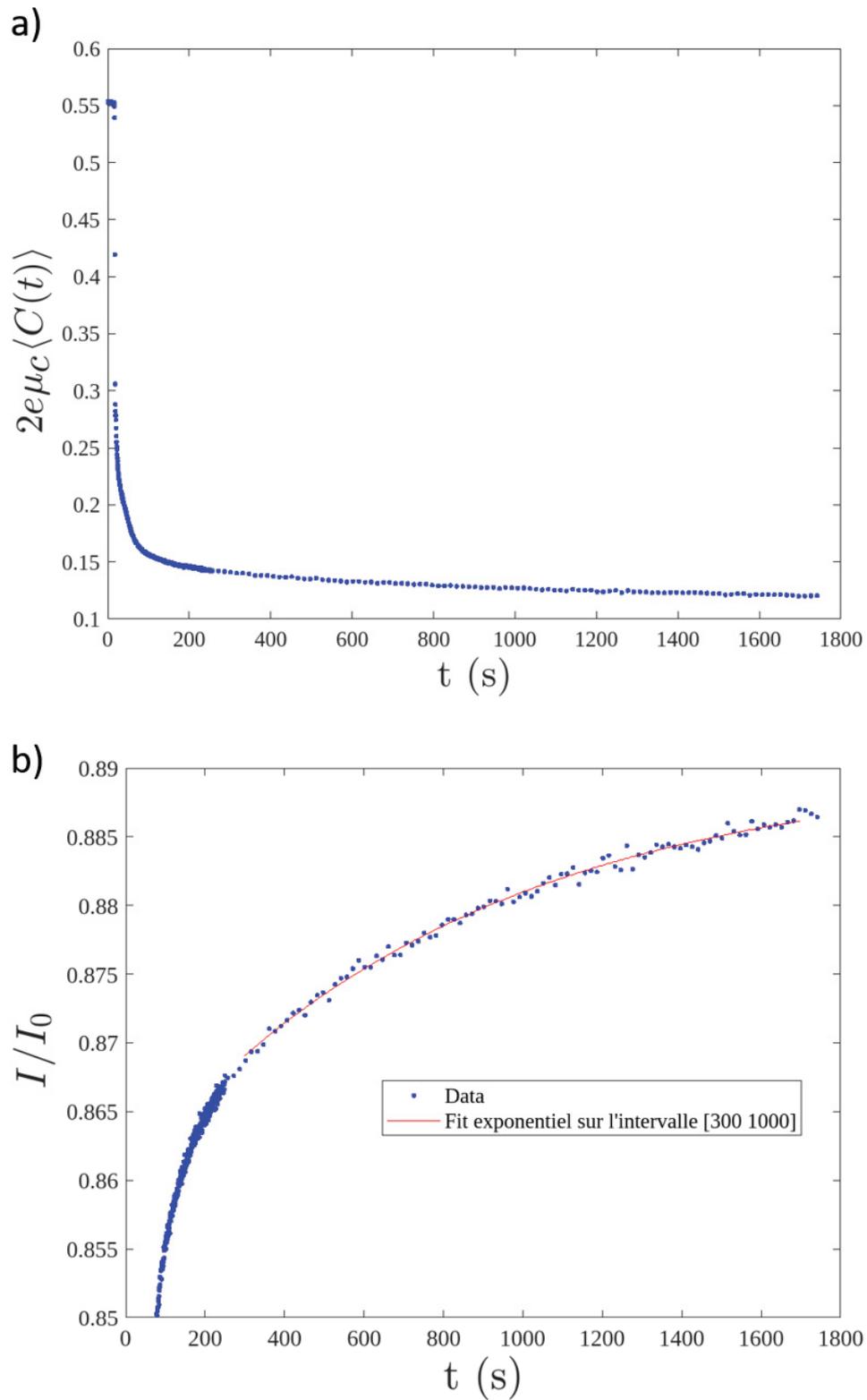


Figure 26 : a) Évolution d'une grandeur proportionnelle à la concentration en gastrografine au cours du temps lors d'une expérience d'éluion (points bleus). b) Ajustement des données aux temps longs (intervalle [300s 1800s]) par l'équation (30), pour extraire la constante de temps $1/P$.

Le Tableau 5 ci-dessous présente les résultats obtenus pour tous les échantillons utilisés avec de la gastrografine.

Traceur-temps-#	1/P [s]	Épaisseur (e) [μm]	D [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$]
Gastrografine-d0-1	730	434	$(1,05 \pm 0,15).10^{-10}$
Gastrografine-d0-2	710	426	$(1,04 \pm 0,15).10^{-10}$
Gastrografine-d45-3	528	369	$(1,05 \pm 0,15).10^{-10}$
Gastrografine-d45-4	686	348	$(0,71 \pm 0,1).10^{-10}$
Gastrografine-d45-5	1178	372	$(0,48 \pm 0,06).10^{-10}$

Tableau 5 : Récapitulatif des valeurs de P, épaisseurs et coefficients de diffusion effectifs pour les expériences utilisant la gastrografine®.

Les valeurs du coefficient effectif trouvés sont inférieures à la valeur calculée pour D_0 , mais l'écart entre ces dernières est moins important. Comme nous nous attendions à un effet plus marqué, nous avons repris les images et c'est à ce moment que nous nous sommes questionnés sur l'état d'imbibition des échantillons, en début d'expérience. Comme vu sur la Figure 9, nous avons alors remarqué que les pailles n'étaient pas entièrement imbibées : seule une première couronne de cellules (celles du parenchyme) est imbibée. Cet état d'imbibition change donc l'épaisseur de paille « vue par le traceur », car celui-ci n'est initialement présent que sur une épaisseur e' plus petite que l'épaisseur e totale de la paille. De plus, si le traceur n'a pas pénétré plus loin dans la paille après le protocole d'imbibition décrit précédemment, il est raisonnable de penser qu'au cours de l'expérience ce dernier ne diffusera que vers le PCL (vers l'intérieur de la paille là où l'eau passe) et non vers l'épiderme. La condition de flux nulle vers l'extérieur peut être conservée.

En étudiant plus attentivement les radiographies et notamment des profils transverses d'intensité du même type que celui tracé en Figure 17, nous détectons un effet de cet état d'imbibition hétérogène. Les irrégularités dans le profil transverse permettent en effet d'estimer l'épaisseur e' sur laquelle le traceur diffuse effectivement, comme illustré sur la Figure 27.

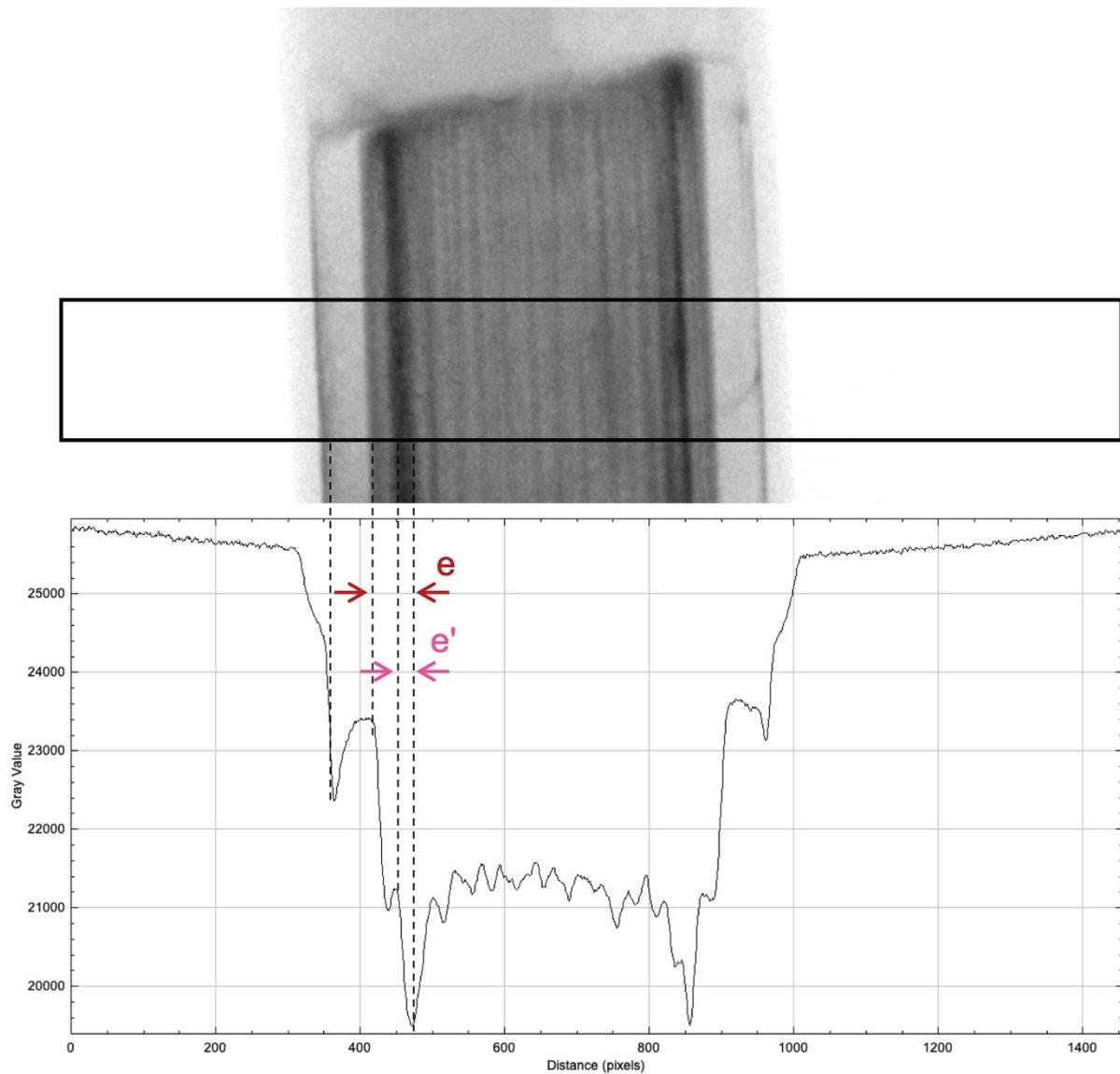


Figure 27 : En haut, une radiographie prise juste après le passage du front de rinçage. En bas, le profil d'intensité mesuré avec ImageJ au niveau du cadre noir superposé à la radio, en moyennant sur la hauteur de celui-ci. L'absence de traceur dans la partie externe de l'échantillon est visible et on peut extraire les épaisseurs e et e' de la forme caractéristique de ce profil.

Sur les 5 échantillons utilisés avec la gastrografine, le rapport e'/e varie entre 0,43 et 0,74 avec une moyenne à 0,55. Il s'agit donc d'un effet important et donc problématique pour la détermination du coefficient de diffusion. Le Tableau 6 donne les nouvelles valeurs de celui-ci en considérant l'épaisseur corrigée e' plutôt que e . On estime l'incertitude sur la détermination de e' à 15%. En considérant une incertitude sur P de 10 % (qui s'obtient en regardant la sensibilité de P en fonction des intervalles temporels utilisés pour l'ajustement des données), l'incertitude finale sur D est de l'ordre de 30 %.

Traceur-temps-#	1/P [s]	Épaisseur (e') [μm]	D [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$]
Gastrografine-d0-1	730	226	$(0,28 \pm 0,08).10^{-10}$
Gastrografine-d0-2	710	240	$(0,33 \pm 0,11).10^{-10}$
Gastrografine-d45-3	528	272	$(0,57 \pm 0,19).10^{-10}$
Gastrografine-d45-4	686	150	$(0,13 \pm 0,04).10^{-10}$
Gastrografine-d45-5	1178	198	$(0,13 \pm 0,04).10^{-10}$

Tableau 6 : Récapitulatif des valeurs de P, épaisseurs corrigées e' et coefficients de diffusion effectifs pour les expériences utilisant la gastrografine®.

Outre l'incertitude plus grande qu'avec KI, la dispersion des données est importantes et ne permet pas de trancher quant à un éventuel effet de la digestion enzymatique. On peut tout au plus conclure que le coefficient de diffusion effectif est inférieur à celui obtenu dans l'eau pure, estimé en utilisant la formule théorique (29) (nous n'avons pas trouvé de valeurs publiées dans la littérature).

4.2.2. Visipaque et ioméron

Nous avons réalisé quelques expériences avec ces deux derniers traceurs : une par type d'échantillon (natif ou ayant subi une digestion enzymatique), soit deux par traceurs. Là encore nous avons réalisé après coup qu'il y avait un potentiel problème d'imbibition des échantillons, même si l'effet semble moins marqué qu'avec la gastrografine au vu des profils d'intensité. Par ailleurs, comme pour la gastrografine, la concentration en traceur évolue lentement, avec une diminution d'un facteur 2 tout au plus durant la durée d'acquisition.

Il semble donc délicat d'extraire une valeur de coefficient de diffusion, on peut juste noter la valeur des temps caractéristiques 1/P issues de l'ajustement des données : 1130 s et 1145 s pour les deux expériences avec le visipaque et 1224 s et 1135 s pour les deux expériences avec ioméron.

4.2.3. Conclusions sur l'utilisation de ces traceurs

L'utilisation de ces trois traceurs a posé de nombreux problèmes. Nous avons déjà évoqué celui lié à l'imbibition hétérogène. Cet effet peut être quantifié en tomographiant l'échantillon avant l'élution, ce qui n'a pas été fait pour le jeu de donnée présenté ici. Nous avons détecté le problème a posteriori et l'avons quantifié par tomographie sur d'autres échantillons que ceux utilisés pour l'élution. La détermination de l'épaisseur corrigée peut néanmoins se faire à partir des profils d'intensité mais elle est relativement imprécise. Ce point pourrait être corrigé en diminuant le champ visualisé sur les radiographies, pour gagner en résolution spatiale.

Par ailleurs, un autre problème concerne le rinçage. La « qualité » de celui-ci est variable, c'est-à-dire que l'on est plus susceptible d'observer le phénomène de volutes mis en évidence sur la Figure 22 avec ces traceurs qu'avec KI. On fait l'hypothèse que ceci est dû à la viscosité des solutions employées, supérieure à celle de l'eau. Ainsi, le front séparant la solution du fluide de rinçage (de l'eau pure) est peut-être moins propre.

Enfin, nous avons trouvé des références (par exemple [14]) évoquant un potentiel problème de stabilité des liposomes utilisés dans le Ioméron conduisant à des fuites de la macromolécule iodée (le ioméprole) hors des liposomes. Notre idée initiale étant de contrôler précisément la taille des traceurs, il apparaît donc que l'utilisation de Ioméron n'est probablement pas une bonne idée.

4.3. Conclusions et perspectives

Ce Chapitre présente principalement les résultats obtenus avec un dispositif développé pour mesurer un coefficient de diffusion effectif dans la paille de blé. Et ce afin d'étudier ses potentielles variations en fonction de modifications de la structure des parois végétales, induites par une dégradation enzymatique (et non observables par tomographie à rayons X). L'utilisation de la radiographie X permet de mesurer la concentration en traceur au cœur de la paille, son évolution au cours du temps et de la relier à un coefficient de diffusion effectif

via un modèle simple du transport à l'intérieur de la paille de blé (vu comme un milieu poreux homogène).

L'utilisation de KI comme traceur met en évidence sans ambiguïté le transport diffusif d'un ion dans la paille de blé. Le coefficient de diffusion effectif ne semble pas affecté par la digestion enzymatique mais il est un ordre de grandeur inférieur au coefficient de diffusion dans de l'eau. Ce résultat appelle à une modélisation plus fine du transport (par exemple de manière numérique), afin de pouvoir remonter à un coefficient de diffusion des ions au sein des parois cellulaires. Pour les autres traceurs, des conclusions claires ne peuvent être données et l'étude nécessite d'être complétée. Le protocole d'imbibition est un point sensible à retravailler.

Puisqu'un effet des parois est obtenu avec KI, il nous faut également envisager une validation de notre technique. Elle pourrait être obtenue en utilisant un milieu poreux plus simple que la paille de blé, de porosité et structure interne connues afin de pouvoir prédire plus simplement le coefficient de diffusion effectif attendu. Pour rester dans une configuration géométrique proche de celle utilisée, et donc conserver la modélisation employée, nous pourrions utiliser une fibre creuse de filtration, préalablement tomographiée à haute résolution (afin de connaître sa structure).

Nous pensons que le travail présenté dans cette partie est une première étape pour permettre de développer une méthodologie robuste et versatile pour l'étude des propriétés de transport de la paille de blé, à l'aide de la radiographie X.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié la dégradation de la paille de blé par un cocktail enzymatique commercial, Cellic HTEC2. Nous nous sommes appliqués à conserver l'intégrité de la paille afin de pouvoir explorer l'action enzymatique sur un substrat réel. Pour ce faire, nous nous sommes consacrés au développement de multiples outils méthodologiques afin de suivre et caractériser la dégradation enzymatique de cette biomasse lignocellulosique

Tomographie à rayons X

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons montré que la tomographie à rayons X est une technique pertinente pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique et en particulier de la paille de blé. Elle est adaptée à l'aspect 3D des échantillons et à leur complexité structurale qui présente des hétérogénéités à différentes échelles spatiales.

L'utilisation de cette technique permet de se rapprocher des conditions réelles de la dégradation par des enzymes. Dans le Chapitre 1 de la première partie nous avons en effet vu que, dans les travaux reportés par la littérature, les conditions de digestions enzymatiques étaient loin des conditions de dégradation d'un substrat brut [22, 23, 24]. Grâce à la méthodologie mise en place, nous avons pu lever le verrou de la lourde préparation des échantillons et imager la dégradation enzymatique sur un échantillon intact, ayant subi une préparation minimale.

L'aspect 3D est primordial. En effet, nous avons pu observer des hétérogénéités spatiales dans la structure d'échantillons natifs (Figure 74, Partie 1). Une grande majorité des études présentes dans la littérature étudient la dégradation enzymatique sur une zone restreinte de l'échantillon [25, 26]. En fonction de la région initialement choisie, les résultats du suivi de la dégradation enzymatique peuvent être drastiquement différents. Par exemple, si la zone étudiée est initialement une des zones localement moins denses mise en évidence par la tomographie X, alors (cf Figure 74, Partie 1) toute évaluation de l'impact de l'action des enzymes sera faussée par rapport à ce qui aurait pu être mesuré sur une zone initialement

plus dense. Les hétérogénéités spatiales et leur impact sur la dégradation par les enzymes souligne l'importance d'avoir d'une information 3D sur la structure de l'échantillon et donc la pertinence de l'utilisation de la tomographie à rayons X pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique.

Nous avons aussi pu suivre l'activité enzymatique en 3D des échantillons grâce à la mise en place de marqueurs (valeur moyenne et nombre de voxels appartenant au matériau PCW). Ces marqueurs nous ont permis d'accéder à la cinétique de l'hydrolyse. L'utilisation de la tomographie à rayons X permet aussi de révéler les modifications structurelles apparaissant au cours de l'hydrolyse et leur caractère différencié selon l'endroit où l'on se trouve dans l'échantillon. On note la disparition progressive du PCL alors que l'épiderme reste intact à la résolution de l'appareil (Figure 65, Partie 1). On retrouve ce profil de dégradation dans la littérature avec par exemple les coupes microscopiques issues de l'étude de Bertrand et collaborateurs en 2006 où l'on peut clairement voir que la dégradation enzymatique s'est faite de manière préférentielle au niveau du PCL [25]. La tomographie à rayons X nous permet donc de retrouver des résultats de la littérature tout en apportant des informations complémentaires cruciales sur l'aspect tridimensionnel de la dégradation enzymatique et sur sa non-homogénéité.

Ces résultats font ressortir l'aspect multi-échelle de cette technique d'imagerie, de l'échelle macroscopique (les 2 millimètres de hauteur imagés) jusqu'à l'échelle microscopique (celle de l'épaisseur des parois cellulaires), l'accès à l'échelle macroscopique permettant par ailleurs d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, car obtenus en considérant une grande portion de l'échantillon total.

Ainsi, en mettant en évidence l'attaque non homogène des enzymes sur des échantillons présentant des hétérogénéités structurelles à différentes échelles spatiales, et en extrayant des marqueurs semi-quantitatifs de la dégradation enzymatique, ce travail apporte des éléments de réponse à la question initialement posée, à savoir comment les enzymes agissent sur un substrat complexe.

Ce travail sur l'utilisation de la tomographie à rayons X ouvre plusieurs perspectives. Tout d'abord, au niveau méthodologique, il serait intéressant de mener une étude similaire en utilisant non pas un tomographe de laboratoire mais un synchrotron. Cela permettrait d'accéder à des résolutions spatiales plus fines (typiquement en diminuant la taille de voxels

d'un facteur 5) et donc peut-être d'imager des modifications de la structure de la paille de blé auxquelles nous n'avons pas eu encore accès. Ainsi, on peut imaginer que le phénomène de gonflement des parois cellulaires du PCL, que nous avons présenté comme un prélude à leur dégradation (voir §4.3.2.iv), soit mis en évidence de manière indubitable. De plus, le temps de scan bien plus court en synchrotron permettrait également l'acquisition de données dynamiques sur l'hydrolyse enzymatique, si celle-ci est effectuée *in-situ*. Cependant, dans un tel protocole *in situ*, la paille tomographiée serait imbibée de solution enzymatique et on aurait un contraste plus faible entre les parois cellulaires et le matériau environnant, la solution aqueuse, par rapport au cas rencontré dans ce travail où le milieu environnant est l'air. Il n'est pas exclu que ceci impacte sur certaines des étapes de traitement d'images développées au cours de ce travail.

L'utilisation d'un agent de contraste spécifique à la paille de blé pourrait alors être une solution pour que ce type d'acquisitions *in situ* permettent de conserver un niveau de contraste satisfaisant entre les différents matériaux. Mais en l'état, un tel agent de contraste, qui se fixerait spécifiquement ou non sur certains composants des parois cellulaires, n'existe pas encore !

Toujours au niveau méthodologique, l'utilisation de lignes de synchrotron multimodales telles que les lignes *NANOSCOPIUM* ou *SWING* au synchrotron SOLEIL pourrait, en parallèle de l'information structurelles donner des informations sur les modifications chimiques s'opérant au cours de la dégradation enzymatique, par exemple en mettant en évidence la disparition préférentielle de tel ou tel composé des parois végétales. Ce point est en effet un des angles morts de notre étude dans laquelle l'évolution de la densité effective au niveau du PCL (avant sa disparition totale) n'est pas reliée à une évolution de sa composition chimique.

Le temps de traitement et d'analyse d'images pour obtenir est très long. Cela est dû à l'étape de débruitage pouvant prendre en 12 et 16 heures pour un échantillon (1000 coupes). Il serait intéressant de développer une automatisation de l'analyse et de traitement des images afin de gagner du temps. Cela pourrait être accompli via l'utilisation de l'intelligence artificielle et ou de la parallélisation des opérations de traitement d'images.

Expériences d'élution et suivi par radiographie X

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous avons revisité une méthodologie classique dans l'étude des milieux poreux (expérience de type courbe de percée) [1], pour l'appliquer à

l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la paille de blé. Nous avons imaginé un protocole innovant permettant de suivre la concentration en traceur au cœur de la paille de blé par radiographie X en utilisant la loi de Beer-Lambert. Par modélisation du transport au sein de la paille et une analyse poussée des signaux obtenus par radiographie, nous avons pu remonter à un coefficient de diffusion effectif de la paille de blé, lorsque le traceur utilisé est un ion iode négatif. À l'heure actuelle, ce travail reste à compléter et à valider avec l'utilisation d'un milieu modèle, pour confirmer l'ensemble de notre méthodologie. L'utilisation d'une fibre creuse de filtration (en lieu et place de la paille de blé) pourrait permettre de valider notre modèle. En effet, comme la porosité de ce type d'échantillon est connue et contrôlée, on pourrait vérifier que l'on retrouve bien la valeur attendue du coefficient de diffusion effectif (égale au produit du coefficient de diffusion dans l'eau et de la porosité). L'utilisation de KI comme traceur semble robuste. Toutefois nous n'avons pas pris en compte de potentielles interactions entre le traceur (notamment les ions et leur charge ionique) et la paroi végétale et il serait indispensable de creuser ces aspects pour valider notre technique.

D'autre part, des problèmes liés au protocole d'imbibition des échantillons se posent lorsque l'on utilise d'autres traceurs que KI, de taille plus importante. L'utilisation de traceurs plus simple que les traceurs médicaux (contenant moins d'excipients) ou encore la révision du protocole d'imbibition pourraient lever ce problème.

La modélisation mise en place au cours de ce travail de thèse mériterait d'être enrichie avec par exemple l'utilisation de simulations numériques 2D [10] qui permettrait de remonter au coefficient de diffusion à l'intérieur des parois végétales. Cela nous donnerait une information plus précise que le coefficient de diffusion effectif que nous obtenons à présent.

Afin d'enrichir cette étude, nous pourrions également utiliser d'autres détecteurs afin de croiser les résultats. Une étude préliminaire dans ce sens a été menée à l'aide de colonne de chromatographie FPLC et d'un détecteur à indice de réfraction. Cette étude est présentée en Annexe 2.

Cocktail enzymatique commercial : l'importance de s'en affranchir

Au-delà des perspectives évoquées ci-dessus, qui sont en lien avec les développements méthodologiques effectués lors de ce travail, une perspective importante et plus générale de ces travaux réside dans l'utilisation d'enzymes pures ou d'un cocktail contrôlé en menant une étude similaire. Nous avons souligné dans le Chapitre 1 de la Partie 1 l'importance de la

spécificité des enzymes en fonction du substrat. Lors de cette thèse, nous avons utilisé un cocktail commercial, Cellic HTEC2, dont la composition exacte n'est pas connue. Cela nous a permis, comme expliqué précédemment, de développer des outils méthodologiques et d'obtenir des premiers résultats sur l'hydrolyse enzymatique d'un substrat intact. Le choix de l'utilisation de ce cocktail a été pour plusieurs raisons. Dans un premier temps sa disponibilité immédiate ce qui nous a permis de gagner du temps pour les expériences à mener. Dans un second temps c'est ce cocktail qui avait été utilisé lors des études préliminaires menées dans le cadre du stage de Louison Dumond (Projet Splendide). Nous voulions au départ comparer nos données à celles acquises précédemment. Cela n'a pas été possible car les images acquises au cours de ce stage avaient été prises sur plusieurs cycles de dégradation successifs. Au cours de leur analyse, nous nous sommes rendu compte que ces cycles de dégradation introduisaient des déformations mécaniques sur la structure de la paille non liées à l'hydrolyse. Nous avons tout de même conservé le cocktail enzymatique car nous avons déjà entrepris une campagne de mesures avec ce dernier.

Il serait maintenant nécessaire de réitérer cette étude en contrôlant les enzymes utilisées afin de pouvoir conclure sur l'action de chacune d'entre elles, de voir leur différence d'action lorsqu'elles sont utilisées seules ou en cocktail (effet de synergie). Cela nous donnerait également des informations sur l'accessibilité de chacun des substrats spécifiques aux enzymes lorsqu'elles sont utilisées seules.

En guise de mot de la fin, j'aimerais souligné que par son aspect multi-disciplinaire, ce travail de thèse nous a aussi permis de souligner l'importance d'aller chercher des techniques et des méthodes d'analyse dans différents champs scientifiques, afin de s'en inspirer pour développer des méthodes d'analyses innovantes et pour tenter de mieux comprendre le monde qui nous entoure.

Annexe 1 : Rendus volumiques des échantillons digérés à différents temps d'exposition au cocktail enzymatique

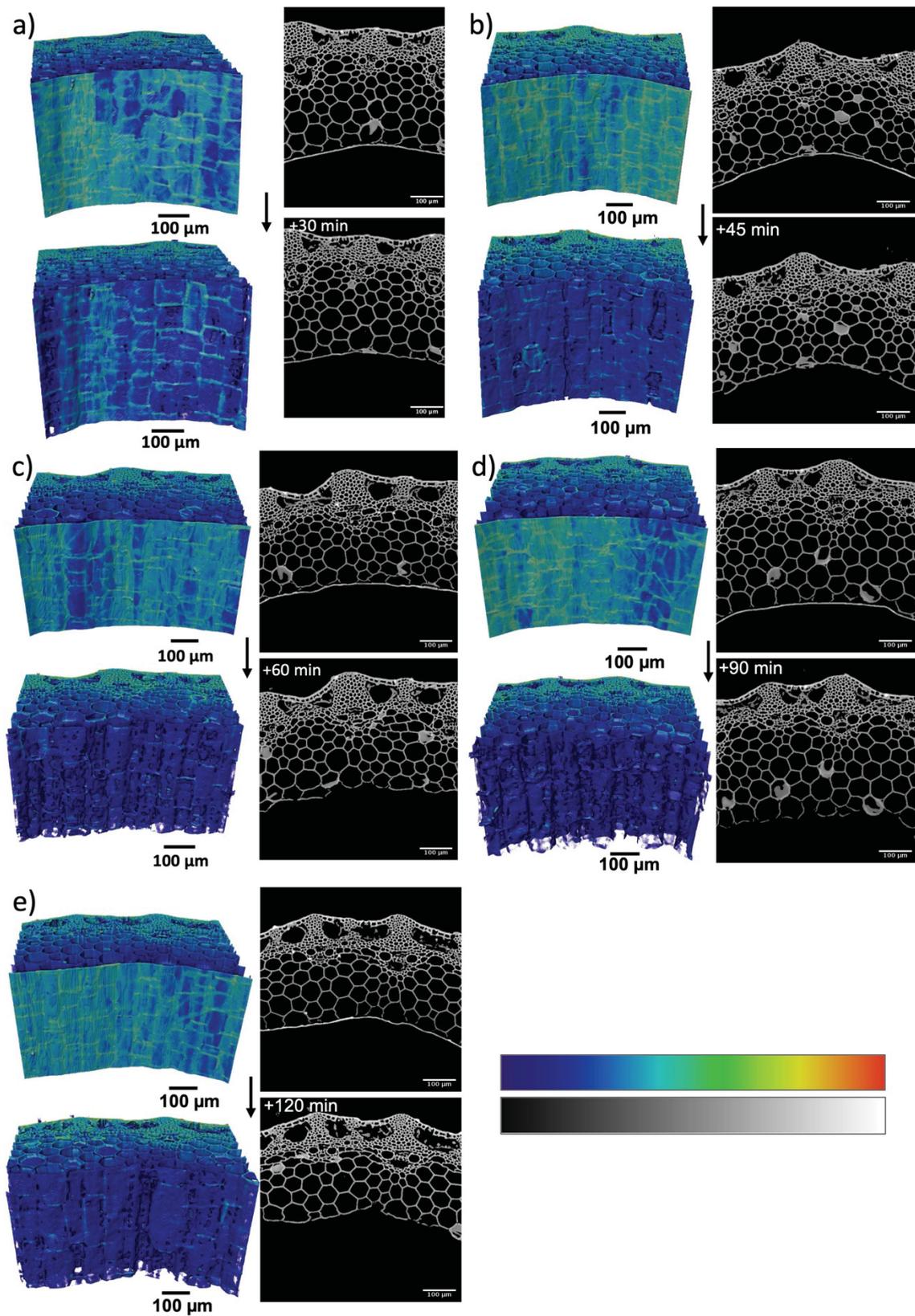


Figure 28 : Coupes tomographiques et rendus volumiques avant et après l'attaque enzymatique. La durée de l'attaque enzymatique varie d'un échantillon à l'autre. La correspondance entre les niveaux de gris des images 2D et la carte des couleurs des volumes 3D est donnée à droite..

Annexe 2 : Pré-étude par FPCL

Pour finir ce Chapitre, nous allons présenter une étude préliminaire réalisée avec un dispositif expérimental différent de celui décrit et utilisé jusqu'ici dans cette partie. Cependant, l'esprit et les finalités de cette seconde expérience étant similaires, il nous semble pertinent de la présenter ici.

Nous avons voulu faire un pas vers les procédés industriels en travaillant avec du broyat de paille de blé. En effet, dans les procédés industriels de valorisation de la paille de blé, les prétraitements physiques, par exemple la réduction de la paille en broyat avant l'hydrolyse de cette dernière, sont très communs [15]. Nous avons voulu conserver une approche de type élution, avec un empilement de broyat de paille de blé en guise de milieux poreux.

Comme présenté dans le Chapitre 1, il existe une bibliographie sur la détermination des propriétés de transport dans les parois végétales [2-7]. Parmi les approches existantes, les méthodes par exclusion de solutés proposent l'utilisation de la chromatographie en phase liquide et plus précisément de la chromatographie FPLC (fast protein liquid chromatography) pour déterminer la taille des pores [2, 16].

La chromatographie en phase liquide est une technique d'analyse basée sur la séparation des substances contenues dans la phase liquide. Pour la chromatographie FPLC, la phase liquide passe à travers une colonne remplie d'une phase solide poreuse. Dans ce cas, la séparation se fait grâce à la différence d'affinité des espèces entre les deux phases. La détection se fait à l'aval de la colonne [17].

Cette méthode étant disponible et maîtrisée au sein de l'équipe Catalyse et Ingénierie Moléculaire Enzymatique de TBI grâce à l'expertise de Gianluca Cioci (ingénieur de recherche INRAE). Nous avons décidé de combiner cette méthode avec l'approche élution en milieux poreux pour essayer de déterminer des propriétés de transport dans le broyat de paille de blé avant et après une digestion enzymatique.

Description du montage expérimental

Pour mettre en place cette expérience nous avons dû répondre à deux questions : quel détecteur et quels traceurs utiliser pour étudier les propriétés de notre milieu ? Comment intégrer le broyat de paille de blé dans un système FPCL ?

Traceurs et détecteur

Pour répondre à la première question, nous avons d'abord choisi les traceurs puis le détecteur approprié. La littérature rapporte de nombreuses utilisations de dextrans en solution [2], et c'est vers ce type de traceurs que nous nous sommes dirigés. Le dextrane est un polysaccharide composé d'environ 200 000 unités de glucose [18]. Il existe une large gamme de dextrans commerciaux avec des masses moléculaires différentes. Cette offre nous permet de faire varier la taille de dextrans entre 3 nm et 30 nm [19].

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé 5 solutions différentes de dextrans avec des masses moléculaires variant entre 20 kDa et 2MDa avec une concentration de 5 mg de dextrane / mL.

Pour détecter les dextrans, on utilise couramment une mesure de l'indice de réfraction. Un détecteur mesure l'indice de réfraction du mélange solvant-traceur, différent de celui du solvant pur, à partir de la déviation angulaire d'un faisceau lumineux en utilisant la loi de Snell-Descartes [20]. Si les dextrans sont fonctionnalisés avec un fluorophore, il est aussi possible d'utiliser un détecteur optique fonctionnant à la longueur d'onde adaptée. Dans notre cas, nous avons utilisé un détecteur d'indice de réfraction (Refractive Index Detector Shodex RI-101 analytical).

Intégration du broyat de paille de blé

Les colonnes utilisées pour la chromatographie FPLC sont souvent remplies d'un gel de polymères qui constitue la phase solide poreuse. Pour nos expériences, nous voulions faire passer la phase liquide dans un empilement de broyat de paille de blé. Nous avons donc décidé d'utiliser une colonne vide et d'y insérer le broyat. Nous avons utilisé une colonne ayant la possibilité d'être thermostatée : la chambre centrale cylindrique, de rayon 0,6 cm, est

entourée d'une chambre plus grande permettant la circulation d'un fluide. La Figure 29 montre une photo de la colonne remplie de broyat de paille de blé.

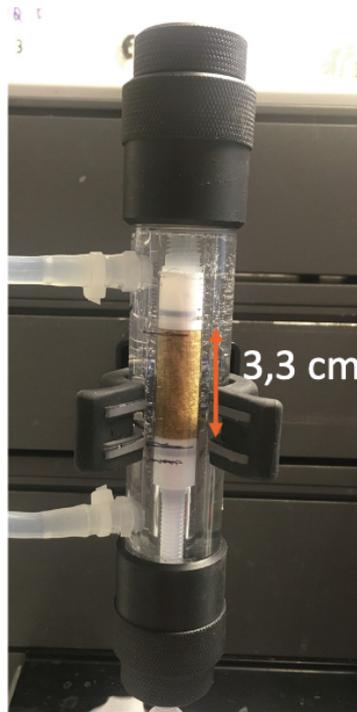


Figure 29 : Photo de la colonne contenant le broyat de paille de blé

Pour remplir la colonne, nous avons utilisé 0,7 g de broyat de paille de blé, la paille de blé provenant de la même origine que celle des autres échantillons utilisés dans cette étude. Une fois lavée, elle a été broyée en morceaux de 0,5 mm environ. Dans la configuration présentée, avec 0,7 g de broyat de paille de blé contenu sur 3,3 cm de hauteur et dans un cylindre de 0,6 cm de rayon, on estime le volume correspond à l'espace libre entre les morceaux de paille à 1,5 mL.

Montage général

Une fois la phase solide poreuse mise en place dans la colonne, nous devons déterminer la phase liquide utilisée. Nous avons choisi d'utiliser la solution tampon décrite dans le Chapitre 2 de la Partie 1. Pour rappel, il s'agit d'une solution tampon citrate avec un pH de 5,4, utilisée lors des digestions enzymatiques. Utiliser cette solution tampon comme phase liquide, nous a permis d'effectuer la digestion enzymatique du broyat *in situ*. Les détails de cette étape seront expliqués ci-après.

La colonne est thermostatée à 45°C avec de l'eau à l'aide d'un bain-marie. Grâce aux fonctionnalités de l'appareil de FPLC utilisé (Äkta Purifier), l'injection et la régulation du débit fluide sont régulées par un système de pompe. La colonne est connectée à cet appareil et le détecteur RI est placé en sortie, pour analyser la phase liquide. La Figure 30 est une photo de ce montage expérimental.

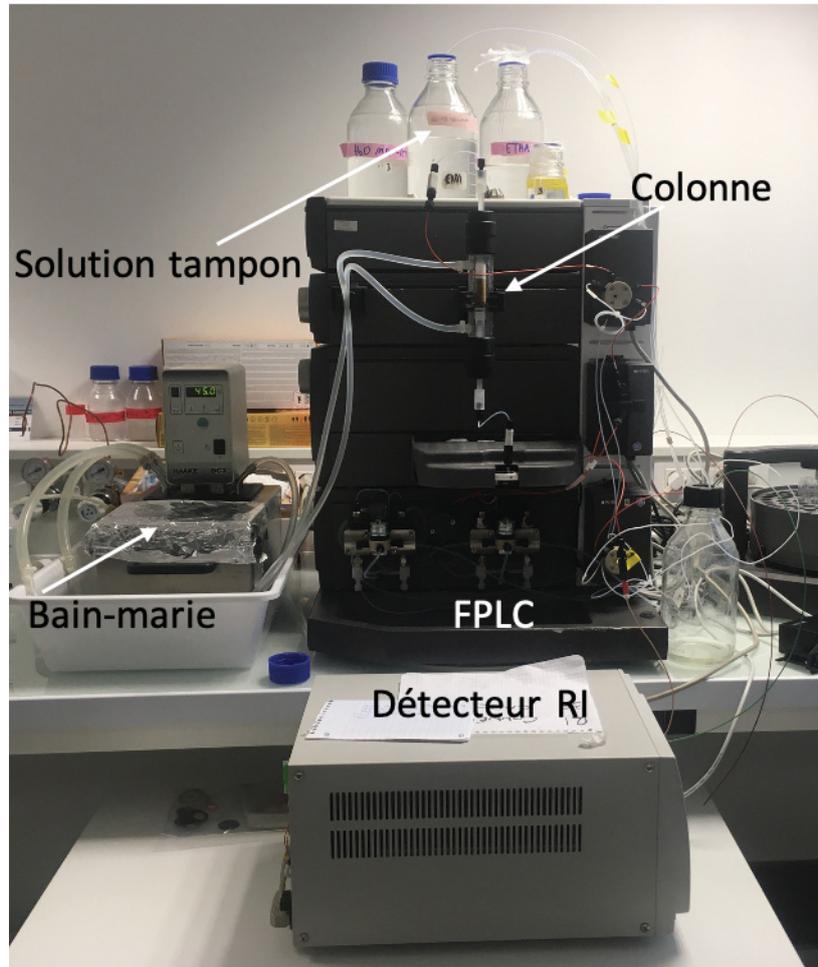


Figure 30 : Photo du montage expérimental pour les expériences d'élution utilisant le FPLC.

Déroulement d'une expérience

Jour 1

Une fois la colonne connectée au FPLC, la solution tampon est injectée à 0,5 mL/min pendant 2h pour équilibrer la colonne, permettre à l'empilement de broyat de stabiliser son organisation et imbiber le broyat. Pendant ce temps, la température dans la colonne se stabilise à 45°C grâce au bain-marie. Une fois que l'ensemble est stable, on injecte 100 µL de

chaque traceur. Les dextrans sont dilués dans de la solution tampon. La détection est lancée à l'instant de l'injection, afin de mesurer le temps (ou le volume) qui s'écoule entre l'injection et la sortie de l'intégralité du volume injecté de traceur. La modification de ce temps nous donnera des informations sur l'accessibilité du milieu au traceur. Cela peut varier en fonction de la taille du traceur, de l'affinité de ce dernier avec la phase solide ou de la porosité du milieu (et donc de son état de dégradation). En utilisant uniquement des traceurs de type dextrane, on a estimé que l'affinité du traceur pour le milieu était identique dans toutes les expériences. Ainsi on se concentre sur les effets d'accessibilité en lien avec la porosité du milieu. Entre chaque injection de traceur, on réinjecte du tampon seul pendant une heure afin de s'assurer que la colonne est bien rincée.

Jour 2

Une fois la colonne rincée, nous allons injecter 3 mL de cocktail enzymatique Cellic HTEC2. Dès que le détecteur détecte du cocktail en sortie, le débit est stoppé car on estime que le volume accessible au fluide dans la colonne est rempli de cocktail enzymatique. On laisse alors incuber le cocktail pendant 24h à 45°C, afin de procéder à la digestion enzymatique de la paille de blé.

Jour 3

Au bout des 24h d'incubation, on utilise une solution tampon TRIS pour rincer et pour arrêter la digestion enzymatique. La solution TRIS pour Tris(Hydroxyméthyl)aminométhane [21] est préparée à une concentration de 50 mM et à pH 9. Cette solution basique a la capacité d'inhiber les enzymes et donc d'arrêter leurs actions de digestion. Une fois la dégradation arrêtée, de la solution tampon citrate est injectée dans la colonne pendant plusieurs heures afin de rincer la colonne et d'éliminer tous résidus de la solution tampon TRIS. Enfin, une fois la colonne rincée, on injecte 100 µL de chaque traceur comme pour le premier jour afin de voir si des modifications sont observées.

Maintenant que l'expérience et le protocole ont été présentés nous allons pouvoir passer à la discussion des résultats préliminaires.

Résultats préliminaires

Toutes nos expériences ont été faites en duplicat. La Figure 31 montre des duplicats pour deux expériences où le broyat de paille de blé est non digéré. Ces expériences ont été faites avec deux dextrans de masses moléculaires différentes, respectivement 2 MDa (a) et 20 kDa (b).

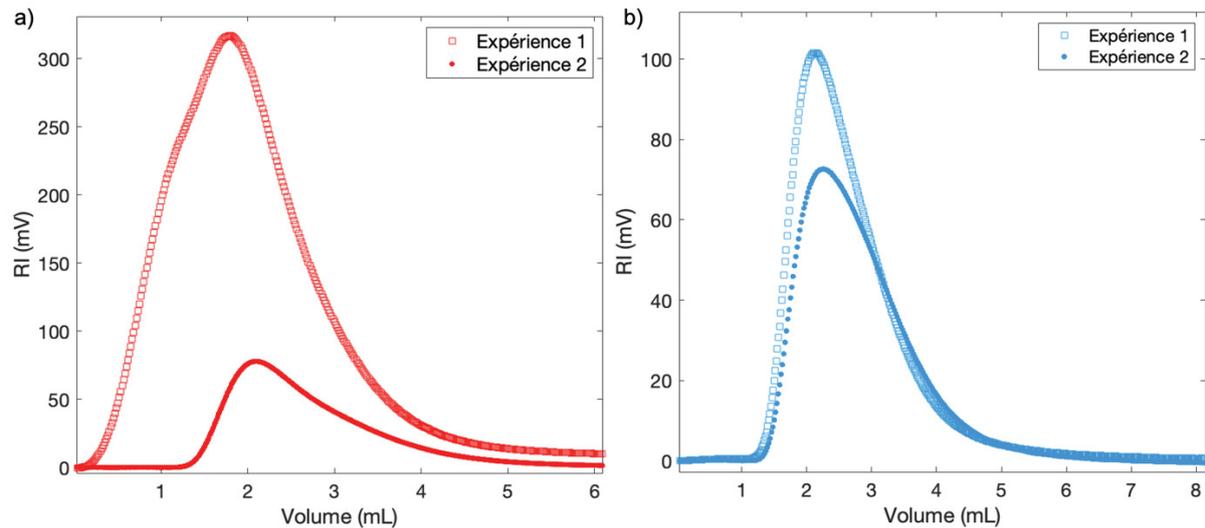


Figure 31 : Courbes d'élution à travers une colonne remplie de broyat de paille de blé non digéré avec du dextrane avec une masse moléculaire a) de 2 MDa et b) de 20 kDa. Chaque courbe présente deux expériences identiques.

On remarque sur cette figure que, malgré des conditions expérimentales identiques, les courbes d'élution pour chacun des duplicats ne se ressemblent pas, même si le volume d'élution (volume au maximum du pic observé) est proche entre les duplicats : 1,78 mL et 2,09 mL pour les dextrans de 2MDa et 2,17 mL et 2,25 mL pour ceux de 20 kDa. L'aire sous la courbe, qui est proportionnelle au volume total de traceurs élués au cours de l'expérience, est différente pour des expériences a priori identiques. Pour les dextrans de 2 MDa, la différence très marquée (aires de valeurs 34,8 et 1,8), alors que pour les dextrans de 20 kDa la différence est plus faible (aire de valeurs 1,8 et 2,5).

Par manque de temps, nous n'avons pas pu multiplier ce type d'expériences pour éclaircir l'origine de ces différences.

Cette étude préliminaire nous a cependant permis de mettre au point un dispositif expérimental et un protocole d'utilisation qui nous l'espérons permettra l'étude de la dégradation d'un broyat de paille de blé et de la variation de ses propriétés de transport (vis-à-vis de traceurs dont la taille est librement choisie). Pour poursuivre cette étude, nous pourrions d'une part reproduire ces expériences pour comprendre les différences observées. D'autre part, nous devons comparer les résultats avant et après digestion, une fois la routine d'analyse des données mise en place. Cette étude menée par FPLC ouvre la voie à un travail plus conséquent pour développer cette méthode d'analyse de l'hydrolyse enzymatique d'un broyat de paille de blé.

Références de la partie 2

1. Zinn, B. *et al.* Experimental visualization of solute transport and mass transfer processes in two-dimensional conductivity fields with connected regions of high conductivity. *Environ Sci Technol* **38**, 3916–3926 (2004).
2. Read, S.M., & Bacic, A. (1996). Cell Wall Porosity and Its Determination.
3. Hubbard, J. D., Lui, A. & Landry, M. P. Multiscale and multidisciplinary approach to understanding nanoparticle transport in plants. *Current Opinion in Chemical Engineering* **30**, 135–143 (2020).
4. Jeremic, D., Quijano-Solis, C. & Cooper, P. Diffusion rate of polyethylene glycol into cell walls of red pine following vacuum impregnation. *Cellulose* **16**, 339–348 (2009).
5. Richter, E. & Ehwald, R. Apoplastic mobility of sucrose in storage parenchyma of sugar beet. *Physiologia Plantarum* **58**, 263–268 (1983).
6. Kramer, E. M., Frazer, N. L. & Baskin, T. I. Measurement of diffusion within the cell wall in living roots of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3005–3015 (2007).
7. Jakes, J. E. *et al.* Measurement of moisture-dependent ion diffusion constants in wood cell wall layers using time-lapse micro X-ray fluorescence microscopy. *Sci Rep* **10**, 9919 (2020).
8. Lusic, H. & Grinstaff, M. W. X-ray-computed tomography contrast agents. *Chem Rev* **113**, 1641–1666 (2013).
9. Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv* **2011**, 591325 (2011).
10. Moreno, A. Mécano-biologie des tissus hétérogènes par changement d'échelles : application à l'ostéosarcome. (Toulouse, INPT, 2022). Thèse sous la direction de Pascal Swider et Pauline Assemat.
11. H. S. Carslaw and J. C. Jaeger, *Conduction of Heat in Solids*, second edition, Oxford University Press, Oxford, UK, 1959, p. 101
12. Robinson, R. A. & Stokes, R. H. *Electrolyte Solutions: Second Revised Edition*. (Courier Corporation, 2002).

13. Miller, C. C. (1924). The Stokes-Einstein law for diffusion in solution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 106(740), 724-749.
14. He, W., Ai, K. & Lu, L. Nanoparticulate X-ray CT contrast agents. *Sci. China Chem.* **58**, 753–760 (2015).
15. Talebnia, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* **101**, 4744–4753 (2010).
16. Ishizawa, C. I., Davis, M. F., Schell, D. F. & Johnson, D. K. Porosity and Its Effect on the Digestibility of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2575–2581 (2007)
17. Madadlou, A., O’Sullivan, S. & Sheehan, D. Fast Protein Liquid Chromatography. in *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (eds. Walls, D. & Loughran, S. T.) 439–447 (Humana Press, 2011). doi:10.1007/978-1-60761-913-0_25.
18. PubChem. Dextran. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4125253>.
19. Aimar, P., Meireles, M. & Sanchez, V. A contribution to the translation of retention curves into pore size distributions for sieving membranes. *Journal of Membrane Science* **54**, 321–338 (1990).
20. Sudarsan, V. 8 - Optical Materials: Fundamentals and Applications. in *Functional Materials* (eds. Banerjee, S. & Tyagi, A. K.) 285–322 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-385142-0.00008-8.
21. PubChem. Tromethamine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6503>.
22. Zeng, Y. *et al.* In situ label-free imaging of hemicellulose in plant cell walls using stimulated Raman scattering microscopy. *Biotechnol Biofuels* **9**, 256 (2016).
23. Devaux, M.-F. *et al.* Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence and Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**, (2018).
24. Zoghلامي, A. & Paës, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Front Chem* **7**, 874 (2019).

-
25. Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B. & Recous, S. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant Soil* **281**, 291–307 (2006).
 26. Liu, C.-F. & Sun, R.-C. Chapter 5 - Cellulose. in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (ed. Sun, R.-C.) 131–167 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-444-53234-3.00005-5