

# Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

---

On a pu observer dans le chapitre précédent que le suivi des paramètres physicochimiques est essentiel si l'on souhaite prédire de manière plus juste les rendements en glucose au cours du temps, ceux-ci évoluant au cours du temps. L'objectif de cette étude est de regarder l'évolution de certains de ces paramètres au cours de l'hydrolyse enzymatique pour décrypter les différents phénomènes impliqués lors de cette saccharification. Cette approche complémentaire peut servir à identifier les mécanismes les plus importants dans la dégradation de la matrice lignocellulosique et obtenir de nouveaux éléments de réflexion quant aux descripteurs en eux-mêmes.

Deux approches ont été mises en place de manière cohérente afin d'apporter des réponses complémentaires pour une même série de substrats prétraités. La première consiste en l'analyse de substrats prélevés à différents temps d'hydrolyse enzymatique (deux échantillons ont été utilisés), et la deuxième passe par l'analyse dynamique en microscopie, de substrats pendant la dégradation. Pour ce faire, on a sélectionné des échantillons communs sinon directement comparables. Pour l'étude *ex situ*, les échantillons A020V00 et C020V00 ont été choisis (granulométrie avant prétraitement de 20 mm), alors que pour l'approche *in situ*, ce sont les échantillons A020C, C020C et D020C qui ont été retenus. A020C, C020C ne diffèrent des échantillons retenus pour l'analyse *ex situ* que par leur granulométrie avant prétraitement qui est de 2 mm, et de l'unité de prétraitement. Les compositions chimiques des échantillons concernés sont également similaires deux à deux.

## 1. Les prélèvements au cours de l'hydrolyse

---

### a. Les échantillons de l'étude

Deux échantillons produits à Gembloux par prétraitement à l'acide dilué de la paille broyée 20 mm ont été sélectionnés pour réaliser cette étude consistant en le suivi des paramètres physico-chimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique (prélèvement). Il s'agit des échantillons A020V00 et C020V00 produits à des températures de 100 °C et 140 °C, et un temps de résidence de 20 min.

Du fait des quantités disponibles assez limitées, les compositions de chacun des prélèvements n'ont pas été déterminées par analyse chimique mais par analyses spectroscopiques IR (voir les chapitres concernés).

La composition des échantillons de l'étude avant hydrolyse est indiquée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Composition chimique des échantillons de l'étude, avant hydrolyse

Echantillon	Cellulose (% ms)	Hémicelluloses (% ms)	Fraction non polysaccharidique (% ms)
A020V00	43,2	28,3	28,5
C020V00	59,1	6,8	34,1

Pour cette étude, nous souhaitons suivre l'échantillon à 3 h (T1), 6 h (T2), 24 h (T3) et 48 h (T4) d'hydrolyse (Tableau 23). Comme nous souhaitons pouvoir disposer de l'échantillon total à chaque prélèvement, une hydrolyse a été réalisée pour chaque prélèvement en duplicata pour s'assurer de la fiabilité de la conduite de l'hydrolyse.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tous ces prélèvements ont été étuvés à 80 °C pour dénaturer les enzymes et stopper définitivement la dégradation enzymatique, puis lavés (extracteur Soxhlet), filtrés (filtre de maillage 11 µm), et enfin lyophilisés pour pouvoir être caractérisés.

A chacun de ces temps, un prélèvement du mélange réactionnel a également été réalisé (pour les prélèvements en cours de dégradation), afin de s'assurer de la conformité du déroulement de la saccharification (reproductibilité, et résultats proches des cinétiques classiques de saccharification de ces échantillons, issus de l'étude sur les substrats traités par explosion à la vapeur). De ce fait, la **dose d'enzymes a été également doublée** pour cette étude, par cohérence avec l'étude précédente.

Tableau 23 : Nomenclature des échantillons et leurs prélèvements, pour le suivi de substrats lignocellulosiques au cours de l'hydrolyse

Echantillon	Sévérité de prétraitement	Temps d'hydrolyse (h)
A020V00T0	1,4	0
A020V00T1		3
A020V00T2		6
A020V00T3		24
A020V00T4		48
C020V00T0	2,5	0
C020V00T1		3
C020V00T2		6
C020V00T3		24
C020V00T4		48

### b. Les paramètres suivis

Plusieurs caractéristiques ont été étudiées au cours de l'hydrolyse, par l'analyse des différents prélèvements : le suivi de l'avancement de la conversion par prélèvement du milieu réactionnel et mesure de la concentration en glucose, la granulométrie par diffraction laser, la morphologie (en MEB), l'état de porosité (en physisorption de diazote), la cristallinité de la cellulose restante (en <sup>13</sup>C-RMN en CP-MAS), afin de les mettre en relation les unes par rapport aux autres et d'identifier des événements clés survenant lors de la dégradation enzymatique de ces substrats lignocellulosiques. La discussion des résultats de cette partie fait l'objet d'un paragraphe dédié, après la présentation des différents résultats.

### c. La cinétique de dégradation

La Figure 122 montre la cinétique de saccharification des échantillons A020V00 et C020V00, pour chacun des échantillons dont l'hydrolyse a été stoppée à différents temps (3, 6, 24 et 48 h). Les rendements en glucose à 48 h d'hydrolyse enzymatique sont de 36 % pour l'échantillon A020V00, et de 44 % pour l'échantillon C020V00.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

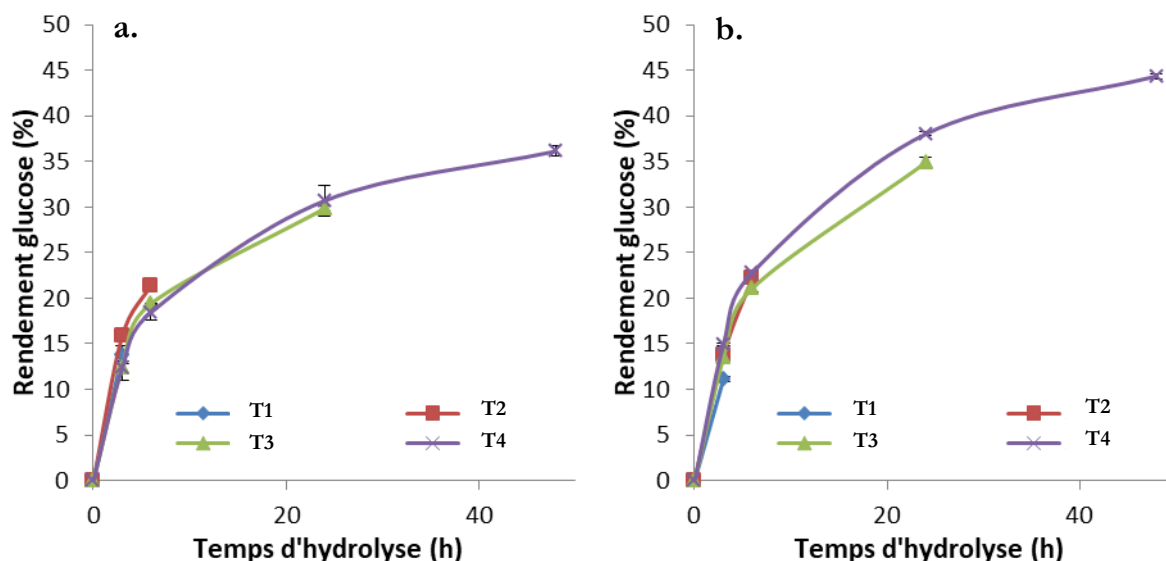


Figure 122 : Evolution du rendement en glucose en fonction du temps d'hydrolyse des échantillons A020V00 (a) et C020V00 (b), pour les différents prélèvements (3, 6, 24, et 48 h)

Les temps de prélèvement ont été choisis afin d'avoir une vue correcte de la cinétique tout en limitant le nombre de prélèvements qui demandent autant d'hydrolyses enzymatiques des deux substrats (dont la quantité disponible reste limitée) que de caractérisations en aval.

### d. Le suivi de la taille des particules

Les résultats ci-dessous montrent l'évolution de la distribution en taille de particules mesurées par granulométrie laser au cours de la dégradation en hydrolyse enzymatique pour l'échantillon C020V00 (prétraitement à 140 °C pendant 20 min). Pour information, les particules les plus grosses (>2 mm) ne peuvent pas être caractérisées proprement par cet outil. Pour autant, ces particules peuvent représenter une fraction non négligeable de l'échantillon, en particulier pour l'échantillon A020V00 (voir la partie Figure 123). C'est pour cette raison que l'échantillon A020V00 qui possède une granulométrie globale trop grande, n'a pas été analysé en granulométrie laser, car il aurait fallu réaliser un tamisage à 2 mm pour retirer la fraction grossière, créant de fait un biais de représentativité de l'échantillon.

L'échantillon à T0 est constitué de trois populations de particules de diamètres équivalents autour de 700  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  avec une abondance plus importante de la population présentant un diamètre moyen de 700  $\mu\text{m}$  (Figure 123). Au cours de l'hydrolyse, l'abondance relative des 3 populations évolue mais les trois populations sont conservées jusqu'à la fin de l'hydrolyse. Plus précisément, la population des particules grossières (>250  $\mu\text{m}$ ) tend à diminuer au profit des populations des particules plus fines (<250  $\mu\text{m}$ ).

Ensuite, on constate que le diamètre de chaque population n'évolue pas de manière conséquente (auquel cas, on observerait un décalage progressif des populations), ce qui témoigne du fait que la taille des particules évolue peu. En revanche, on observe clairement une évolution des proportions relatives des différentes populations.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

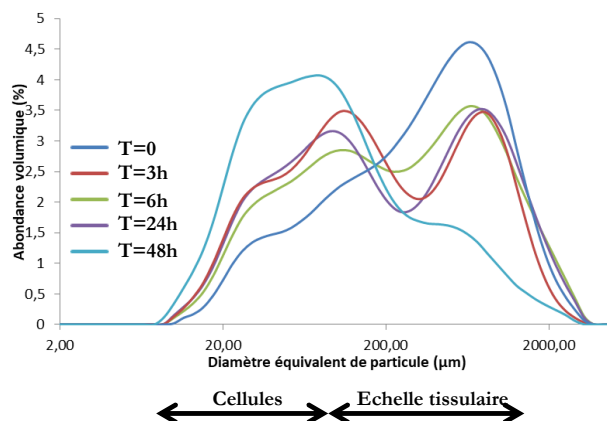


Figure 123 : Distributions granulométriques des différents prélèvements au cours de l'hydrolyse (0, 3, 6, 24 et 48 h) de l'échantillon C020V00

Pour exploiter les variations observées à l'œil sur ces distributions granulométriques, deux approches sont menées. La première consiste à suivre le diamètre à abondance volumique médiane,  $d(0,5)$ , c'est-à-dire le diamètre pour lequel la moitié des objets mesurés ont un diamètre inférieur à ce diamètre (et donc pour lequel l'autre moitié possède un diamètre mesuré supérieur). L'autre approche consiste à suivre l'abondance volumique de la contribution des particules les plus fines et des plus grandes, en se basant sur l'abondance volumique relative, à trois diamètres fixés  $35 \mu\text{m}$  ( $I_{35}$ ),  $100 \mu\text{m}$  ( $I_{100}$ ) et  $630 \mu\text{m}$  ( $I_{630}$ ), diamètres pour lesquels la population ciblée semble maximale. Cette méthode est critiquable sur le fait que la distribution est tributaire de la modification de forme des contributions (élargissement des contributions notamment, ce que l'on peut imaginer dans un système où l'entropie augmente comme c'est le cas ici) et qui impacte alors les intensités relatives considérées. Malgré cela, cette donnée reste intéressante car plus riche d'information que la simple considération du diamètre médian. La Figure 124 indique que les particules présentes sont de plus en plus petites, avec un effet plus marqué entre 0 et 3 h d'hydrolyse.

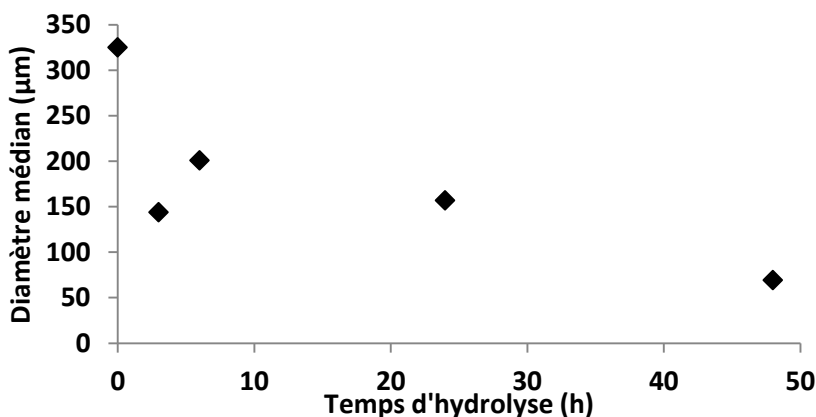


Figure 124 : Evolution du diamètre médian en fonction de la durée de l'hydrolyse enzymatique

La Figure 125 trace l'évolution des valeurs de  $I_{35}$ ,  $I_{100}$  et  $I_{630}$  en fonction du temps de l'hydrolyse. On remarque ainsi que la fraction grossière diminue au profit de la fraction fine (et intermédiaire), d'abord en début d'hydrolyse (3 h), puis en toute fin d'hydrolyse (48 h). Ceci témoigne bien de la fragmentation qui se déroule à cette échelle, et non pas d'une réduction en taille de chacune des populations. La fraction intermédiaire se comporte globalement comme la fraction fine et est également plus présente au fur et à mesure de la réaction. Il est intéressant de noter que la population de particules ayant un diamètre avoisinant  $35 \mu\text{m}$  ne fait pas l'objet d'une fragmentation ultérieure, ce qui suppose que ces particules (dont l'échelle correspond à celle du diamètre des petites cellules lignifiées type sclérenchyme) sont très stables. Par ailleurs, on constate la présence d'un plateau entre 3 et 24 h d'hydrolyse, signe que la matrice est plutôt stable à ce stade de la dégradation.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

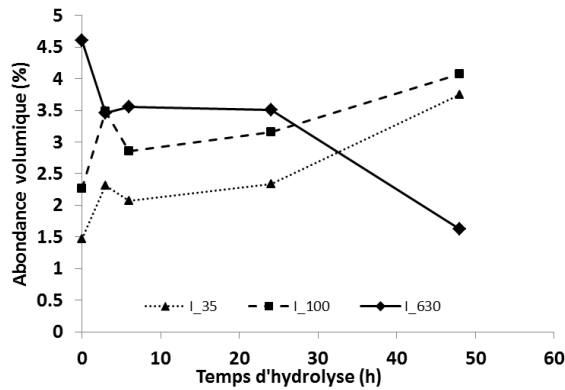


Figure 125 : Evolution des intensités des distributions, mesurées aux maximums locaux (ou aux épaulements, le cas échéant) des contributions à 630, 100, et 35  $\mu\text{m}$

## e. La morphologie à différentes échelle par MEB

### i Paille faiblement prétraitée (A020V00)

Les observations de l'échantillon de paille ayant subi le traitement de paille le plus doux (100 °C pendant 20 min) ne montrent pas de différences significatives à faible grandissement au cours du temps en première partie d'hydrolyse (de 0 à 24 h d'hydrolyse). En revanche on remarque tout de même un état de fragmentation plus avancé entre l'échantillon non hydrolysé et le prélèvement hydrolysé pendant 48 h. En effet, une partie des brins de paille sont décomposés en fibres comme on le voit sur le cliché de la Figure 126a, bien que de gros brins restent encore présents sur d'autres clichés non présentés ici. Les tissus sont donc désassemblés en fibres plus ou moins individuelles vu les diamètres de ces fibres. Des faisceaux vasculaires sont aussi probablement présents. La présence de ces fibres relâchées du reste des brins de paille montre qu'elles sont non digérées. On note aussi que les cellules ne sont pas particulièrement fragmentées transversalement, d'où l'aspect particulièrement filiforme des fibres après hydrolyse. Enfin, comme on peut le voir sur l'épiderme hydrolysé en bas à droite (tissu perforé de manière régulière), les stomates sont des zones de fragilité en hydrolyse et susceptibles d'être dégradés, contrairement au reste de l'épiderme qui semble rester intact, d'où la présence de ces trous régulièrement répartis. Ces observations ont été retrouvées sur d'autres clichés (non présentés).

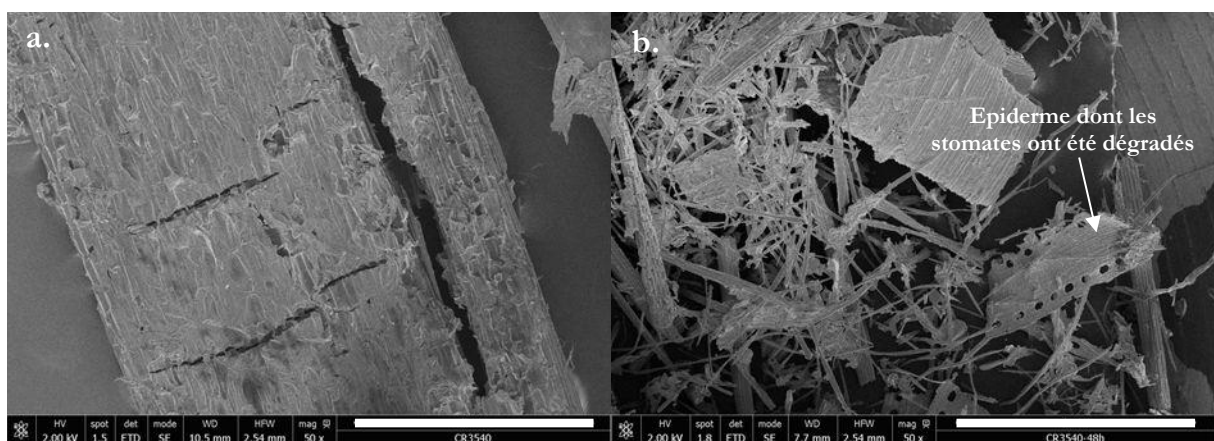


Figure 126 : Observation à l'échelle macroscopique de l'échantillon A020V00 avant hydrolyse (a) et après 48 h d'hydrolyse enzymatique (b). Barre d'échelle de 1 mm

A une échelle plus résolue, il semble que les ponctuations visibles soient plus nombreuses à 48 h d'hydrolyse (Figure 127, flèches rouges), ce qui est plutôt logique si on considère que leur ouverture est en réalité à l'état natif, comblée par de la paroi primaire plutôt cellulosique (et donc assez digeste) des deux cellules adjacentes, appelée dans ce cas précis, torus.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

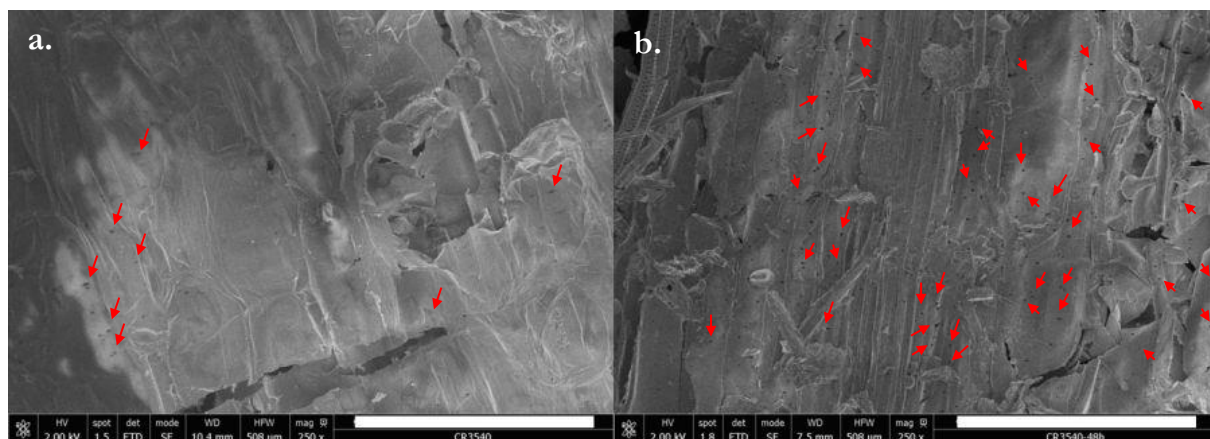
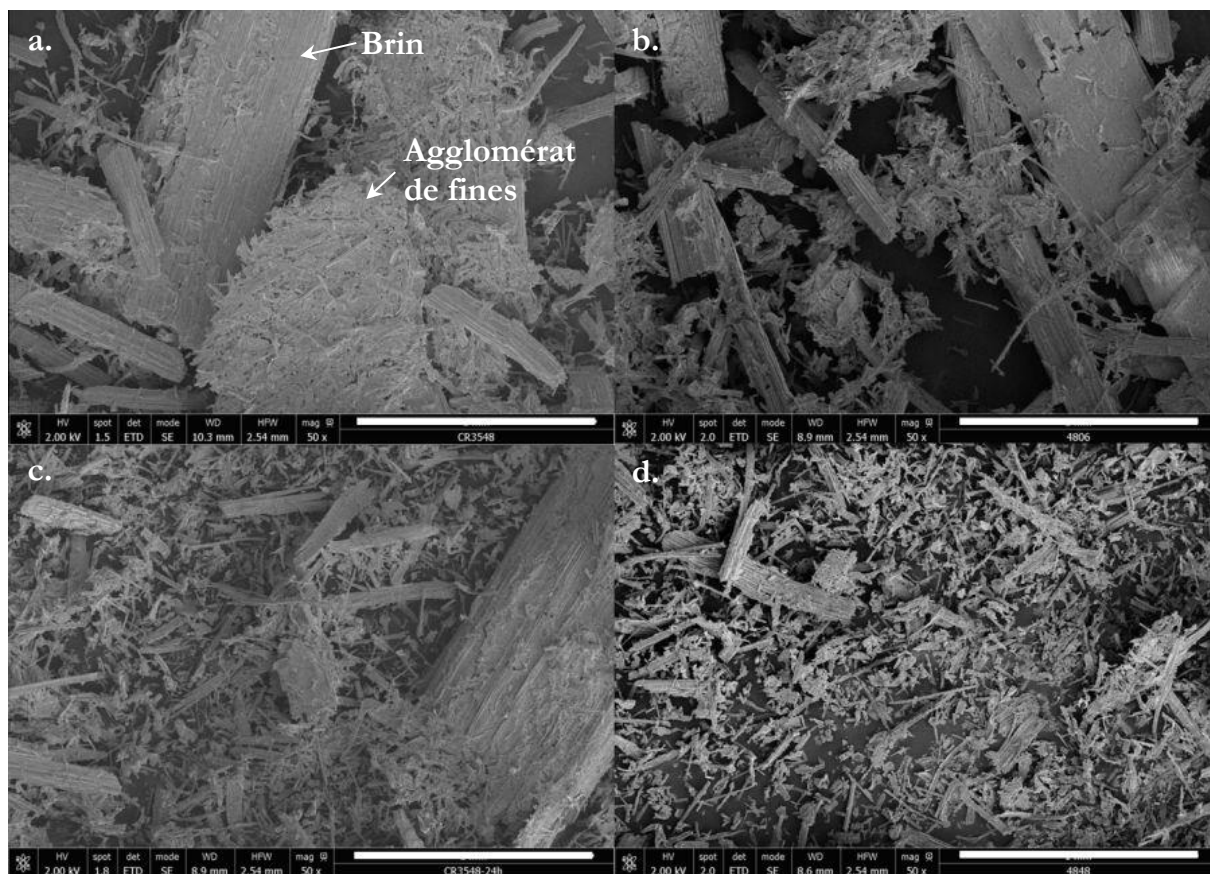


Figure 127 : Cliché microscopique de l'échantillon A020V00, montrant les tissus ponctués (parenchymes principalement) avant hydrolyse enzymatique (a.), 48 h d'hydrolyse (b.). Les flèches rouges indiquent à titre d'exemple quelques ponctuations apparentes. Barres d'échelle : 200  $\mu\text{m}$  (a et b)

Une étude parallèle (présentée en Annexe 3.1) portant sur l'observation au MEB de la dégradation enzymatique de l'échantillon A020C (équivalent de l'échantillon A020V00) en zones repérées confirme cette hypothèse par la mise en évidence de la mise à nu de ponctuations, initialement masquées par du matériel lignocellulosique.

### ii Paille prétraitée à sévérité intermédiaire (C020V00)

Concernant l'échantillon C020V00 traité à conditions opératoires plus sévères (140 °C pendant 20 min), l'échantillon présente initialement des fragments de paille peu altérés, et des cellules filiformes enchevêtrées n'appartenant plus à un tissu cohérent, sous la forme d'un agglomérat de particules fines (inférieures à la centaine de micron, voir Figure 128). Au cours de l'hydrolyse, un effet de fragmentation des grosses particules et un désassemblage des agglomérats de particules fines sont observés, mais leur manifestation est principalement observée en fin d'hydrolyse (48 h). Les gros fragments de paille semblent moins présents, ce qui est logique si l'on suppose qu'ils ont été en partie désintégrés en particules fines. Toutefois, certains gros fragments peuvent subsister à l'hydrolyse (non montrés ici). Les particules hydrolysées conservent un caractère fibrillaire, ce qui précise que la fragmentation opérée durant l'hydrolyse se fait principalement entre les fibres et, de manière moins prononcée, de manière transverse à la fibre. Par ailleurs, une très forte hétérogénéité des particules demeure, tant en termes de dimensions, que d'allongements ou même de formes.



*Figure 128 : Cliché MEB à l'échelle macroscopique de l'échantillon C020V00 à 0 h (a), 6 h (b), 24 h (c) et 48 h (d) d'hydrolyse enzymatique. Barre d'échelle : 1 mm*

A une échelle un peu plus fine, on constate que les ponctuations visibles sont bien plus nombreuses après hydrolyse (Figure 129a et b), de manière analogue à l'échantillon A020V00. Par ailleurs, sur l'échantillon hydrolysé pendant 48 h, on distingue régulièrement des plis sur certains tissus lisses non hydrolysés. On montre en Figure 129 un exemple de telles commissures (image d, quelques exemples montrés en pointillés verts), qui témoignent d'une fragilité mécanique accrue de certains tissus (parenchyme lignifié semble-t-il ici, vu la taille de la cellule, l'observation de ponctuations, et l'absence de stomate) occasionnée par l'hydrolyse partielle dudit tissu. Ces observations ont été retrouvées sur d'autres clichés (non présentés).

Enfin, au grandissement le plus élevé utilisé ici, on constate qu'entre le temps initial et le temps maximal d'hydrolyse, les surfaces rugueuses sont plus abondantes (Figure 129b et e), et présentent une rugosité de surface distincte de celle observée au temps initial (Figure 129b, c, e et f), dont l'échelle du grammage (la dimension des grains formant la rugosité) dépend des zones observées, variant de l'ordre du micron (Figure 129e, microrugosité) à la cinquantaine de nanomètres (Figure 129f, nanorugosité).

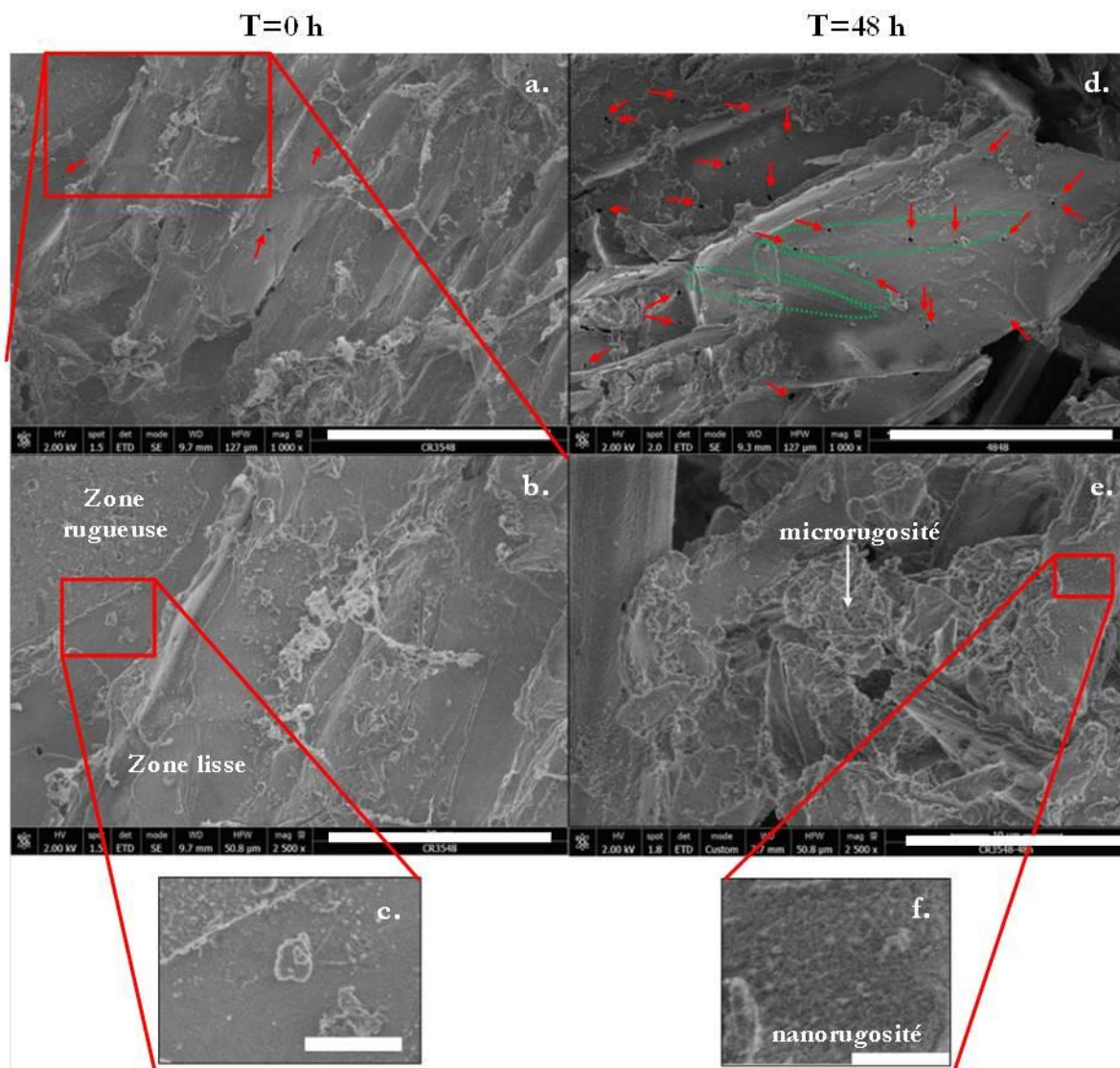


Figure 129 : Clichés MEB de l'échantillon C020V00 montrant l'état de surface avant hydrolyse (a, b et c) et à 48 h d'hydrolyse enzymatique (d, e, et f). Les flèches rouges indiquent les ponctuations visibles, et les pointillés verts des plissures observées en fin d'hydrolyse enzymatique. Les deux dernières images illustrent les différences d'état de surface observées entre l'échantillon intact et l'échantillon hydrolysé. Barres d'échelle : 50  $\mu\text{m}$  (a et d), 20  $\mu\text{m}$  (b, et e), et 2,5  $\mu\text{m}$  (c et f)

On peut terminer sur le fait que grâce à une étude connexe évoquée préalablement et présentée en Annexe 3, l'hydrolyse enzymatique permet dans les premiers temps de la saccharification, de réaliser un lissage des surfaces présentant des aspérités et donc autant de sites accessibles (avant de laisser place à la création de la rugosité citée avant, lorsque la cellulose laisse place à la matrice ligneuse rémanente). Cet effet a notamment été mis en évidence sur l'échantillon C020C (équivalent de l'échantillon C020V00 considéré ici).

Compte tenu du grandissement utilisé et de la faible quantité d'échantillon analysée, il est plus difficile de s'assurer du caractère significatif des observations faites à partir de ces observations microscopiques. C'est aussi pour cela que la démarche multi-échelle est pertinente, pour confronter ces observations avec des analyses complémentaires.



## f. Le suivi de la composition chimique

### *i La concentration en cellulose, hémicelluloses, et lignine*

Pour quantifier l'évolution de la composition chimique du substrat au cours de l'hydrolyse enzymatique, on s'appuie sur le rendement en glucose, mais également sur les analyses infrarouges effectuées pour les différents prélèvements.

L'évolution de la concentration en cellulose du substrat est donc calculée à partir du rendement en glucose déterminé plus haut et de la teneur initiale en cellulose du substrat, selon l'équation :

$$C_{cell}(t) = C_{cell}(0) \cdot (1 - R_{gluc}(t)) \quad \text{Équation (12)}$$

où  $C_{cell}(t)$  est la concentration en cellulose du substrat au temps  $t$ ,  $C_{cell}(0)$  la concentration en cellulose du substrat au temps initial, et  $R_{gluc}(t)$  le rendement en glucose au temps  $t$ . On néglige ici la conversion possible des hémicelluloses en oligosaccharides et monomères de sucres.

La Figure 130 représente l'évolution de la concentration en cellulose du substrat au cours du temps. Cette évolution suit évidemment le profil du rendement en glucose. Cela permet aussi d'illustrer que les teneurs en cellulose des deux échantillons sont de plus en plus proches.

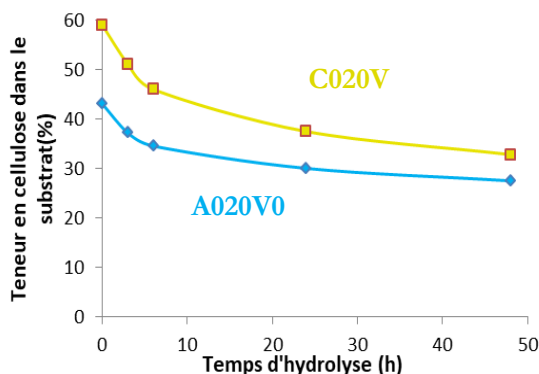


Figure 130 : Evolution de la teneur en cellulose en fonction du temps

Le suivi de la teneur en hémicelluloses, en cellulose et en lignine n'a en revanche pas pu être réalisé à partir des spectres IR et du modèle PLS décrit et utilisé précédemment. Le modèle PLS sous-estime en effet l'avancement de l'hydrolyse enzymatique, au point de prédire une concentration en cellulose quasi constante au cours du temps (Figure 131).

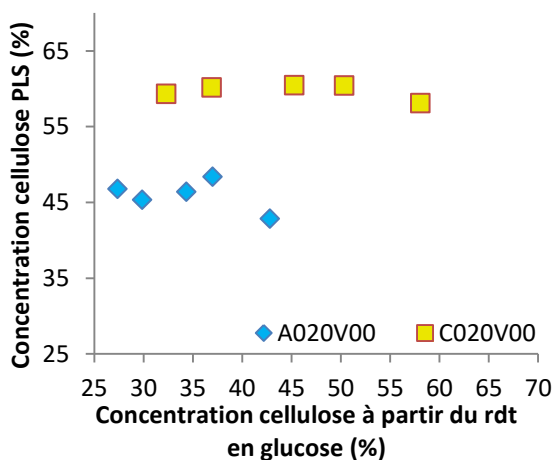


Figure 131 : Graphe de parité montrant l'évolution la teneur en cellulose prédites par PLS en fonction de la teneur en cellulose calculée à partir du rendement en glucose (mesuré par la méthode servant de référence, ici au glucostat)

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### ii L'évolution de la cristallinité de la cellulose

L'indice de cristallinité de la cellulose a été évalué sur les échantillons A020V00 et C020V00, aux temps d'hydrolyse 0 h, 6 h, et 48 h par la mesure de l'indice de cristallinité de la cellulose en RMN du carbone 13. Les valeurs de cristallinité (Figure 132) montrent une stabilité du taux de cristallinité au cours de l'hydrolyse.

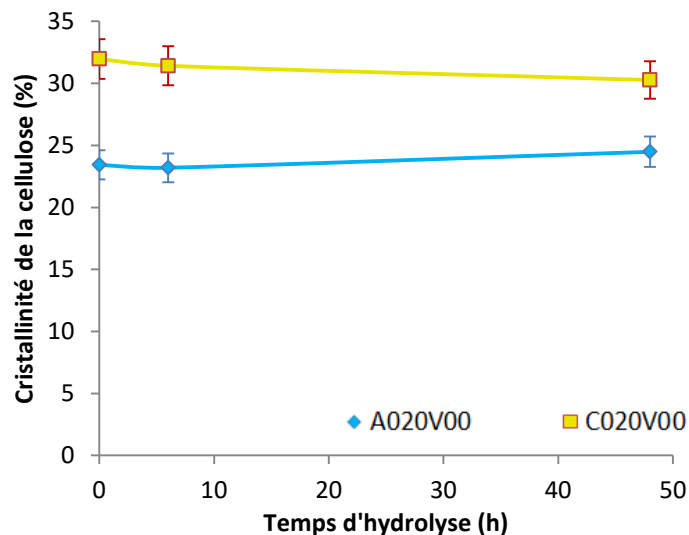


Figure 132 : Evolution au cours de l'hydrolyse enzymatique de l'indice de cristallinité de la cellulose, mesuré par CPMAS  $^{13}\text{C}$ -RMN

## g. Le suivi de l'état de porosité par physisorption d'azote

Le suivi de l'état de porosité s'est fait par la détermination de la surface BET, du volume poreux, et de la distribution en taille de pores (modèle BJH en désorption) lorsque l'isotherme d'adsorption-désorption était suffisamment exploitable. Dans cette étude, de même que lors des autres études, l'évolution du volume poreux évolue de manière parfaitement linéaire avec la surface BET. Ainsi les observations discutées sur l'évolution de la surface BET pourront être transposées de manière équivalente en termes de volume poreux. Les surfaces BET sont tracées sur la Figure 133 en fonction du temps d'hydrolyse.

Pour ce qui est de l'échantillon A020V00, les surfaces développées sont si faibles que la significativité de la valeur mesurée pose question (généralement on estime que la limite d'estimation de la surface BET se situe vers  $1\text{m}^2/\text{g}$ , représentée en Figure 133). En première approche on peut dire que la surface accessible, très faible, est constante au cours de l'hydrolyse. En supposant significatives les variations mesurées sur de si faibles surfaces (on notera par exemple que Chai *et al.*, [268] utilisent des valeurs de surface jusqu'à  $0,6\text{m}^2/\text{g}$  pour des substrats non traités, et analysés par un équipement similaire), on s'aperçoit que la surface passe par un minimum à 6 h d'hydrolyse, puis remonte à sa valeur initiale à 48h d'hydrolyse enzymatique.

Concernant l'échantillon C020V00 (traité à  $140\text{ }^\circ\text{C}$ ), la surface BET augmente globalement tout au long de l'hydrolyse enzymatique, marquée par une légère pause entre 3 et 24 h d'hydrolyse.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

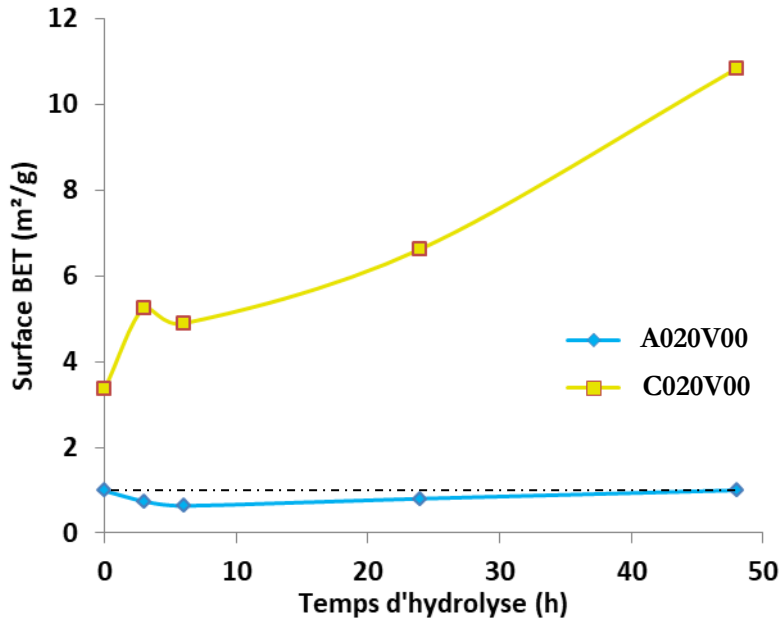


Figure 133 : Evolution de la surface BET au cours de l'hydrolyse enzymatique. Le segment en pointillés montre à titre indicatif la valeur minimale ( $1 \text{ m}^2/\text{g}$ ) en deçà de laquelle, la valeur est considérée incertaine

On s'intéresse maintenant à l'évolution des distributions en taille de pores, par l'intermédiaire des diamètres médian et moyen, ainsi que du diamètre au  $\max_{d \in [2; 250 \text{ nm}]} \left( \frac{dV}{dP} \right)$  de la distribution poreuse (modèle BJH en désorption). La porosité de l'échantillon A020V00 étant trop faible pour pouvoir obtenir un isotherme de désorption probante, seule les distributions des prélèvements de l'échantillon C020V00 sont ici discutées. La Figure 134 trace à la fois l'évolution de ces trois diamètres caractéristiques en fonction du temps (a) et de la teneur en cellulose (b). La même observation est faite sur ces trois paramètres suivis à savoir qu'au cours de l'hydrolyse enzymatique, la taille des pores augmente très légèrement (de 1,6 à 4,5 nm suivant le paramètre considéré).

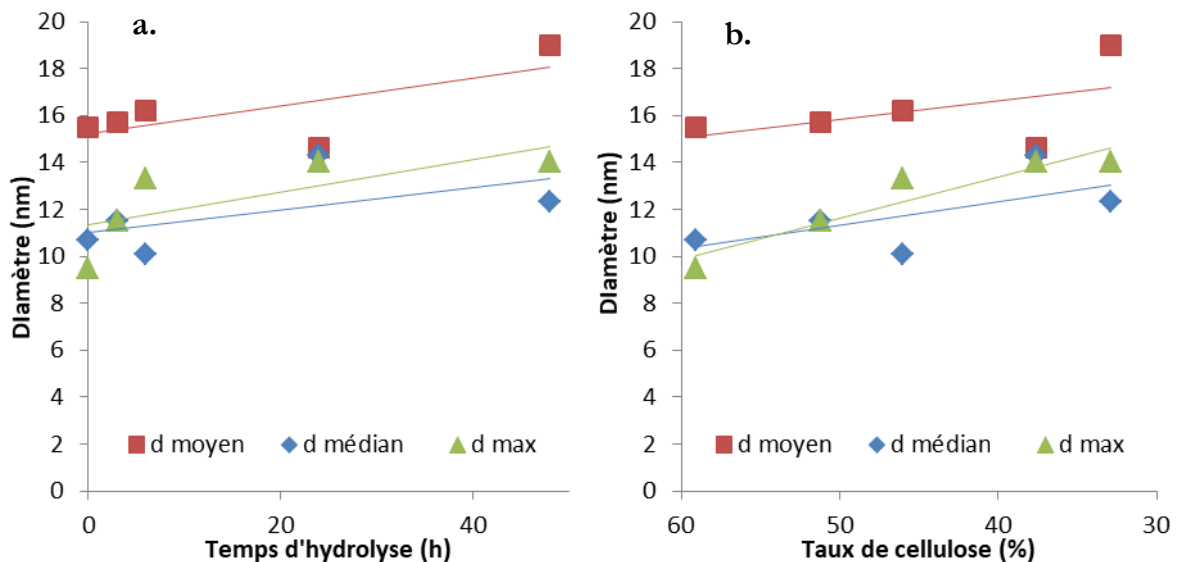


Figure 134 : Evolution de trois diamètres caractéristiques en fonction du temps d'hydrolyse (a) et du taux de cellulose (b) des prélèvements de l'échantillon C020V00

### h. Discussions sur le suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

#### *i La taille des particules*

La fragmentation dépend majoritairement de la fragilisation de la matrice lignocellulosique par la disparition partielle de la fraction polysaccharidique, à savoir des hémicelluloses par le prétraitement, et de la cellulose lors de l'hydrolyse. Ainsi, l'échantillon C020V00 étant déjà fragilisé structurellement par le prétraitement et le retrait d'une portion significative d'hémicelluloses (Tableau 22), cette fragmentation est d'autant plus aisée en début d'hydrolyse, où le taux de conversion de la cellulose (la pente de la courbe représentative de la conversion de la cellulose) est la plus élevée (les tissus celluloses comme les parenchymes peuvent se détacher des autres tissus), et en fin d'hydrolyse, lorsque le substrat présente son taux de cellulose minimal. Cette fragmentation semble toucher principalement l'échelle des tissus qui, suite à leur séparation, libèrent dans le milieu des cellules individuelles (dans la Figure 123 les distributions ainsi que les échelles associées). Durant le plateau observé entre 3 et 24 h, la taille des particules évolue peu montrant une structure assez stable alors que le glucose libéré continue d'augmenter. Cela suggère que les cellules et tissus sont digérés au niveau de la cellulose moyennement accessible, à savoir les parois secondaires. Ce n'est qu'en fin d'hydrolyse ( $t > 24$  h), lorsque les parois sont suffisamment digérées et désolidarisées les unes des autres, que la fragmentation se poursuit au niveau des tissus résiduels qui se délitent en cellules individuelles. De manière minoritaire, l'immersion sous agitation de biomasse lignocellulosique prétraitée contribue à accélérer cette fragmentation, contrairement à la paille native, beaucoup plus stable mécaniquement. Une étude présentée en Annexe 4 confirme la stabilité de la paille native à l'inverse des substrats traités (deux pailles sont introduites dans un réacteur enzymatique, l'une non traitée, l'autre prétraitée, mises sous agitation dans le réacteur, en l'absence d'enzymes). On y montre que la paille traitée présente une évolution visible des particules en suspension, contrairement à la paille non traitée.

#### *ii La morphologie et surface des particules*

La fragmentation confirmée en MEB de l'échantillon C020V00 et notamment en fin d'hydrolyse est conforme aux interprétations faites ci-dessous. Le lissage observé sur les aspérités initiales des particules montrent que ces aspérités rendent possibles une plus grande adsorption d'enzyme par la surface développée plus importante. Aux forts avancements, une rugosité de surface semble se former, ce qui peut être dû à la matrice poreuse laissée par l'hydrolyse de la cellulose. Pour l'échantillon A020V00, les phénomènes observés sont beaucoup plus ténus, mais vont globalement dans le même sens que ce qui vient d'être dit.

#### *iii La mise en défaut de la régression PLS-FTIR sur les échantillons partiellement hydrolysés*

Le fait que la régression PLS ne fonctionne plus lorsque les échantillons sont partiellement hydrolysés peut s'expliquer par le fait que l'épaisseur sondée est de l'ordre de  $1 \mu\text{m}$ , ce qui n'est pas forcément représentatif de la matrice lignocellulosique totale, notamment lorsque l'hydrolyse enzymatique a lieu. Ainsi, cela suggère que la cellulose digérée au cours de l'hydrolyse n'est pas sondée et est présente à une profondeur de plus de  $1-2 \mu\text{m}$ . Ceci est cohérent avec la structure de la biomasse : les parois du sclérenchyme par exemple (tissu très abondant dans la paille de blé) possèdent une paroi cellulaire pouvant avoisiner les  $5 \mu\text{m}$ , et les parois les plus à même d'être vues en infrarouge sont les parois donnant vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, la lamelle moyenne (et la paroi primaire) ainsi que la paroi secondaire S3 (donnant sur le lumen), qui sont reconnues pour être peu digestes par leur teneur en lignine, sont majoritairement analysées. Dans une moindre mesure cela reste valable pour le parenchyme lignifié (également très abondant dans la paille de blé) qui bien qu'ayant des parois plus fines, possède aussi cette structure. A l'inverse, la majeure partie de la cellulose susceptible d'être dégradée est située dans la paroi secondaire S2, c'est-à-dire complètement au cœur de la paroi cellulaire. Et ce phénomène est également valable à l'échelle du brin de paille lorsque la paille est moins fragmentée : lorsque le faisceau IR rencontre un brin de paille, l'épiderme est préférentiellement analysé, bien que minoritairement présent. La concentration "vue" en cellulose sera probablement la même aux différents avancements de l'hydrolyse enzymatique car la fraction cellulose de ce tissu, est très peu accessible par la présence de cutines et de

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

cellules constituées en grande partie de silice (qui forment des phytolithes). Cette situation est décrite en Figure 135, où l'on schématise de manière simplifiée les tissus et parois cellulaires lors de l'hydrolyse enzymatique, en regard des épaisseurs sondées en spectroscopie infrarouge (entre 0,95 et 2  $\mu\text{m}$  sur la plage de longueurs d'onde utilisée).

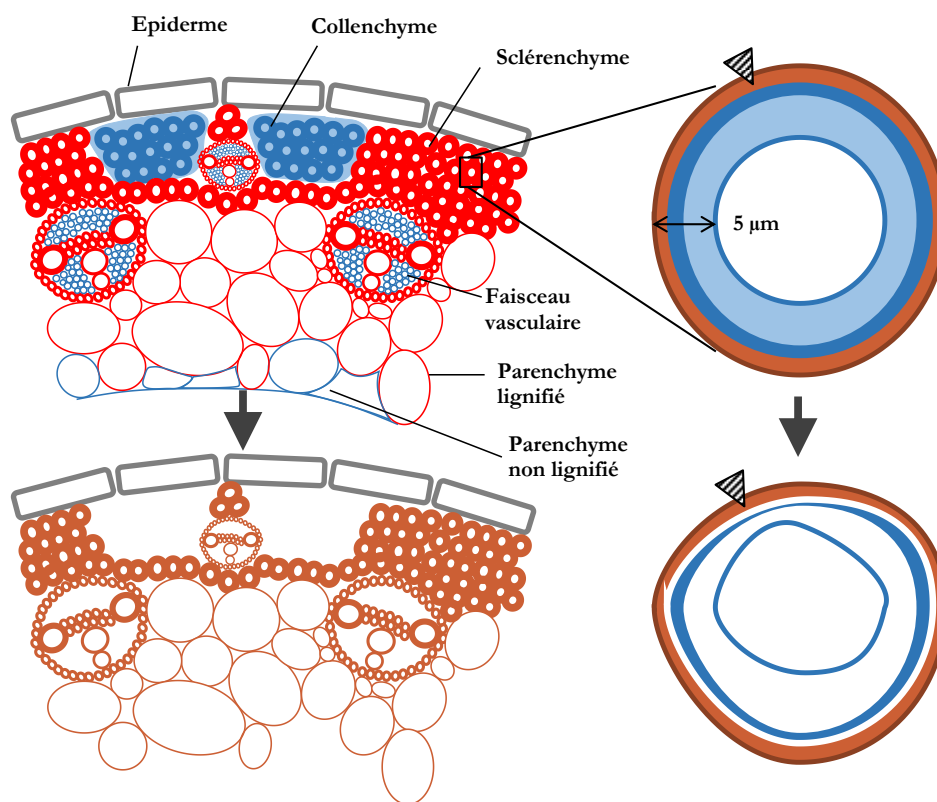


Figure 135 : Représentation schématique de la digestion enzymatique opérant à l'échelle des tissus et des parois cellulaires, en regard de la profondeur sondée par spectroscopie IR (triangle noir rayé). Les tissus et parois cellulaires très majoritairement cellulosiques sont indiqués en bleu, les zones lignocellulosiques sont indiquées en rouge, et les zones majoritairement ligneuses sont indiquées en brun

Ainsi, seule l'analyse de fractions digests et abondantes, pourraient rendre correctement compte de l'avancement de la saccharification. Cependant, les tissus purement cellulosiques sont relativement peu présents (collenchyme, parenchyme xylémien, phloème et parenchyme non lignifié de moelle), et souvent cachés par d'autres tissus (collenchyme au milieu du sclérenchyme, phloème et parenchyme xylémien encagés dans le faisceau vasculaire). Quant aux parois secondaires S2 des tissus lignifiés, elles sont elles aussi majoritairement invisibles en spectroscopie IR, étant au cœur de parois très épaisses.

Dans le cas d'un broyage extrêmement fin (granulométrie de l'ordre du micron), l'analyse des échantillons hydrolysés auraient probablement donné des résultats cohérents avec les étalonnages effectués sur les échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué également broyés de manière très fine.

Ces observations n'invalident cependant pas vraiment la régression par PLS présentée précédemment, puisque la calibration des différentes teneurs en macromolécules a pu être faite en analysant sur une profondeur de 1  $\mu\text{m}$ , des substrats traités (et non sur la base du matériau complet), mais non hydrolysés. Un broyage fin n'a pas été réalisé sur les différents substrats analysés dans les études précédentes par le fait qu'un broyage fin peut provoquer des modifications physicochimiques non négligeables : dé cristallisation de la cellulose [89,267], échauffements locaux qui peuvent dégrader les polysaccharides les moins stables, modification de la lignine [269,270], et augmentation de la surface accessible [185].

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

Dans la littérature, on retrouve également la stabilité de cet indice de cristallinité [158,160], bien que la digestibilité supérieure de la cellulose amorphe soit attestée par certains travaux (pour des substrats cellulotiques [158,161,262]). Elle est également moins stable thermodynamiquement [29], et se présente sous une forme moins compacte avec plus de sites potentiels d'adsorption pour les endoglucanases. La constance de l'indice s'explique simplement par le fait que les zones cristallines et amorphes se succèdent à l'échelle des microfibrilles (de diamètres nanométriques), et sont liées de manière covalente par une liaison  $\beta$ -(1,4) comme dans le reste des chaînes cellulotiques. De ce fait, pour que les endoglucanases puissent accéder à une zone amorphe il est d'abord nécessaire d'hydrolyser les chaînes cellulotiques qui entourent cette zone, que ces chaînes fassent partie d'une zone cristalline ou amorphe. Pour les cellobiohydrolases, l'idée est la même : par leur action processive le long des chaînes cellulotiques sur lesquelles elles sont adsorbées, une cellobiohydrolase adsorbée en extrémité de chaîne clivera les liaisons glycosidiques quel que soit le niveau de cristallinité

### *v La surface BET*

De la même manière que l'hydrolyse des hémicelluloses durant le prétraitement laisse dans la matrice des pores, on peut penser qu'il en va de même pour la cellulose. Ainsi on trace la surface BET des différents prélèvements en fonction du rendement en glucose, caractéristique de la perte de cellulose (Figure 136).

Le lien entre la surface spécifique et la perte de cellulose est clair pour l'échantillon C020V00, malgré la pause observée vers 6 h d'hydrolyse. Dans cet échantillon qui ne présente plus beaucoup de tissus purement cellulotiques (voir l'étude *in situ* qui suit), la cellulose digérée provient principalement des parois secondaires (paroi majoritaire en termes de masse, et riche en cellulose), moyennement digestes car en présence de lignine et d'hémicelluloses (mais prétraitées correctement). Dans cette paroi déjà poreuse par le retrait d'une fraction significative des hémicelluloses lors du prétraitement, le retrait progressif de la cellulose contribue à augmenter la surface. Par ailleurs l'observation en MEB de l'échantillon C020C (échantillon équivalent, à granulométrie initiale de 2 mm) avant et après une hydrolyse, en des zones repérées, indique un lissage des parois cellulaires en début d'hydrolyse (voir étude Annexe 3), ce qui peut contribuer à expliquer la légère baisse de surface observée à 6 h d'hydrolyse, même si le caractère significatif de la mesure pose question pour de si faibles valeurs.

Pour l'échantillon A020V00, et toujours en supposant que l'évolution mesurée de surface est réelle, on peut l'expliquer de la façon suivante : dans un premier temps la surface diminue avec la consommation de la cellulose, ce qui traduit la digestion des quelques tissus cellulotiques (parenchymes non lignifiés, phloème, parenchyme xylémien, et collenchyme), de même que du lissage des surfaces par attaque préférentielle des aspérités. Dans un second temps, cette surface augmente avec la consommation de la cellulose. Cette cellulose est probablement moins accessible et provient des parois lignifiées, dont le retrait d'une fraction cellulotique laisse quelques pores dans la matrice (on se rapproche du cas de figure de l'échantillon C020V00 (traité à 140 °C), mais avec une amplitude bien moindre). Cet échantillon étant quasi non poreux, il est possible que l'état de fragmentation joue également un rôle mineur dans la surface développée du prélèvement en fin d'hydrolyse.

Ces propositions de schémas de dégradation mettent notamment en évidence :

- La digestion rapide des tissus cellulotiques et uniquement de ces tissus, à faible sévérité.
- L'adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules digestes, qui présentent aspérités et déchirures rendant une plus grande quantité de substrat immédiatement accessible (vu également en MEB à travers le lissage des aspérités de surface) au cours de l'hydrolyse.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

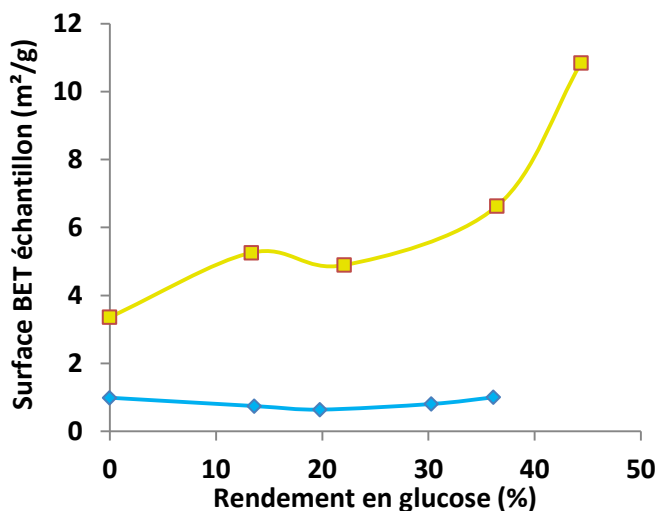


Figure 136 : Evolution de la surface accessible en fonction du rendement en glucose pour les prélèvements des échantillons A020V00 (bleu) et C020V00 (jaune)

### vi La taille des pores

L'augmentation de ces diamètres avec l'avancement de la réaction permet de dire que durant l'hydrolyse enzymatique, la dimension des pores présents augmente légèrement, par le retrait de la cellulose qui les entoure, ce qui est conforme à ce qui a été dit jusqu'à présent.

## i. Conclusion sur le suivi *ex situ* de la matrice lignocellulosique

L'approche consistant à caractériser différents prélèvements au cours de l'hydrolyse enzymatique des échantillons C020V00 et A020V00, a permis de suivre les modifications physicochimiques en œuvre lors de cette étape du procédé. À l'issue de cette étude, il est possible de décrire le phénomène de dégradation enzymatique sur la base des propriétés étudiées, d'ordre chimique, physique, morphologique et topologique. Ces scénarios dépendent des conditions opératoires de prétraitement à l'acide dilué (très douces et intermédiaires dans notre cas).

### i Mécanismes observés

À faible sévérité (échantillon A020V00), la paille prétraitée est assez peu digeste et conserve relativement bien son intégrité. En début d'hydrolyse, seuls les tissus purement cellulosiques et certaines aspérités de surface sont digérées rapidement. En fin d'hydrolyse, une fragmentation significative est tout de même observée avec une séparation des tissus en longues fibres individuelles. Les zones de fragilité sont ici situées entre les cellules. L'échantillon étant globalement non poreux, sa digestion se fait principalement depuis la surface extérieure vers l'intérieur de chaque tissu accessible, cellule, ou encore paroi. De ce fait, sa surface accessible évolue peu (la surface reste globalement lisse, même à échelle fine). L'hydrolyse de la cellulose se fait de manière non spécifique sur les zones cristalline (allomorphes  $I_\alpha$  et  $I_\beta$ ) ou amorphe, malgré la différence avérée de digestibilité de ces phases. Cela se traduit par un indice de cristallinité constant au cours de l'hydrolyse. Ceci s'explique par le fait que les zones cristallines sont entrecoupées de régions moins denses sur la longueur des microfibrilles. De ce fait l'hydrolyse d'une zone amorphe dépend directement de l'hydrolyse des structures cristallines qui l'entourent. Ceci est d'autant plus vrai pour les cellobiohydrolases qui ont une action processive le long des chaînes cellulosiques sur lesquelles elles sont adsorbées. Ce point est encore valable pour l'échantillon C020V00.

À sévérité intermédiaire de prétraitement, l'altération portée sur la matrice de l'échantillon C020V00 par le prétraitement change légèrement la trame. En début d'hydrolyse, seuls les tissus cellulosiques sont digérés (Figure 137 à 0 et 3 h d'hydrolyse). Par ailleurs, les tissus sont déjà fragilisés par le retrait des

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

hémicelluloses, et leur hydrolyse au niveau de zones de fragilité provoque une première fragmentation en début d'hydrolyse, qui se manifeste par une dislocation partielle des tissus en cellules individuelles et petits groupes de cellules. Pour autant, la structure fibrillaire est maintenue. Entre 3 h et 24 h d'hydrolyse, la matrice est suffisamment stable pour que l'on ne puisse pas observer d'évolutions significatives au niveau de la fragmentation. La paroi secondaire (S2 notamment) étant plus digeste que pour l'échantillon A020V00 par le retrait des hémicelluloses, son hydrolyse est réalisée tout au long de la saccharification. Ceci entraîne progressivement la formation de mésopores à l'intérieur des parois, dont le diamètre augmente légèrement au cours de l'hydrolyse. Ces deux aspects contribuant ainsi à l'augmentation quasi uniforme de la surface accessible et du volume poreux au cours de l'hydrolyse. Comme pour l'échantillon A020V00, la cellulose est indifféremment dégradée au niveau des zones amorphes et cristallines, par l'intrication des domaines cristallins et amorphes.

En termes d'état de surface, les aspérités sont dans un premier temps lissées et cette analyse est confirmée par les observations microscopiques *in situ*, montrant une adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules digestes. Ceci pourrait expliquer la légère diminution de porosité à 6 h d'hydrolyse. En fin d'hydrolyse, le substrat consiste en un complexe lignocellulosique lâche, très poreux (par le retrait significatif et successif des hémicelluloses lors du prétraitement et de la cellulose lors de l'hydrolyse enzymatique). Cela s'exprime au niveau de la surface externe des particules, par une rugosité plus ou moins fine suivant les endroits (aspérités de l'ordre du micromètre à la cinquantaine de nanomètre). Toujours en fin d'hydrolyse, les parois significativement digérées ne permettent plus d'assurer le maintien des cellules entre elles, ce qui provoque une reprise de fragmentation à 48 h d'hydrolyse. Cependant, les fibres individuelles (cellules de sclérenchyme par exemple) semblent garder leur intégrité, aussi ne retrouve-t-on pas de fragmentation ultérieure des cellules en fragments (d'un point de vue abondance volumique tout du moins). La Figure 137 retrace les principales évolutions observées et interprétations, au cours de l'hydrolyse enzymatique.



## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

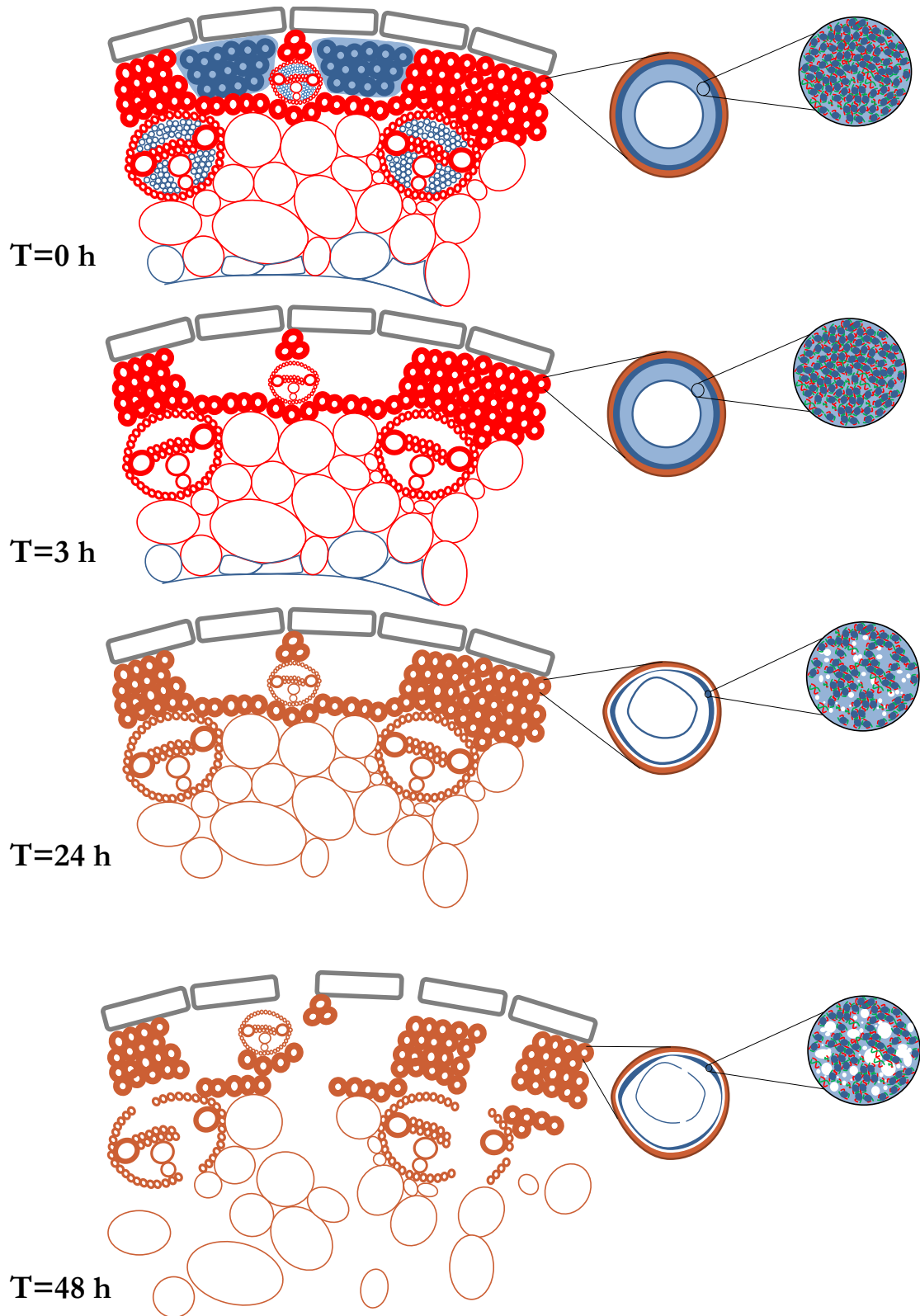


Figure 137 : Représentation schématique des principales modifications observées au cours de l'hydrolyse enzymatique, au travers des différentes caractérisations, et à l'échelle des tissus (gauche), de la cellule (milieu), et de la structure de la paroi secondaire S2 (droite). La cellulose est indiquée en bleu, la lignine ou zones fortement ligneuses en brun, et les hémicelluloses en vert. Les zones lignocellulosiques sont indiquées en rouge

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### *ii Influence du prétraitement sur la digestibilité d'un substrat lignocellulosique*

Avec l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant, on peut établir qu'un prétraitement plus intense facilite la fragmentation du substrat au cours de l'hydrolyse en le rendant plus sensible à une digestion enzymatique. Il est également possible de corréler une amélioration de la digestibilité avec une augmentation de la porosité du substrat qui semble fortement liée à la teneur en cellulose.

### *iii Questions en suspens*

Une analyse exhaustive des principaux paramètres physico-chimiques a permis d'établir une première série de paramètres pouvant influencer l'hydrolyse enzymatique. Mais cette analyse a soulevé plusieurs interrogations :

- Comment se fait l'adsorption des enzymes sur le matériel lignocellulosique en termes d'amplitude du phénomène, profil temporel, et localisation spatiale, dépendamment de la morphologie/taille de particule, type de substrat ?
- Y a-t-il une adsorption non productive significative des enzymes sur les surfaces ligneuses ?
- Les différences de digestibilités entre les tissus prétraités sont-elles du même acabit que celles décrites dans la littérature sur des biomasses natives et mises en évidence notamment par des approches *in situ* en microscopie ou microspectroscopie ?
- Comment les comportements d'adsorption et de dégradation évoluent lorsque les conditions opératoires de prétraitement sont modifiées ?

Pour y répondre, des expérimentations *in situ* en microscopie d'imagerie multispectrale ont été menées. Le but est de visualiser durant l'hydrolyse enzymatique à la fois la dégradation des parois cellulaires, et l'adsorption des enzymes sur les particules. Ce n'est pas tant l'aspect multispectral qui a été utilisé, aucune analyse multivariée n'ayant été réalisée, que l'utilité de chaque canal pour visualiser spécifiquement les parois du substrat et les enzymes.

## 2. Les analyses *in situ* en fluorescence dans l'UV profond au synchrotron SOLEIL

Les expérimentations réalisées sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL avaient pour but d'en apprendre davantage sur la saccharification de matériel lignocellulosique à l'échelle microscopique. Cette approche permet en effet de suivre l'adsorption des enzymes productive/non productive, la digestibilité des tissus de biomasse prétraitée dépendamment des conditions opératoires du prétraitement, ou encore la dégradation des particules (fragmentation, désagrégation etc...). Cette analyse permet aussi de compléter les observations et constats faits sur les analyses *ex situ* de prélèvements de substrats à différents temps d'hydrolyse, pour confirmer ou infirmer certains descripteurs pressentis de l'hydrolyse enzymatique.

Pour ce faire, la démarche consiste à étudier pour un ensemble de tissus caractéristiques, l'évolution au cours du temps de la fluorescence des enzymes, des parois (lorsque présente) ainsi que l'intensité visible en transmission, d'un ensemble de tissus caractéristiques. L'objectif est de comparer la dégradation des différents tissus et l'effet du prétraitement sur la dégradation enzymatique.

### a. Les matériaux de l'étude

Le choix des échantillons s'est fait sur la volonté d'avoir une plage de réactivité en hydrolyse enzymatique étendue, et des conditions opératoires de prétraitement variées et comparables, avec la contrainte de ne sélectionner que trois à quatre échantillons, du fait de la lourdeur des expérimentations synchrotron et du temps de faisceau accordé limité. Pour ce qui est de la campagne des prétraitements à l'acide dilué, les échantillons choisis sont les échantillons A020C, C020C, et D020C, produits par un prétraitement pendant 20 minutes, et respectivement à 100 °C, 140 °C, et 160 °C (voir en Figure 138 leur positionnement quant à leur sévérité de prétraitement associée, ainsi que leur rendement de conversion de la cellulose en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique).

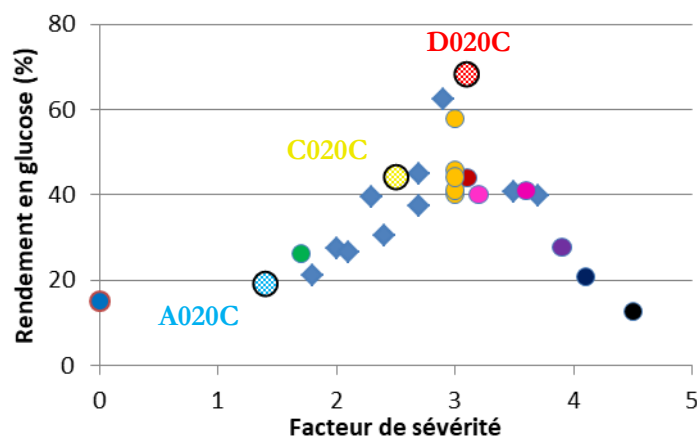


Figure 138 : Rendement en glucose des échantillons traités à l'acide dilué en fonction du facteur de sévérité du prétraitement à l'acide dilué. Les échantillons colorés constituent la sélection utilisée pour cette thèse, et les échantillons texturés sont les échantillons sélectionnés pour cette étude plus particulièrement

Le Tableau 24 résume les caractéristiques compositionnelles et de rendement en glucose en hydrolyse enzymatique des trois échantillons sélectionnés.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 24 : Composition et rendement en glucose des échantillons sélectionnés pour l'étude *in situ*

Spécimen	Traitement	Cellulose (%pds)	Hémicelluloses (%pds)	Fraction non polysaccharidique (%pds)	Rendement glucose (%)
A020C	100°C/20min	44	26	30	26,3
C020C	140°C/20min	58	8	34,5	44,0
D020C	160°C/20min	58,8	1,1	40,1	68,2

### b. Les études préliminaires

#### *i La détermination de la préparation d'échantillon adaptée*

La recherche d'une préparation d'échantillon qui soit à la fois de qualité en termes d'observation, facile à mettre en œuvre, et visiblement représentative des particules constituantes de l'échantillon, a été une tâche assez délicate. Différentes préparations ont été testées (enrobages en résine, avec agar-agar, cryo-microtomie, sans résine), et observées grâce à plusieurs outils (macroscope en autofluorescence, prototype BlueBox de macrovision, microscopie optique). La préparation retenue notamment pour des raisons de qualité de coupe et de simplicité de réalisation est la réalisation de cryo-coupe d'épaisseur 20  $\mu\text{m}$  (ou coupes cryo-microtomes), dont le protocole de réalisation est décrit dans la partie Méthodes expérimentales du manuscrit.

#### *ii La recherche de la concentration idoine en enzymes (DISCO)*

Les premières expérimentations DISCO réalisées avec les concentrations maximales en enzymes (pour le cocktail GC220, 4,9 mg de protéine par mL de mélange réactionnel, et pour le cocktail N188, 13,9 mg de protéines par mL de mélange) visaient à observer la dégradation enzymatique et à visualiser l'adsorption des enzymes. Néanmoins elles se soldèrent par un échec. En effet, aucune adsorption des enzymes sur un quelconque tissu n'a été observée, de même que nous n'avons observé aucune dégradation de la matrice au cours du temps. Toutefois en diluant le cocktail (100, 50 et 25 fois), nous avons pu observer à la fois la dégradation de certains tissus, et l'adsorption des enzymes sur les tissus présentant une affinité, ce qui amène à penser que dans cet environnement confiné, il peut exister une désactivation des enzymes par les enzymes, que ce soit par blocage entre elles (encombrement stérique ou blocage physique au niveau de la surface de l'échantillon en milieu confiné) ou interactions entre les enzymes à forte concentration. Il est rapporté dans la littérature la possibilité d'une inhibition rétroactive de la saccharification causée par la dose d'enzyme [271].

La concentration retenue et utilisée pour toutes les expérimentations DISCO est de 0,2 mg de protéine de cocktail GC220 par mL de mélange réactionnel contre 0,5(5) mg de protéine par mL de mélange réactionnel pour le cocktail N188, ce qui est 3,2 fois plus concentré que dans une hydrolyse standard. Par contre, la dose d'enzymes rapportées à la quantité de substrat introduite est estimée (cette estimation est en revanche très imprécise) à 0,1 mg de protéines par mg de substrat pour le cocktail GC220 (contre  $3.10^{-3}$  mg de protéine par mg de substrat en hydrolyse standard), et de 0,28 mg de protéine par mg de substrat pour le cocktail N188 (contre  $9.10^{-3}$  mg de protéine par mg de substrat), ce qui est grossièrement 32 fois plus grand que pour une hydrolyse standard. Par conséquent, la question de la représentativité des expérimentations vis-à-vis d'une hydrolyse standard ou industrielle sera à discuter.

### c. Rappel du protocole d'expérimentation

Pour rappel, et comme décrit dans la partie Méthodes expérimentales du manuscrit, les expérimentations se sont déroulées comme suit. La solution d'enzymes est déposée sur la cryo-coupe à l'instant  $t_0$  puis la préparation est placée sur la platine chauffante dans le microscope. Une mosaïque de  $6 \times 6$  images individuelles est réalisée afin de couvrir un large champ de vue. Trois signaux sont enregistrés pour chaque zone de la mosaïque imagée : la fluorescence d'enzyme entre 327-353 nm pendant 15 s, la fluorescence des parois pendant 2 s entre 420-480 nm et l'intensité transmise dans le visible pendant 100 ms (image en fond

clair). Au total, les cinétiques de dégradation enzymatique ont été observées pendant 2h35. Il est à noter qu'une durée incompressible d'environ 10 min est nécessaire pour réaliser les réglages du microscope, une fois que l'échantillon est placé sous l'objectif. Ainsi, la dégradation entre  $t_0$  et  $t_1$  (lancement de l'acquisition), ne peut être observée.

### d. Observations en début d'hydrolyse

Des exemples d'images individuelles obtenues sur les 3 échantillons A020C, C020C et D020C sont présentés ci-dessous sur la Figure 139. Les particules observées sont très hétérogènes dans chacun des 3 canaux :

- Dans le canal de la fluorescence des enzymes (canal 1, à 327 nm), on distingue le fond correspondant à la solution et contenant les enzymes, des particules dont les parois sont blanches due à une concentration d'enzymes ce qui traduit l'affinité qu'elles ont avec les enzymes qui sont y sont adsorbées, des particules avec les parois non fluorescentes qui au contraire ne semblent pas attirer les enzymes.
- Dans le canal de la fluorescence des parois (canal 2, à 420 nm), certaines particules présentent une fluorescence de leur paroi alors que pour d'autres cette fluorescence est absente (seul l'échantillon A020C est concerné car pour les deux autres échantillons, le prétraitement a conduit à supprimer l'auto fluorescence des parois).
- Sur l'image en fond clair (canal 3, image en transmission dans le visible), les tissus présentent une forte disparité au niveau de leurs dimensions et de leur opacité.

Pour pouvoir avancer dans l'analyse du matériau lignocellulosique au cours de l'hydrolyse enzymatique, il devient alors nécessaire de définir un certain nombre d'objets à analyser. Ces objets sont soit des tissus, soit des particules lorsque la zone est suffisamment déstructurée pour que l'on ne distingue plus de structure cellulaire claire. Ces tissus ou particules déstructurées, seront désignées sur la base de caractéristiques morphologiques et de fluorescence.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

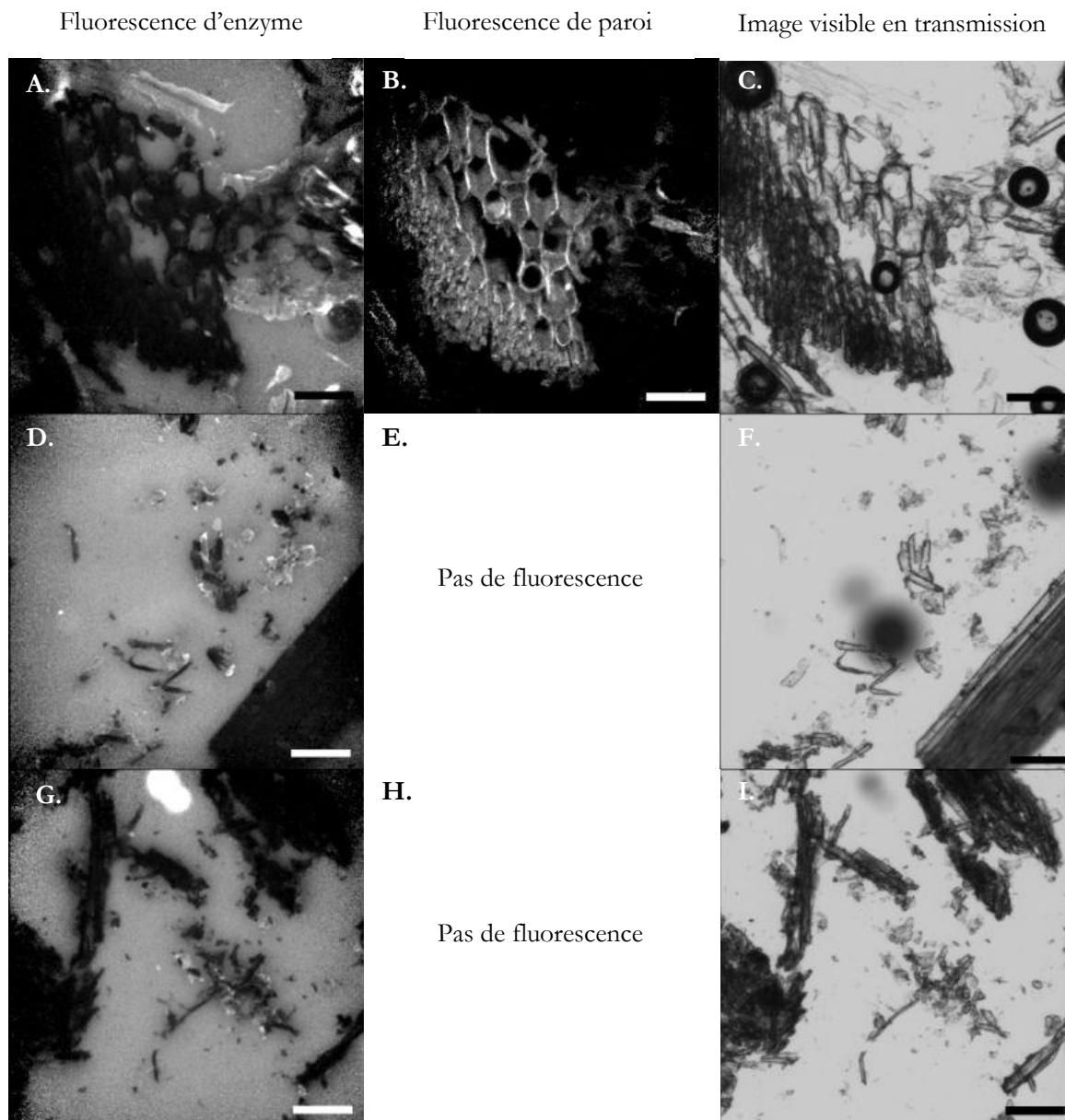


Figure 139 : Exemples d'images individuelles obtenues, pour des préparations microscopiques des échantillons A020C, C020C, et D020C, au commencement de l'hydrolyse enzymatique, et dans les trois canaux d'observation. Plage d'intensité des niveaux de gris utilisée pour visualiser les images : en fluorescence d'enzyme, de 0 (noir) à 600 (blanc) ; en fluorescence de paroi, de 0 (noir) à 170 (blanc) ; et de 0 à (noir) 65535 (blanc) pour l'imagerie visible en transmission. Barre d'échelle : 100  $\mu m$

### e. Les tissus et particules observés

Au cours des observations microscopiques, plusieurs objets peuvent être identifiés, dépendamment des conditions opératoires de prétraitement qu'a subies l'échantillon.

#### *i* Rappel des tissus présents dans une paille de blé

Classiquement, dans une coupe transversale de tige ou de feuille, différents tissus sont recensés : parenchymes non lignifiés (mésophylle pour la feuille et moelle pour l'intérieur de la tige), parenchyme lignifié, phloème, parenchyme xylémien, collenchyme, et épiderme.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

L'identification est possible par la localisation des tissus, la morphologie et l'agencement des cellules, et leur caractère plutôt cellulosique ou plutôt ligneux (révélé ici par la coloration, Figure 140).

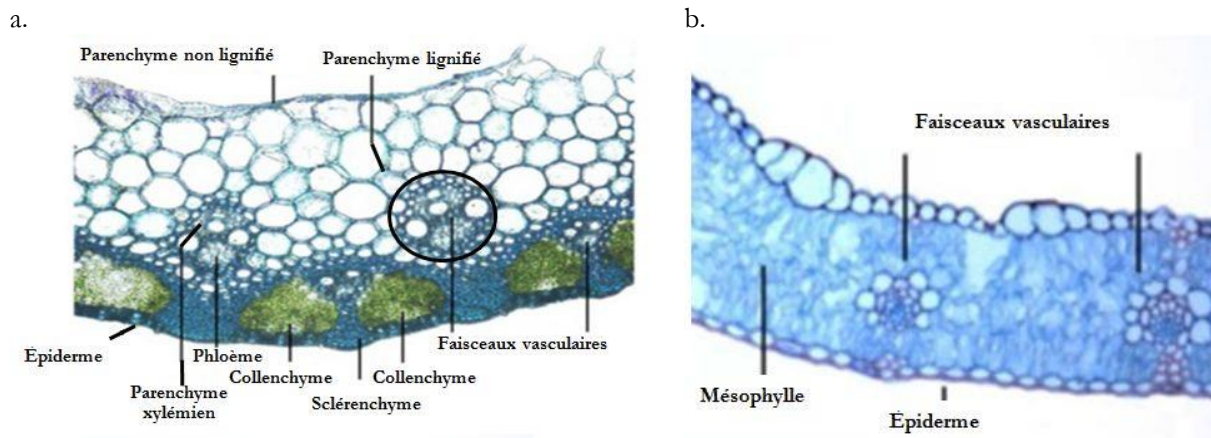


Figure 140 : Coupe transversale d'une paille de blé colorée et observée au microscope optique. Adapté de [24]

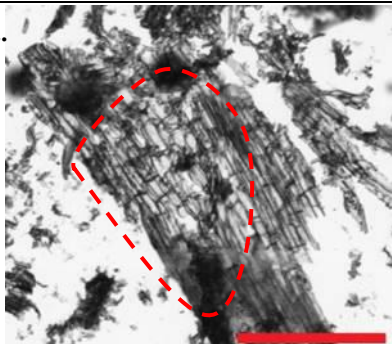
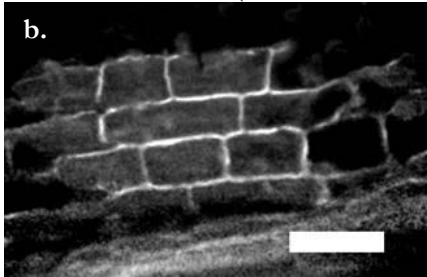
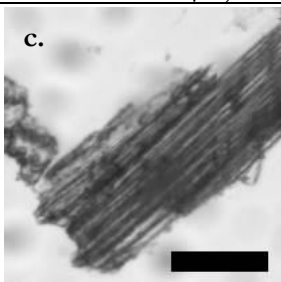
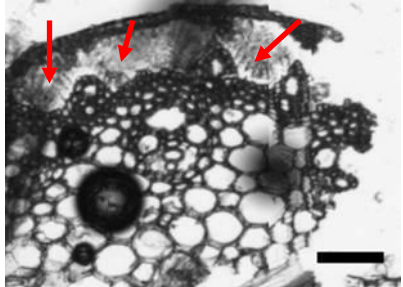
### ii Les tissus observés dans les échantillons prétraités pulvérulents

Sur les échantillons de l'étude, la reconnaissance des tissus est moins immédiate, par la forme pulvérulente de l'échantillon, et l'altération physicochimique provoquée par le prétraitement. Bien souvent, l'identification n'est pas possible auquel cas les particules ne seront pas étudiées ou bien étudiées sous l'appellation "non identifiées".

Il reste possible d'identifier les tissus des particules dans un certain nombre de cas cependant. On se base pour cela sur les caractéristiques reconnues des différents tissus, qu'elles soient d'ordre morphologique ou de fluorescence des parois émise à 420 nm. Les propriétés des tissus permettant l'identification sont résumées dans le Tableau 25, et sont faites sur la base d'observations en microscopies optiques et MEB, issues de nos propres expérimentations et de la littérature. Des exemples sont présentés dans le Tableau 25.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

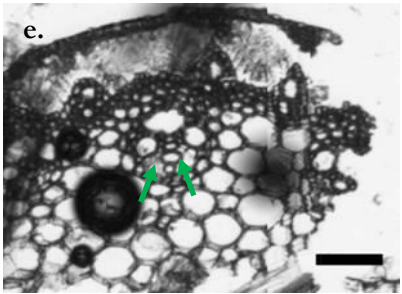
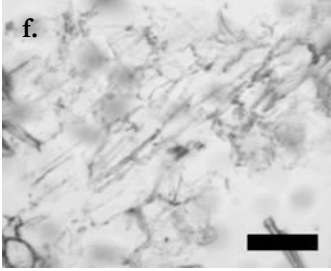
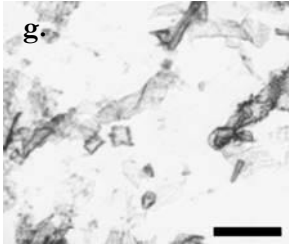
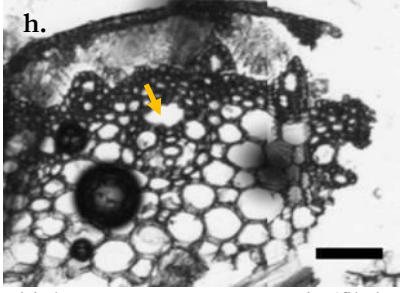
*Tableau 25 : Caractéristiques des tissus*

	Caractéristiques des tissus par type d'imagerie	Images
<p><b>Parenchyme lignifié</b></p> <p>Tissu abondant</p>	<p>Grandes cellules fines peu allongées, et ponctuées, opaques, situées entre l'enveloppe de sclérenchyme et la moelle de parenchyme non lignifié.</p> <p>En coupe longitudinale, elles sont rectangulaires et agencées comme des briques de maison.</p> <p>Fluorescence significative des parois à 420-480 nm à faible sévérité de prétraitement.</p>	<p><b>a.</b></p>  <p>Paille C020C, parenchyme lignifié en coupe longitudinale (zone délimitée par le contour fermé en tirets rouges), observé en mode fond clair (barre d'échelle 500 µm)</p> <p><b>b.</b></p>  <p>Parenchyme lignifié en coupe longitudinale (échantillon A020C) observé en autofluorescence des parois (barre d'échelle 100 µm)</p>
<p><b>Sclérenchyme</b></p> <p>Tissu abondant</p>	<p>Longues cellules de petit diamètre, aux parois épaisses, opaques. Ce tissu forme une couronne entourant la tige, et est situé sous l'épiderme. Il est aussi présent au niveau des faisceaux vasculaires.</p> <p>Fluorescence significative des parois à 420-480 nm à faible sévérité de prétraitement.</p>	<p><b>c.</b></p>  <p>Sclérenchyme en coupe longitudinale (échantillon A020C) observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 µm)</p>
<p><b>Collenchyme</b></p>	<p>Petites cellules épaisses, semi-transparentes, formant un tissu localisé, et situé dans la tige entre le sclérenchyme et le parenchyme lignifié.</p> <p>Peu de fluorescence au niveau des parois</p>	<p><b>d.</b></p>  <p>Collenchyme (flèches rouges, échantillon A020C) en coupe transversale, observation en transmission (barre d'échelle 100 µm)</p>




## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 25 (continuation)

<b>Parenchymes non lignifiés</b>	Xylémien Tissu minoritaire	<p>Petites cellules fines transparentes du faisceau vasculaire (forme caractéristique, voir Figure 140a). Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Parenchyme xylémien (flèches vertes), échantillon A020C en coupe transversale, observation en transmission (barre d'échelle 100 <math>\mu</math>m)</p>
	Moelle Tissu minoritaire	<p>Grandes cellules fines et peu allongées, transparentes, et bordant le lumen. Ce tissu tend à disparaître aux niveaux des zones mûres de la tige (entrenœuds en bas de tige). En coupe longitudinale, elles sont rectangulaires et agencées comme des briques de maison. Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Parenchyme non lignifié de moelle. Echantillon A020C observé en coupe longitudinale et en mode fond clair (barre d'échelle 100 <math>\mu</math>m)</p>
	Mésophylle Tissu minoritaire	<p>Masses difformes fines et transparentes, situées au cœur de la feuille. Pas de fluorescence au niveau des parois. Le manque de structure rend son identification incertaine.</p>	 <p>Possibles fragments de mésophylles, échantillon A020C, observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 <math>\mu</math>m)</p>
<b>Phloème</b> Tissu minoritaire	<p>Petites cellules fines et transparentes. Pas de fluorescence au niveau des parois</p>	 <p>Phloème en coupe transversale (flèche orange, échantillon A020C), observé en mode fond clair</p>	

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Tableau 25 : continuation et fin

<p><b>Epidermes</b></p> <p>Tissu minoritaire</p>	<p>Petites cellules rectangulaires en coupe transversale, et opaques. Motifs spécifiques en surface : phytolithes et stomates, qui varient dépendamment de l'origine (tige, intérieur ou extérieur de feuille). Pas de fluorescence au niveau des parois.</p>	 <p>Echantillon A020C, fragment d'épiderme de tige présentant des phytolithes, en coupe longitudinale (zone siliceuse) et observé en mode fond clair (barre d'échelle 100 µm)</p>
--	---	---

### iii Identification des tissus et particules en fonction du prétraitement subi par l'échantillon

L'identification des tissus est facilitée pour l'échantillon A020C car la température modérée de prétraitement ne déstructure que peu le substrat. De plus, la température de prétraitement n'est pas suffisante pour faire disparaître la fluorescence des parois, ce qui donne un indice de plus pour une identification. Sur les coupes des échantillons C020C (prétraitement à 140 °C) et D020C (160 °C), on ne peut plus identifier certains tissus, soit du fait de leur disparition, soit du fait du manque d'indices nécessaires à leur identification. Il s'agit des tissus celluloseux principalement, plus fragiles : parenchymes non lignifiés (xylémien, de moelle, ou mésophylle de feuille), phloème, et collenchyme.

Pour finir, à sévérité intermédiaire (C020C) et forte (D020C) de prétraitement, certaines particules ne possèdent plus de structures cellulaires identifiables. Elles font également partie du recensement des objets à analyser pour ne pas se priver de cette fraction du matériel lignocellulosique, qui peut être présent en grande quantité dans ces cas-là. L'analyse par microscopie confocale à balayage laser a permis de montrer que ces amas sont constitués de zones avec une surface cellulosique et d'autres avec une surface ligneuse (Figure 141b, voir à ce sujet le chapitre traitant de l'effet du traitement à l'acide dilué sur la matrice lignocellulosique). On montre en Figure 141 des clichés de l'échantillon D020C sur une zone complètement déstructurée, par différents outils d'observation : microscopie à fluorescence UV d'enzymes (a), microscopie confocale à balayage laser (b), fluorescence UV-VIS (c) et imagerie visible de type fond clair (en transmission).

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

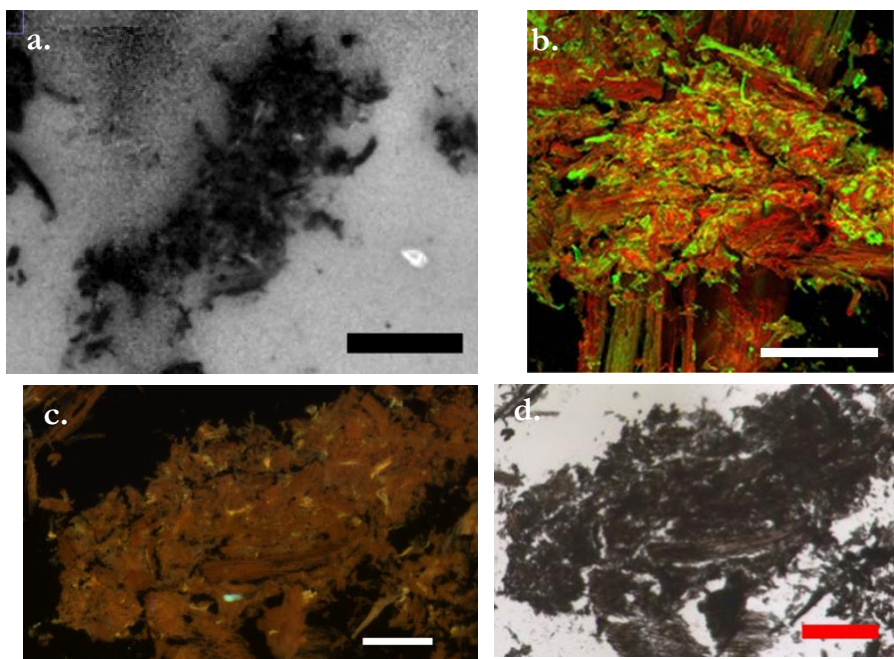


Figure 141 : Observations microscopiques de zones sans structure cellulaire distinguée et présente dans l'échantillon D020C (prétraitement à 160 °C). a : observation en microscopie UV, autofluorescence d'enzymes ; b : observation en microscopie confocale après marquage à la safranine, la cellulose apparaît ici en vert, et la lignine en rouge ; c : observation en autofluorescence (compilation des canaux obtenus pour les excitations UV-B et bleue) sur le microscope à fluorescence ; d : observation de la même zone qu'en (c), en imagerie de type fond clair. Barres d'échelle : 100 µm (a), 200 µm (b), et 300 µm (c et d)

### iv Identification des tissus et particules en fonction du prétraitement subi par la paille

En conclusion, on définit dépendamment des conditions opératoires de prétraitement, les objets définis dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Objets considérés pour étudier la dégradation de la matrice lignocellulosique en hydrolyse enzymatique

	A020C	C020C	D020C
Parenchymes non lignifiés (feuille/tige)	✓	✓	✓
Parenchymes lignifiés (tige)	✓	✓	✓
Sclérenchymes (tige)	✓	✓	✓
Epidermes (feuilles/tige)	✓	✓	✓
Phloème (tige)	✓	∅	∅
Parenchyme xylémien	✓	∅	∅
Collenchyme (tige)	✓	∅	∅
Zones déstructurées/non identifiées	∅	✓	✓

Un objectif de 5 mesures de profils par objet ou sous-objet est visé, afin d'avoir une certaine confiance quant à la représentativité de la mesure. Suivant le contexte, des subdivisions de ces tissus et particules feront l'objet d'intérêt particulier, notamment lorsque l'objet considéré est hétérogène. De plus, dans certains cas, il sera possible d'étudier les objets selon le type de coupe : pour le parenchyme lignifié et le sclérenchyme, les coupes transversales seront distinguées des coupes longitudinales, et feront l'objet de mesures distinctes.

## f. Exemple d'un suivi de dégradation enzymatique

### i Description qualitative

Les mosaïques obtenues dans le canal de la fluorescence des enzymes au cours de l'hydrolyse enzymatique d'une coupe de l'échantillon A020C au premier temps (a), à 70 min (b), et à la fin de l'expérimentation (2h35, c) sont présentées sur la Figure 142. Sur cette mosaïque, on voit que quelques particules s'illuminent puis s'éteignent, signifiant que des enzymes s'adsorbent en leur surface, puis s'en désorbent (quelques exemples dans les zones délimitées en orange). A l'inverse, d'autres particules semblent ne pas présenter d'affinité particulière avec les enzymes. Globalement, la quantité de matière qui est visuellement digérée à cette échelle reste faible. Cette observation est également faite pour les deux échantillons prétraités à plus haute température (140 °C et 160 °C).

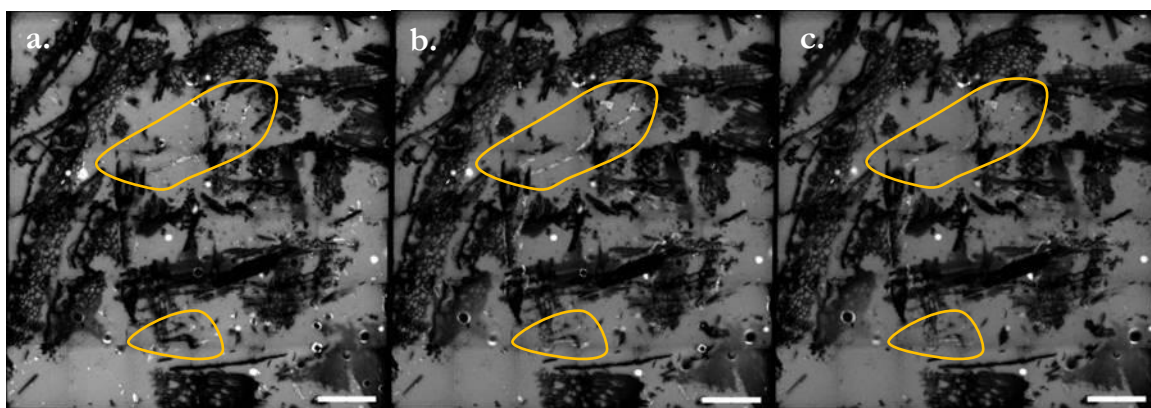


Figure 142 : Exemple d'image mosaïque en fluorescence d'enzyme de l'échantillon A020C, à  $t=10$  min (a),  $t=70$  min (b), et  $t=2h35$  (c). Barre d'échelle :  $500 \mu m$

### ii Conversion de la cellulose attendue

Afin de tenter d'expliquer pourquoi la conversion visuellement observée de la matrice lignocellulosique est si faible, on cherche à estimer la conversion de la cellulose que l'on obtient après 2h15 d'hydrolyse enzymatique dans les conditions de ces expérimentations synchrotron.

On se place dans des conditions opératoires d'hydrolyse enzymatique différentes de celles avec lesquelles ont été réalisées les hydrolyses standards servant de référence. On essaye ici d'estimer très grossièrement la cinétique attendue pour les échantillons A020C et C020C, notamment compte tenu de l'augmentation de la dose d'enzyme.

Pour mener à bien cette estimation, on part du constat selon lequel lorsqu'on multiplie la dose d'enzyme introduite par un facteur  $k$  fixé, on augmente le rendement à un temps donné  $t_i$ , d'une quantité  $x$  qui dépend du temps choisi et du substrat considéré. Ceci est valable tant que l'on est suffisamment loin du rendement maximal théorique de 100 % de conversion de cellulose [76,134]. Mathématiquement cela se traduit donc localement par :

$$R(k \cdot [enz], t_i) = R([enz], t_i) + k \cdot x(t_i) + o([enz], t_i) \quad \text{Équation (13)}$$

Où  $[enz]$  est la concentration en enzymes initialement choisie,  $R$  est la fonction rendement en glucose qui dépend de la dose d'enzyme et du temps d'hydrolyse, et  $o([enz], t_i)$  une fonction négligeable par rapport aux autres termes, au voisinage de la concentration en enzymes choisie.

Dans notre cas, deux types d'échantillon (A020C et C020C) parmi les 3 de cette étude, ont été hydrolysés à la fois avec une dose simple et une dose double d'enzyme (comparativement à une hydrolyse standard), avant les expérimentations synchrotron. Le doublement de la dose d'enzymes fait augmenter les rendements de conversion des deux échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué, ce qui permet

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

de déterminer la valeur fixe d'augmentation de rendement à chaque fois que l'on double la dose. Les rendements en glucose à 1,5 et 3 heures obtenus à dose standard et doublement de la dose sont présentés dans le Tableau 27. La dose d'enzymes rapportée à la quantité de substrat pour les expérimentations synchrotron étant 32 fois supérieure à celle utilisée en hydrolyse standard, on multiplie par 5 ( $32 = 2^5$ ) les gains de rendement obtenus pour prédire grossièrement les rendements en glucose cherchés (en ajoutant au gain de rendement, le rendement à dose simple d'enzymes). En faisant la moyenne entre les rendements prédits à 1,5 et 3 h de saccharification, on estime le rendement obtenu à 2h15, ce qui correspond, à 20 min près, à la durée d'observation de l'hydrolyse enzymatique. Le rendement à la fin des séries d'acquisition est estimé à 46 % pour l'échantillon A020C, et à 62 % pour l'échantillon C020C.

Vu l'imprécision de la détermination de la quantité d'enzymes rapportée à la quantité de substrat, il convient de considérer ces déterminations avec une certaine réserve.

Tableau 27 : Rendements de conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique, à 1,5 et 3 h de saccharification, et

	Rendement à 1,5 h, à dose simple (%)	Rendement à 1,5 h, à dose double (%)	Gain de rendement à 1,5 h
A020C et A020V00	4	11,2	7,2
C020C et C020V00	9,6	19,4	9,8
	Rendement à 3 h, à dose simple (%)	Rendement à 3 h, à dose double (%)	Gain de rendement à 3 h
A020C et A020V00	6,1	15,5	9,4
C020C et C020V00	13,7	24,1	10,4
A dose 32x supérieure	Rendement prédit à 1,5 h	Rendement prédit à 3 h	<b>Rendement prédit à 2h15</b>
A020C	40 %	53	<b>46 %</b>
C020C	59 %	66	<b>62 %</b>

De plus, l'absence d'agitation est largement susceptible de ralentir la conversion de la cellulose par les enzymes, notamment par l'accumulation locale de glucose au niveau des surfaces, ce qui diminue l'efficacité des enzymes. Pour illustrer ceci, les rendements de 2 hydrolyses enzymatiques identiques en termes de conditions opératoires et de substrat (échantillon C020V22, produit à 140 °C pendant 20 min, avec une détente explosive de 22 bar) ont été mesurés, à l'exception du fait que l'une des deux a été réalisée en l'absence d'agitation magnétique. Les rendements obtenus à 72 h d'hydrolyse enzymatique sont de 49 % pour l'échantillon agité, alors qu'il est de 39,5 % pour l'échantillon non agité, ce qui représente une perte relative de rendement de presque 20 % de rendement. Si on essaie de prendre en compte cette minoration, les rendements passeraient à 37 et 50 %, respectivement pour les échantillons A020C et D020C.

Compte tenu du fait que la teneur en cellulose est de 44 % pds pour l'échantillon A020C et de 58 % pds pour l'échantillon C020C, la perte de matériel lignocellulosique à la fin de l'observation microscopique serait de 16,3 % pds et 29 % pds pour ces deux échantillons, ce qui est finalement relativement faible.

Par ailleurs d'autres paramètres s'ajoutent à cela pour expliquer la faible dégradation des particules :

- la manifestation de l'hydrolyse, se fait beaucoup par la fragmentation des particules et des tissus (montrée dans la première partie de ce chapitre) plus que par leur disparition (sauf cas des tissus cellulosiques). Ici le milieu étant confiné, la fragmentation n'est pas observable ;
- la digestion des particules, tissus et cellules, se fait dans le sens de l'épaisseur des parois (amincissement des parois), et non par raccourcissement des particules dans le sens de la longueur. C'est pour cela que les coupes transversales, minoritaires avec notre protocole de préparation de coupes microscopiques, montrent des évolutions beaucoup plus nettes ;

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- l'imprégnation est possiblement facilitée dans le cas d'une coupe transversale, car chaque cellule est ouverte et en proie à une capillarité efficace ;
- seule la lignine est vraiment opaque, ce qui fait que la dégradation pourra être d'autant moins visible au niveau des zones lignifiées. Et ceci est totalement cohérent avec la dégradation tenue effectivement observée à travers les différentes cinétiques observées chez les différents échantillons.

### iii Conclusion

La faible dégradation visuelle semble dans une certaine mesure cohérente compte tenu des considérations évoquées. L'intérêt sera maintenant d'analyser minutieusement les tissus et particules pour mieux se rendre compte des phénomènes d'adsorption et de désorption, mais aussi de la dégradation des tissus à une échelle d'observation plus adaptée. Pour cela, on a mis en place une méthodologie de traitement par profils qui est expliquée ci-dessous.

## g. La méthodologie d'analyse des échantillons

### i Mesures d'intensités

Pour chaque échantillon, des profils de dégradation des différents objets observés (tissu ou particule) sont extraits des images. Le but final est de mieux comprendre les modes de dégradations de la matrice lignocellulosique à cette échelle d'observation, dépendamment de chaque objet et de la température de prétraitement (le temps de séjour, lui, est de 20 min dans les 3 cas). Cela consiste à sélectionner et délimiter l'objet souhaité puis de mesurer pour chaque temps d'hydrolyse l'intensité de fluorescence des enzymes dans le canal 1 (entre 327-353 nm) nommée  $I_{FE}$ , l'intensité de fluorescence des parois dans le canal 2 (entre 420-480 nm) nommée  $I_{FP}$ , et l'intensité transmise dans le canal 3 (imagerie de type fond clair en transmission) nommée  $I_T$ . Les intensités mesurées sont en réalité des intensités corrigées (voir la méthodologie de correction des images dans la partie Méthodes expérimentales) et les unités correspondantes sont notées UAIE, UAIP et UAIT.

Dans la mesure du possible, on souhaite réaliser *a minima* 5 mesures de profils (plus, en cas de fortes hétérogénéités) pour chaque type d'objet observé. Dans le cas de tissus peu présents, sur les coupes, ou présentant des artefacts instrumentaux, ce nombre sera parfois réduit. Le Tableau 28 indique pour chaque échantillon, les objets observés, et le nombre de mesures de profils effectuées.

Tableau 28 : Recensement des profils temporels acquis à partir des séries d'images mosaïques temporelles et multicanaux. Les zones grisées sont les combinaisons tissu-type de coupe qui n'ont pas fait l'objet de mesures, par absence de ces tissus sur les coupes considérées, ou sans intérêt

	A020C		C020C		D020C	
	Coupe		Coupe		Coupe	
	Longit	Transv	Longit	Transv	Longit	Transv
<b>Parenchyme lignifié</b>	3	4	9	1	9	0
<b>Parenchymes non lignifiés</b>	13		12		7	
<b>Phloème</b>		1				
<b>Parenchyme xylémien</b>		2				
<b>Collenchyme</b>		1				
<b>Sclérenchyme</b>	1	5	5	0	10	0
<b>Epiderme</b>	5	1	7	0	4	0
<b>Zones déstructurées/ non identifiées</b>			12		6	
<b>Fond d'enzymes sans particule</b>	>>5		>>5		>>5	

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### *ii Précautions concernant les mesures des profils d'intensité*

Lors de la définition des zones de mesure de profils, il est nécessaire de s'assurer qu'il n'y ait aucun artefact au niveau de la zone, pour tous les canaux : pas de bulle, pas de contamination de signal par quelconque artefact, pas de dérive spatiale au cours du temps de la zone visée (dans le plan xy, mais également dans le sens de l'épaisseur), ni même d'effet d'ombrage en transmission.

### *iii L'étude de l'intensité dans la solution*

On s'intéresse ici à la cohérence interne des acquisitions considérées, pour pouvoir réaliser des comparaisons entre échantillons, tissus, etc. Le niveau d'intensité de fluorescence des enzymes  $I_{FE}$ , de fluorescence dans l'image paroi  $I_{FP}$ , et de l'intensité en transmission visible transmise  $I_T$ , dans les zones où les particules, bulles, etc., sont absentes (ce qu'on appelle "le fond"), est donc un bon moyen de contrôle pour s'assurer que les niveaux d'intensité sont similaires canal par canal pour les différentes acquisitions. Cela permet de s'assurer que la variation du signal au cours du temps est à la fois de faible amplitude et relativement commune pour chaque observation, ce qui permet de comparer les acquisitions entre elles. Par exemple, l'irradiation sous faisceau, peut induire une baisse de la fluorescence des fluorophores, par phénomène de photoblanchiment. Il faut donc s'assurer que cet effet est négligeable, ou, *a minima*, identique pour les différentes acquisitions.

Des mesures ont alors été réalisées dans les 3 canaux :

- sur des particules immergées dans l'eau en l'absence d'enzymes (blanc nommé "particules sans enzyme"), issues de l'échantillon C020C
- sur des enzymes seules, sans particules (nommé "enzymes sans particule")
- sur des coupes classiques avec enzymes et particules, mais au niveau du milieu enzymatique, dans des zones dépourvues de particules (nommé "fond d'enzymes")

La Figure 143 montre l'évolution des intensités mesurées dans les trois canaux, pour des régions correspondant au fond dans lesquelles seule la solution est observée. Les profils du fond pour les enzymes sans particules et les particules sans enzymes sont également présentés. Sur cette même figure on montre également un exemple de délimitation de zones pour la mesure des intensités des fonds d'enzymes.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

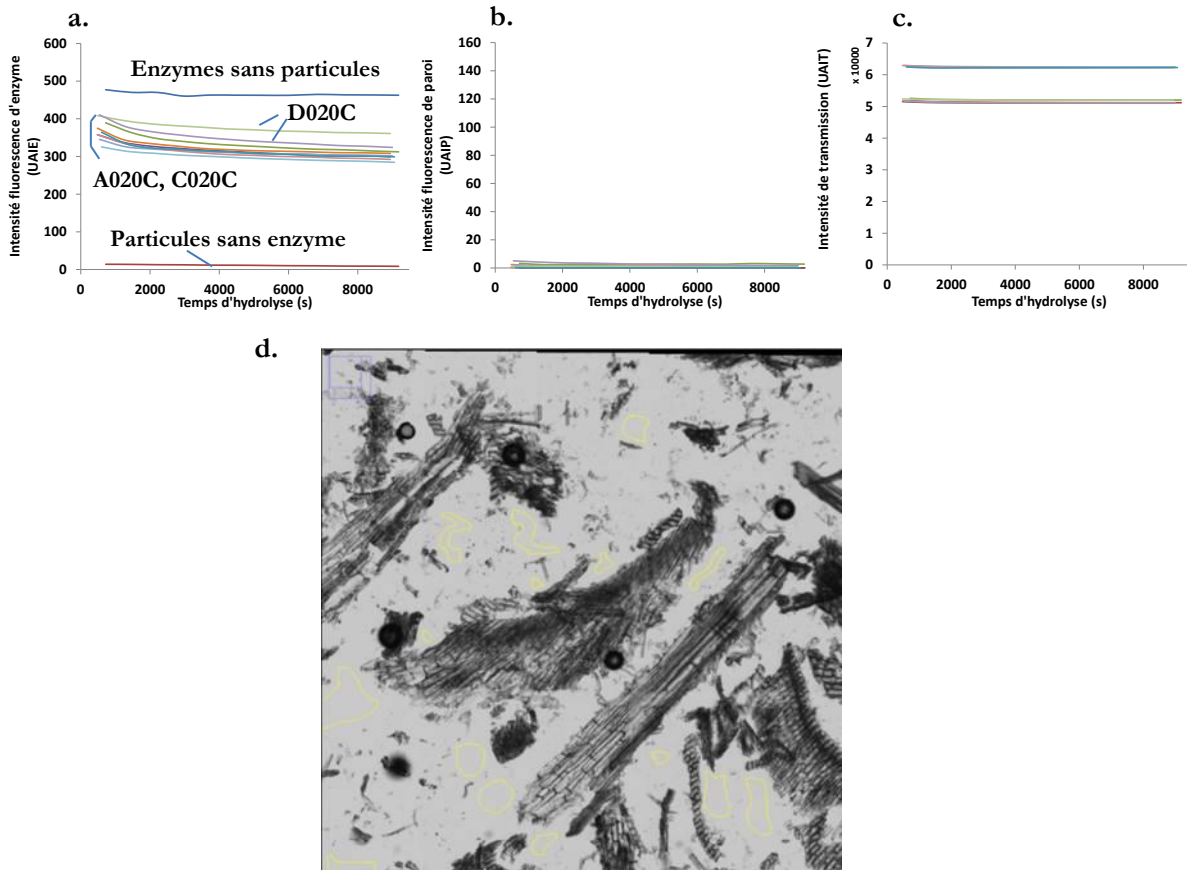


Figure 143 : a, b, et c : Evolution de l'intensité de fluorescence d'enzyme (a), de paroi (b), et d'intensité en transmission (c), en fonction du temps, pour les fonds des différentes acquisitions ; d : Exemple de délimitations (contours jaunes) pour les mesures de fond de fonds (dans ce cas du blanc de particules sans enzymes)

### Concernant le fond sur la préparation "enzymes sans particules" :

- l'intensité mesurée dans le premier canal (fluorescence d'enzyme) est stable tout au long de l'analyse autour de 467 UAIE. Il apparaît donc que le phénomène de photoblanchiment des chromophores des enzymes est négligeable. Ainsi, les évolutions d'intensité de fluorescence qui seront mesurées dans les fonds d'enzymes seront représentatives de l'évolution de la concentration en enzymes dans le milieu réactionnel :
- l'intensité de fluorescence des parois est bien évidemment nulle puisqu'il n'y a pas de substrat,
- l'intensité transmise dans le 3<sup>e</sup> canal (intensité visible en transmission) est du même ordre que les fonds des autres échantillons, ce qui montre que la source lumineuse (lampe mercure pour ce canal) est stable d'une acquisition à l'autre.

### Concernant le fond sur la préparation "particules sans enzyme" :

- l'intensité de fluorescence mesurée dans le 1<sup>e</sup> canal (fluorescence des enzymes) est très faible (entre 8 et 14 UAIE) et est négligeable devant les intensités mesurées dans des milieux enzymatiques, ce qui assure que cette fluorescence sera spécifique de la présence des enzymes,
- l'intensité de fluorescence des parois est nulle car on mesure ici les fonds, là où il n'y a pas de particule,
- Enfin, l'intensité mesurée dans le 3<sup>e</sup> canal (visible) est du même ordre que ce qu'on observe pour les fonds des autres préparations.



### Concernant les fonds d'enzymes des préparations avec particules mises en dégradation :

- Pour la fluorescence des enzymes (canal 1),
  - l'ensemble des échantillons ont leur profil de fluorescence d'enzyme sur une plage assez resserrée d'intensité initiale de fluorescence, entre 410 et 325 unités arbitraires d'intensité. Ceci assure le caractère comparable des profils d'une acquisition à une autre. Cette plage est située de manière logique entre les cas extrêmes que sont la préparation "particules sans enzyme", dont la plage est comprise entre 8 et 14 UAIE, et la préparation "enzymes sans particule", dont l'intensité de fluorescence se situe aux alentours de 467 UAIE,
  - par ailleurs, on constate que pour les fonds d'enzyme des deux préparations de l'échantillon D020C, le profil d'intensité est placé légèrement au-dessus du paquet de profils des autres préparations mises en dégradation (voir la Figure 143a). Il peut s'agir d'un aléa dont l'occurrence serait alors liée à la préparation et non reliée à l'échantillon. Ce point sera malgré tout discuté par la suite et mis en regard des différents comportements d'adsorption-désorption des enzymes sur les différentes particules de ces échantillons, et comparativement aux autres échantillons,
  - enfin, une décroissance légère de l'intensité de fluorescence des enzymes au cours de l'hydrolyse est observée (entre 8 et 20 % selon les échantillons). Ce phénomène n'est pas observé dans le cas des « enzymes sans particule », ce qui tend à dire que cette décroissance n'est pas liée à un photoblanchiment mais plutôt à l'adsorption d'enzymes sur les particules de biomasse, ce qui résulte en une moins grande quantité d'enzymes libres dans le milieu réactionnel.
- La fluorescence de paroi (canal 2) est proche de 0, là encore car les délimitations choisies pour les mesures sur les fonds sont exempts de particules,
- L'intensité visible en transmission (canal 3) est comprise entre 51000 et 63000 UAIT. Elle est de plus très stable au cours du temps.

De manière générale, les intensités des fonds d'enzymes dans les différents échantillons sont globalement assez stables au cours du temps, dans le canal de fluorescence d'enzyme (Figure 143a), comme dans le canal de fluorescence de paroi (Figure 143b) et d'imagerie en fond clair (Figure 143c). Ceci permettra d'attribuer les futures variations observées au niveau des profils à un événement intrinsèquement lié au comportement des enzymes dans le cas du premier canal (adsorption, désorption de l'enzyme par exemple), et des particules dans le cas du troisième canal.

## **h. Exploitation des résultats**

### *i Profils d'intensités*

Pour pouvoir comparer au mieux les profils temporels de fluorescence et d'imagerie visible en transmission, une méthodologie de traitement des données a été mise en place pour permettre de tirer des informations plus quantitatives que celles obtenues par les données brutes. Un exemple est présenté dans ce paragraphe, afin d'expliquer pas à pas cette méthodologie. Pour ce faire, une zone de parenchyme non lignifié (Figure 144a) de l'échantillon A020C est choisie comme exemple.

Pour chaque image de cette zone obtenue au cours de l'hydrolyse enzymatique, des mesures d'intensités ont été réalisées dans les 3 canaux, à savoir le canal de fluorescence des enzymes (327 à 353 nm), le canal correspondant à la fluorescence des parois (420 à 480 nm) et le canal correspondant à l'intensité transmise dans le visible. La zone de mesure est délimitée en jaune sur la Figure 144.a. Les intensités mesurées au cours de l'hydrolyse dans les 3 canaux sont respectivement tracées sur les Figure 144b, c, et d.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

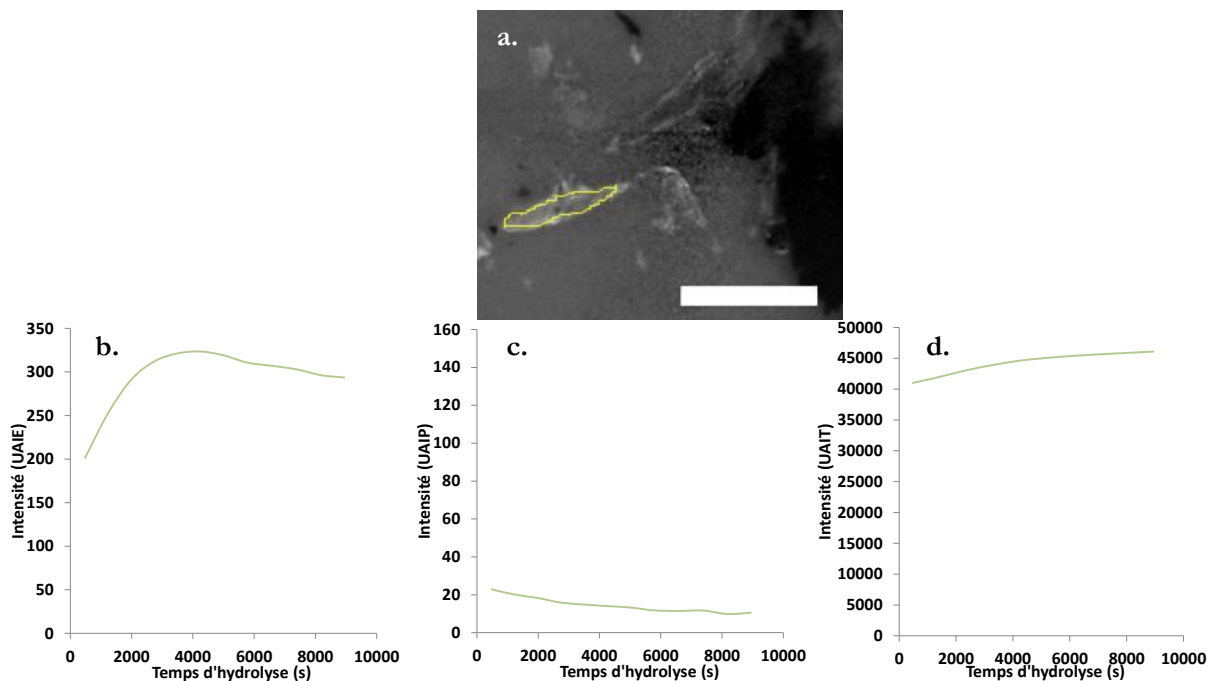


Figure 144 : a : image en visible et transmission représentant le fragment de tissu considéré (parenchyme non lignifié). La zone de mesure est délimitée en jaune. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$  ; b : profil temporel d'intensité de fluorescence d'enzyme à 327 nm ; c : profil temporel d'intensité de fluorescence de paroi à 420 nm ; d : profil temporel d'intensité lumineuse transmise (dans le visible)

Le profil de fluorescence d'enzyme (Figure 144b) montre l'existence d'une première phase d'adsorption (comme il s'agit d'un équilibre dynamique d'adsorption-désorption, on devrait plutôt parler d'une phase d'adsorption majoritaire) qui prend fin lorsque l'intensité de fluorescence atteint un maximum, vers 3500 s, après lequel c'est la désorption des enzymes qui devient majoritaire.

L'intensité de fluorescence des parois (Figure 144c) semble diminuer légèrement. Toutefois, comme expliqué précédemment, l'intensité de fluorescence des parois est faible sur les échantillons prétraités ainsi il est difficile d'exploiter ce signal, notamment pour les échantillons prétraités à haute sévérité.

L'intensité visible en transmission quant à elle augmente au cours de l'hydrolyse et de manière plus marquée entre  $t_1$  et 3500 s. Il semble donc exister un lien entre l'évolution de l'intensité de fluorescence des enzymes et l'intensité transmise dans le visible.

Afin d'aller plus loin dans l'interprétation, de corréler les informations observées dans les deux canaux (fluorescence des enzymes et intensité transmise dans le visible) et de pouvoir comparer aisément les différents tissus des différents échantillons, plusieurs traitements sont réalisés et sont présentés ci-dessous.

L'intensité transmise dans le visible  $I_T(t)$  est très largement dépendante de l'opacité et de la densité du matériau, ou encore de son épaisseur. De ce fait, les variations d'intensité lumineuse mesurées au cours du temps ne permettent pas de caractériser correctement l'évolution de la zone considérée, à savoir l'amincissement de l'échantillon. Afin de rendre compte de ce phénomène, plusieurs corrections sont réalisées :

- Une soustraction de l'intensité transmise dans le fond (en l'absence d'échantillon) pour chaque temps  $t$  :

$$I_{T_{fond}}(t) - I_T(t) \quad \text{Équation (14)}$$

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- On définit le coefficient d'amincissement relatif  $A_r$  au temps  $t$  par rapport au temps initial  $t_i$ , au temps  $t$  :

$$A_r(t) = \frac{I_{T_{fond}}(t_i) - I_T(t_i)}{I_{T_{fond}}(t) - I_T(t)} \quad \text{Équation (15)}$$

Où  $I_{T_{fond}}(t_i)$  et  $I_{T_{fond}}(t)$  sont l'intensité en transmission au niveau du fond au tend initial  $t_i$  et au temps  $t$ , et  $I_T(t)$  l'intensité en transmission au temps  $t$ , du tissu considéré.

En remplaçant la valeur de l'intensité visible en transmission par la grandeur  $A_r$ , les profils de la Figure 144 deviennent :

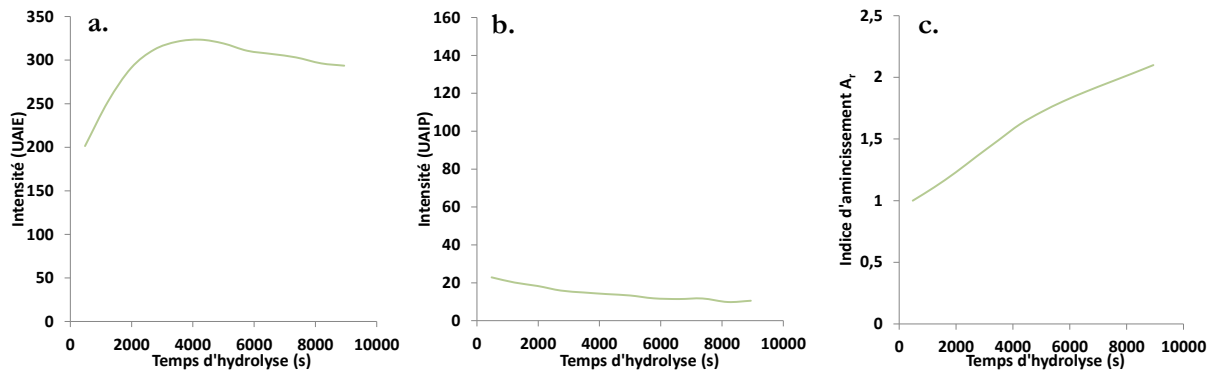


Figure 145 : a : profil temporel d'intensité de fluorescence d'enzyme à 327 nm ; b : profil temporel d'intensité de fluorescence de paroi à 420 nm ; c : profil temporel d'intensité lumineuse transmise (dans le visible)

On peut qualitativement confirmer que l'amincissement est d'autant plus rapide que l'intensité de fluorescence d'enzyme est grande (ici vers  $t=3500$  s). Maintenant que l'on possède une grandeur relative à la dégradation de la matrice lignocellulosique qui permette la comparaison des tissus et échantillons, on cherche à expliciter le lien existant entre cette grandeur d'amincissement (que l'on supposera représentative de la digestion du tissu) et un travail effectif des enzymes, à travers leur intensité de fluorescence.

### *ii Relation entre fluorescence dans l'image des enzymes et dans l'image visible*

Basé sur les observations précédentes, on suppose dans un premier temps que la valeur de l'amincissement relatif  $A_r$  est proportionnelle (à une constante près) à la quantité totale d'enzymes qui se sont adsorbées sur la particule sur l'intervalle de temps considéré (entre 0 et  $t$ ). Cela se traduit par le cumul ou somme des intensités de fluorescence  $I_{FE}(t)$  jusqu'au temps  $t$ , et que l'on notera  $\sum I_{FE}(t)$ . Dans notre cas, les mesures étant discrètes (au nombre de 12) et le pas de temps entre deux mesures étant constant, on a pour tout temps de mesure  $t_i$  :

$$\sum I_{FE}(t_i) = \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j) \quad , i \in \llbracket 1; 12 \rrbracket \quad \text{Équation (16)}$$

où  $t_j$  est le temps à la  $i^{\text{ème}}$  série d'acquisition (parmi les  $i$  séries d'acquisitions échelonnées dans le temps). Ce cumul  $\sum I_{FE}(t_j)$  exprime la quantité d'enzymes d'enzyme qu'a accueilli la surface de la particule, et donc indirectement le travail d'hydrolyse qu'ont pu effectuer les enzymes jusqu'au temps  $t_i$  à cet endroit.

On exprime maintenant l'amincissement relatif  $A_r$  en fonction de ce cumul de contributions des enzymes sur la Figure 146, afin de vérifier le lien pressenti entre ces deux paramètres. On remarque qu'il

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

existe une relation bijective et quasi affine, comme attendu. La légère concavité sur cette courbe suggère que les enzymes sont légèrement plus efficaces en début qu'en fin d'hydrolyse.

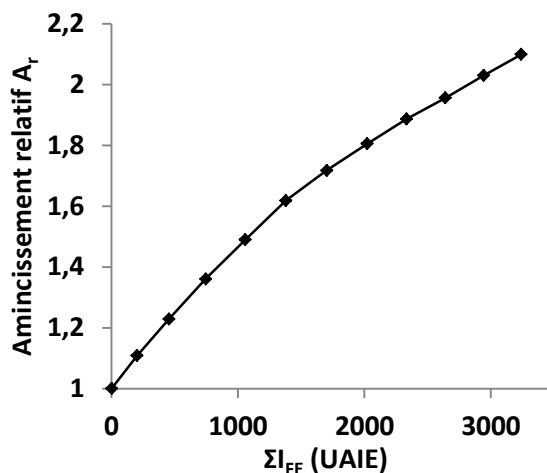


Figure 146 : Indice d'amincissement relatif en fonction des cumuls d'intensités de fluorescence d'enzyme aux différents temps de mesure

### iii Scénario d'interaction enzyme-particules

Pour mieux comprendre l'existence d'un tel phénomène, on considère un profil de fluorescence d'enzyme complet, représenté de manière schématique en Figure 147. Entre le moment où les enzymes sont ajoutées et le temps  $t_1$  de la première acquisition, une partie de la première phase d'adsorption des enzymes n'est pas observable (première image acquise au bout d'une dizaine de minutes). De même, au dernier temps d'acquisition  $t_{12}$ , la réaction d'hydrolyse n'est pas tout à fait terminée. En effet, le régime n'y est pas encore statique. Mais par la forme du profil observé dans la plage temporelle d'acquisition, on peut supposer qu'il existe une valeur finale seuil d'intensité de fluorescence, en prolongeant le profil. Cela signifie qu'en fin d'hydrolyse, des enzymes sont toujours présentes, mais ne participent plus à l'hydrolyse.

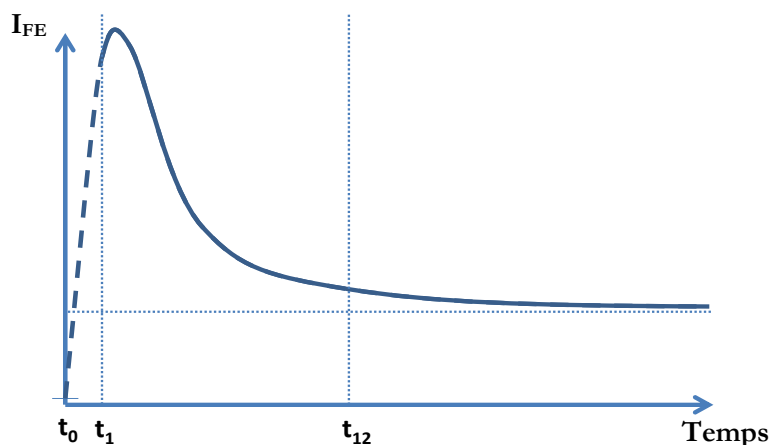


Figure 147 : Représentation schématique d'un profil de fluorescence d'enzyme au cours de l'hydrolyse enzymatique.  $t_0$  représente le moment où les enzymes sont ajoutées à la préparation microscopique,  $t_1$  le temps à la première acquisition, et  $t_{12}$  le temps à la dernière acquisition

Ces enzymes peuvent être adsorbées de manière non productive sur la matrice non complètement digérée, ou bien être des enzymes du milieu réactionnel dans le cas où la matrice lignocellulosique aurait été complètement digérée. L'idée consistant à supposer l'existence d'enzymes progressivement bloquées à la surface de l'échantillon est cohérente avec l'hypothèse souvent énoncée dans la littérature pour expliquer la baisse de la cinétique de saccharification, en évoquant un blocage plus ou moins réversible au niveau de la surface de l'échantillon partiellement hydrolysé [262,272]. Dans le cas d'une fluorescence issue

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

du milieu enzymatique par digestion totale de la particule, la valeur finale d'intensité de fluorescence doit être égale à celle du milieu enzymatique (le "fond d'enzyme"). Dans tous les cas, on comprend la nécessité de pouvoir dissocier la part des enzymes qui réalisent effectivement un travail d'hydrolyse, de la part des enzymes qui ne participent plus à cette hydrolyse.

En nommant  $I_{FE_{dynam}}(t)$  l'intensité de fluorescence d'enzyme relative aux enzymes qui hydrolysent effectivement la matrice au temps  $t$ , et,  $I_{FE_{stat}}(t)$  l'intensité de fluorescence d'enzymes relative aux enzymes qui ne participent pas à la saccharification, on a :

$$I_{FE}(t) = I_{FE_{dynam}}(t) + I_{FE_{stat}}(t) \quad \text{Équation (17)}$$

Pour parvenir à dissocier d'un point de vue cinétique la part des enzymes qui participent à la saccharification de la part des enzymes qui n'y participent pas, plusieurs hypothèses sont faites :

### Hypothèse 1 :

Dans le cas d'une adsorption d'enzymes non productive en surface de particule, celle-ci se fait de manière irréversible. On suppose de plus que le taux instantané d'adsorption non productive se produisant à un instant  $t_i$  est proportionnel à l'intensité totale de fluorescence d'enzymes au temps  $t_i$ ,  $i \in \llbracket 1;12 \rrbracket$  :

$$\frac{dI_{FE_{stat}}(t)}{dt} = K \cdot I_{FE}(t) \quad \text{Équation (18)}$$

Où  $K$  est une constante à déterminer.

Cette hypothèse se base sur le fait que d'une part l'adsorption non réversible ne peut, par définition, que s'accumuler, d'autre part, que cette adsorption non réversible a plus de chance de se produire lorsque le taux instantané d'adsorption totale est intense, et enfin, que le cumul des intensités de fluorescence des enzymes est censé être représentatif du travail de conversion effectué tout au long de l'hydrolyse.

- Hypothèse 2 :

Le travail des enzymes entre  $t_0$  et  $t_1$  (temps de la première acquisition) est négligeable par rapport au travail des enzymes effectué sur la durée de l'observation. Pour certains tissu très réactifs, on sait que ce ne sera pas vrai, auquel cas un biais sera probablement introduit.

- Hypothèse 3 :

De même, on suppose qu'à la fin de l'expérimentation il n'y a plus d'adsorption réversible, c'est-à-dire que la cinétique d'hydrolyse est nulle et que les enzymes restantes contribuant au signal en fin d'expérimentation sont pour une part des enzymes adsorbées de manière non productive, et pour une autre part, des enzymes libres du milieu réactionnel présentes derrière et/ou devant la particule, et dont la fluorescence émise est mesurée. Cette hypothèse apporte un léger biais car on pressent qu'en fin d'expérimentation, la saccharification suit toujours son cours, bien que fortement ralentie. Dans le cas d'un fragment totalement digeste, les enzymes bloquées sont libérées par la disparition totale du fragment, et la valeur d'intensité de fluorescence d'enzyme converge simplement vers l'intensité locale du fond enzymatique.

Pour représenter de manière plus imagée les parts non utiles (adsorption non réversible et enzymes libres du milieu par transparence/disparition de la particule de biomasse) et dynamique (fraction des enzymes qui s'adsorbent et se désorbent) au cours du temps, on représente de nouveau un profil quelconque de fluorescence d'enzyme mesuré sur un tissu digeste (l'enveloppe de la Figure 148 de gauche).

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

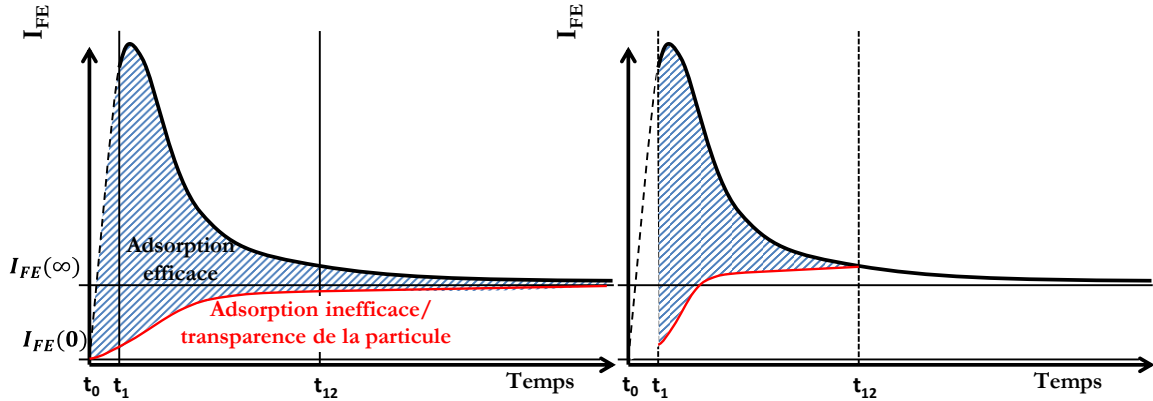


Figure 148 : Représentation schématique de la part de la fluorescence d'enzyme en dissociant la fraction des enzymes qui participent à l'hydrolyse (zone hachurée) de celle dont les enzymes ne participent pas à la saccharification, compte-tenu de l'hypothèse 1 (à gauche), et des hypothèses 1, 2, et 3 (à droite)

La fluorescence des enzymes non efficaces est tracée sous le profil total, en rouge. Ce fond statique augmente tout au long de l'hydrolyse, et de manière d'autant plus marquée que l'intensité totale de fluorescence est forte. A  $t_{\infty}$ , la fluorescence provient d'enzymes strictement improductives pour les particules partiellement digérées et restées opaques du point de vue de la fluorescence, et provient d'enzymes libres du milieu réactionnel pour les particules les plus digérées (et la valeur finale de l'intensité vaut la valeur du niveau de fond des enzymes à proximité). Pour les particules de digestibilité intermédiaire, les deux phénomènes contribuent à déterminer la valeur finale d'intensité de fluorescence d'enzyme. Pour une particule totalement indigeste, l'éventuelle adsorption non productive serait statique, donnant une fluorescence d'enzymes dynamiques quasi nulle.

L'aire hachurée représente l'intégrale de la fluorescence des enzymes efficaces, qui est la soustraction de l'aire du profil de fluorescence de toutes les enzymes et de l'aire du profil de fluorescence des enzymes non productives (qui ne participent pas à la saccharification).

La figure de droite montre la zone mesurée réellement compte tenu du temps d'expérimentation et de l'hypothèse 4 présentée ci-dessus, ce qui illustre le biais qui peut en découler.

### iv Expression du travail potentiel d'hydrolyse des enzymes productives

Par intégration de l'Équation (18), il vient :

$$I_{FE_{stat}}(t) = K \int_{t_0}^t I_{FE}(t) \cdot dt \approx K \int_{t_1}^t I_{FE}(t) \cdot dt \quad \text{Équation (19)}$$

(hypothèse 2)

Les mesures étant discrètes, cela revient à écrire :

$$I_{FE_{stat}}(t_i) = K \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j)(t_j - t_{j-1}) = K \times i \times \Delta t \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j) \quad \text{Équation (20)}$$

où  $t_i$  est le temps à la  $i$ -ième acquisition ( $i \in \llbracket 1; 12 \rrbracket$ ), et  $\Delta t$  le pas e temps entre deux analyses (environ 12 min et 30 s). Par ailleurs, on a supposé par l'hypothèse 3 :

$$I_{FE_{dynamique}}(t_{12}) \approx 0 \quad \text{Équation (21)}$$

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Donc, d'après l'Équation (18) et l'Équation (20),

$$K = \frac{I_{FE}(t_{12})}{\Delta t \times 12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \quad \text{Équation (22)}$$

L'intensité  $I_{FE_{dynam}}(t_i)$  qui représente la proportion d'enzymes à un instant  $t_i$  qui participent à l'hydrolyse enzymatique, vaut donc :

$$I_{FE_{dynam}}(t_i) = I_{FE}(t_i) - \frac{I_{FE}(t_{12}) \times i \times \sum_{j=1}^i I_{FE}(t_j)}{12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \quad \text{Équation (23)}$$

En conséquence, le cumul des intensités des enzymes dynamiques représente la "quantité" d'enzymes qui ont participé à l'hydrolyse depuis le début de l'hydrolyse jusqu'à un temps  $t_i$  :

$$\Sigma I_{dynam}(t_i) = \sum_{k=1}^i \left( I_{FE}(t_k) - \frac{I_{FE}(t_{12}) \times k \times \sum_{j=1}^k I_{FE}(t_j)}{12 \times \sum_{j=1}^{12} I_{FE}(t_j)} \right) \quad \text{Équation (24)}$$

Par définition de cette grandeur, le cumul  $\Sigma I_{dynam}(t_i)$  représente le travail potentiel que peuvent avoir réalisées les enzymes entre le début de l'hydrolyse et le temps  $t_i$  considéré. Cette grandeur dépend du pas de temps considéré. En revanche, elle ne présage pas de l'efficacité des enzymes.

### *v Relation entre le cumul des enzymes productives et l'amincissement des particules*

La valeur du cumul  $\Sigma I_{dynam}$  est supposée réaliser une bijection avec l'amincissement relatif  $A_r$  qui est la manifestation de la digestion de la matrice lignocellulosique. Afin de le vérifier, l'indice d'amincissement  $A_r$  est tracé en fonction du cumul  $\Sigma I_{dynam}$  au cours de l'hydrolyse enzymatique sur la Figure 149. La relation entre les deux est bien confirmée.

La déviation observée a lieu pour les derniers temps d'hydrolyse pour lesquels on considère que l'adsorption dynamique tombe à 0, alors que ce n'est pas rigoureusement le cas puisque la dégradation se poursuit en réalité encore un peu après la dernière mesure. Ce biais pourra être d'autant plus visible que le tissu qui fait l'objet de la mesure possède une cinétique de dégradation lente, et pour laquelle la dégradation après la fin de l'expérimentation aurait été significative, comparativement à la dégradation observée tout au long de l'expérimentation. A l'inverse, pour les échantillons les plus digestes, il est probable que seule la fin de la cinétique ne soit analysée. Dans ce cas, les déterminations de l'amincissement relatif  $A_r$  et du cumul  $\Sigma I_{dynam}$  sous-estimeront les valeurs réelles.

La pente mesurée sur ce graphe pourra alors être utilisée pour quantifier la facilité des enzymes à dégrader la matrice pour une dose d'enzymes donnée (commune pour les différentes mesures et échantillons considérés).

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

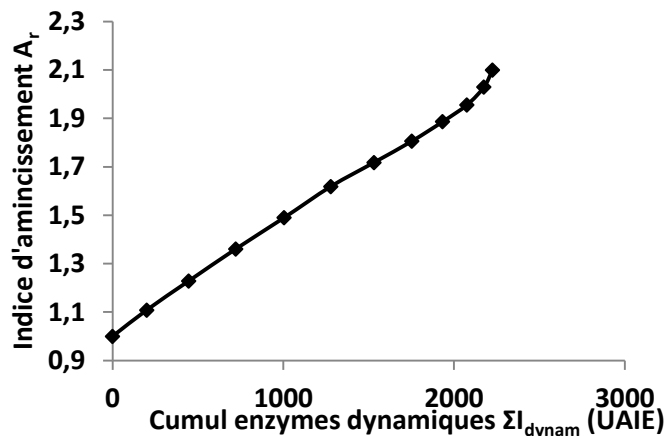


Figure 149 : Indice d'amincissement calculé à partir du canal d'imagerie visible en transmission, en fonction du cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  des intensités de fluorescence d'enzymes productives

Cette méthodologie d'exploitation des données a alors été réalisée sur chaque zone d'intérêt de chaque échantillon, ce qui permet de comparer le comportement des différentes zones/particules vis-à-vis de leur dégradation lors de l'hydrolyse enzymatique, ainsi que de comparer les différents échantillons.

### i. L'analyse du substrat peu prétraité

On considère les séries temporelles d'images mosaïques de l'échantillon A020C, prétraité à 100 °C pendant 20 min, afin d'étudier les évolutions au cours de l'hydrolyse enzymatique. Cet échantillon s'apparente à de la paille native, tant les tissus sont reconnaissables et peu altérés. De ce fait, l'analyse des tissus y est plus poussée que pour les autres échantillons, produits à plus haute sévérité.

#### i Réactivité et dégradation des tissus

Dans un premier temps, on s'assure de la cohérence des mesures faites par type de tissu, en comparant pour chacun d'entre eux le tracé des différents profils qui leur sont attribués, canal par canal. Le collenchyme, le phloème et le parenchyme xylémien, sortent de ce cadre puisque 1 à 2 profils ont pu être mesurés, par la faible occurrence de ces tissus sous une forme observée de bonne qualité visuelle (absence de bulle ou autre artefact, zone bien nette, identification sûre, particule immobile). Afin de pouvoir comparer les profils des différents tissus, une même échelle est choisie pour tous les tissus, dépendamment du canal d'observation et de l'échantillon considéré. Les graphes qui présentent l'amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul des intensités des enzymes productives  $\Sigma I_{\text{dynam}}$ , eux, utilisent des échelles propres à chaque tissu, pour une meilleure représentation.

#### Le parenchyme lignifié

Le parenchyme lignifié est l'un des tissus les plus abondants de la paille de blé. Les différents profils obtenus dans les 3 canaux sont indiqués dans la Figure 150. L'image de la figure montre un exemple de délimitation pour la mesure d'un des profils. Pour ce qui est de l'affinité enzymatique (canal 1), elle est faible (30 à 100 UAIE) et stable au cours de l'hydrolyse. La fluorescence des parois est assez intense (45 à 130 UAIP) comparativement à d'autres tissus, mais les valeurs sont assez variables car elles dépendent de la mesure (en coupe transversale ou longitudinale). Pour ce tissu, aucun amincissement particulier n'est mesuré sur le canal 3 de l'image en transmission.

Ces résultats indiquent que ce tissu est indigeste à ce stade de sévérité de prétraitement, malgré une très légère adsorption des enzymes au niveau de ce tissu.



## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

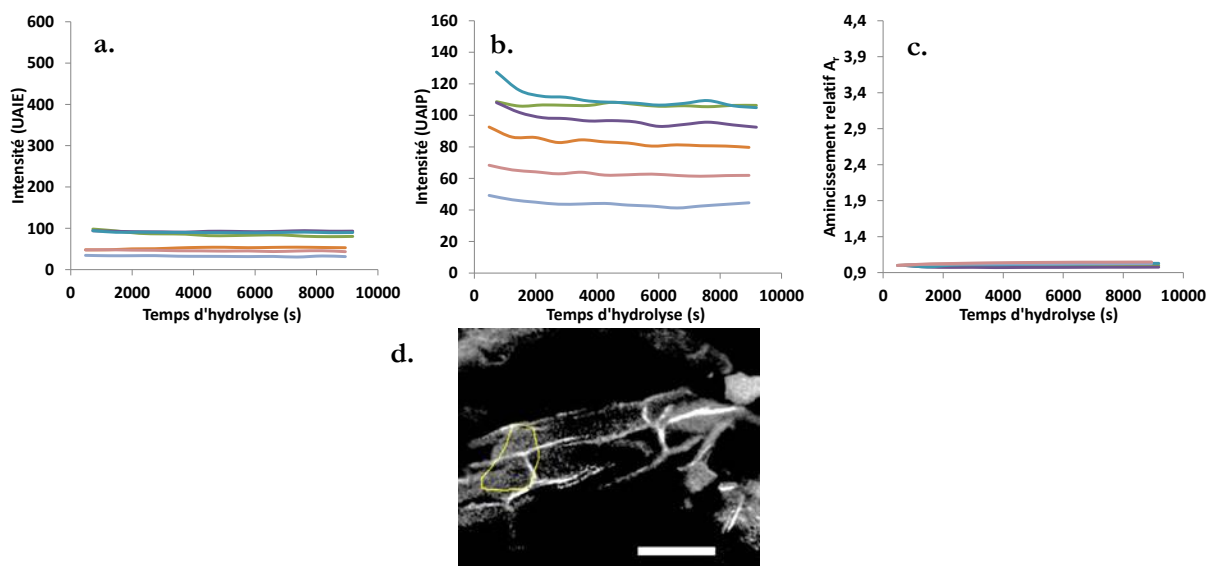


Figure 150 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones de parenchyme lignifié, observées en coupes transversales et longitudinales, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Image présentant un exemple de délimitation de parenchyme lignifié en coupe longitudinale, imagé ici en fluorescence de paroi. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

La Figure 151 qui montre l'évolution de l'amincissement relatif (avec une échelle de représentation plus adaptée) en fonction du cumul des enzymes productives  $\Sigma I_{\text{dynam}}$ , confirme d'une part que l'amincissement n'est pas significatif, et d'autre part que le travail potentiel des enzymes est faible ( $\Sigma I_{\text{dynam}}=700$  UAIE au mieux). La valeur  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  est d'ailleurs certainement surestimée par le fait que la phase transitoire d'adsorption (aussi faible soit-elle) au tout début de l'hydrolyse enzymatique ne peut pas être prise en compte. En effet, dans un cas idéal,  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  devrait être nulle pour une particule sans aucune digestibilité.

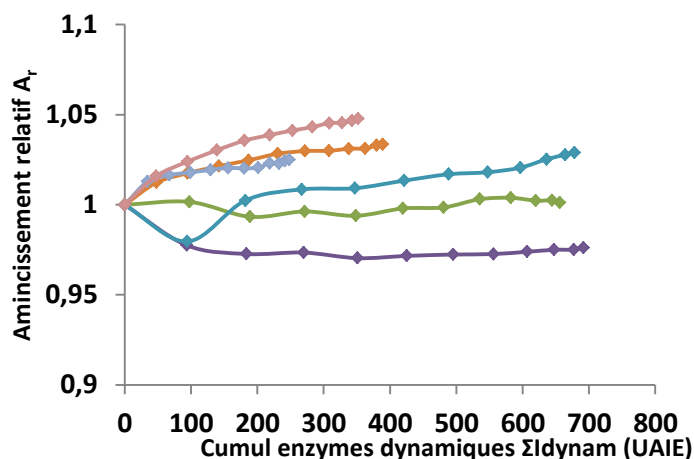


Figure 151 : Amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul des enzymes productives  $\Sigma I_{\text{dynam}}$ , pour du parenchyme lignifié

### Le sclérenchyme

Le sclérenchyme est un autre tissu majoritaire de la paille de blé. Les profils de sclérenchyme sont plus homogènes que pour le parenchyme lignifié, comme l'atteste la Figure 152. On constate que l'affinité des enzymes pour ce substrat est très faible (30 à 50 UAIE), et qu'elle n'évolue pas au cours du temps. La fluorescence résiduelle des parois est significative (50 à 110 UAIP). L'amincissement semble quant à lui, inexistant.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

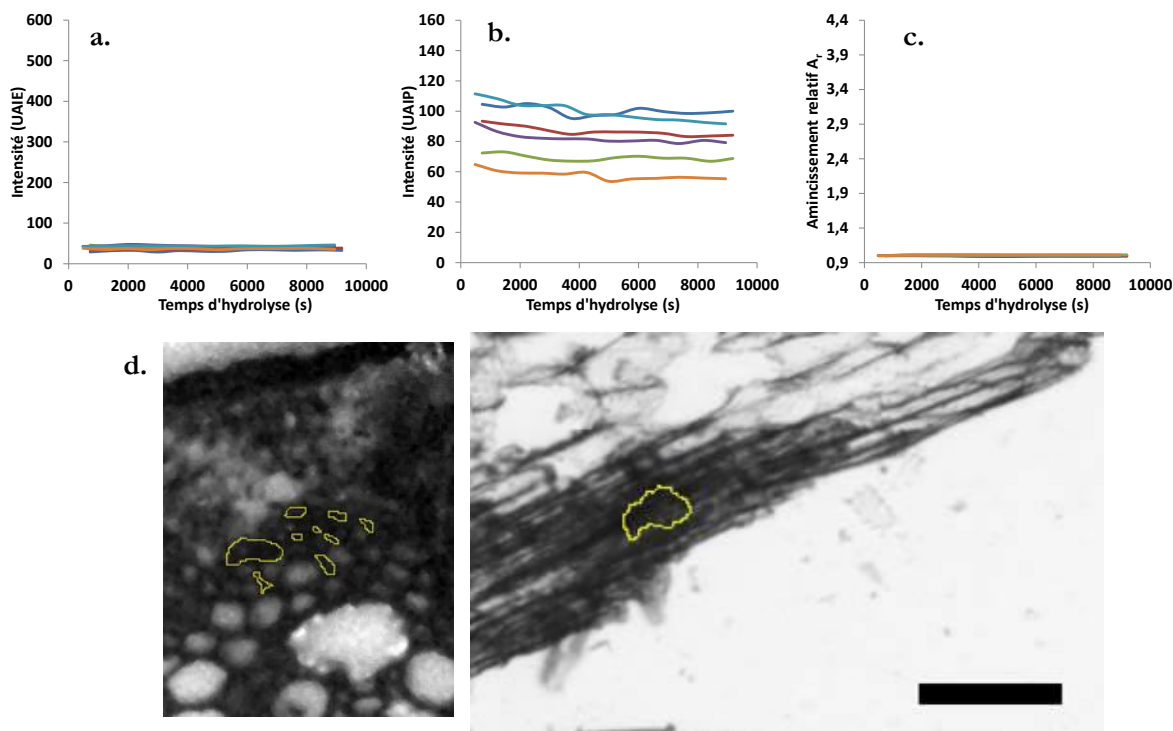


Figure 152 : a, b, c, et d : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones de sclérenchymes, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Deux exemple de sclérenchymes délimités pour la mesure des profils, l'un en coupe transversale et en fluorescence d'enzyme, et l'autre en coupe longitudinale, par imagerie en transmission. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

Comme pour ce qui était du parenchyme lignifié, l'amincissement est inexistant (le signal en transmission semble par ailleurs plus stable), et le cumul des enzymes est très faible ( $\Sigma I_{\text{dynam}} = 330$  UAIE au mieux), comme l'indique la Figure 153. Pour les mêmes raisons que pour le parenchyme lignifié,  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  est d'ailleurs probablement surestimé.

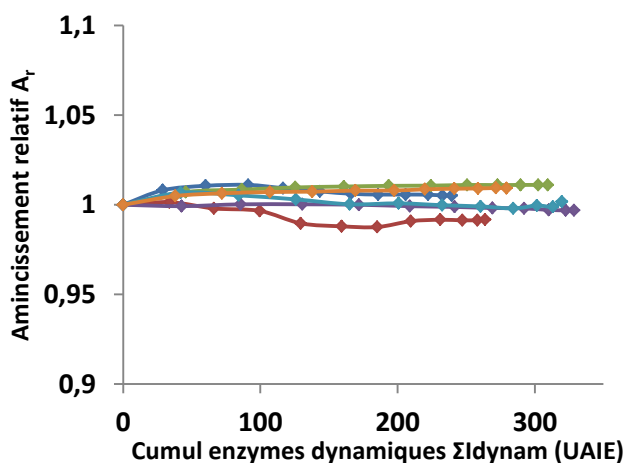


Figure 153 : Amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  des enzymes productives, pour du sclérenchyme

### Parenchymes non lignifiés

Les parenchymes non lignifiés sont beaucoup moins répandus que le sclérenchyme et le parenchyme lignifié. Ils sont surtout présents dans les parties immatures de la tige de blé (tiges jeunes ou partie sommitale par exemple, sous forme de moelle), dans les feuilles (mésophylle), et dans les faisceaux vasculaires (parenchyme xylémien). L'identification précise du type de parenchyme non lignifié est le plus souvent impossible, car ces tissus fragiles sont retrouvés le plus souvent seuls, et sans structure

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

reconnaissable. L'hétérogénéité des profils obtenus (Figure 154a) confirme l'origine diverse des tissus. Ils ont cependant plusieurs points communs. D'abord, ils présentent tous une fluorescence d'enzyme très élevée (entre 130 et 600 UAIE), et donc une digestibilité particulièrement élevée, comme l'attestent les canaux 1 et 3 qui indiquent à la fois une forte dynamique d'adsorption-désorption en concomitance avec l'amincissement des particules. Plus précisément, on retrouve l'existence d'une première phase durant laquelle l'adsorption des enzymes est prépondérante. Après un maximum d'enzymes liées à la particule, la désorption domine ensuite progressivement. De plus, ces parenchymes ont une fluorescence de paroi faible (0 à 35 UAIP).

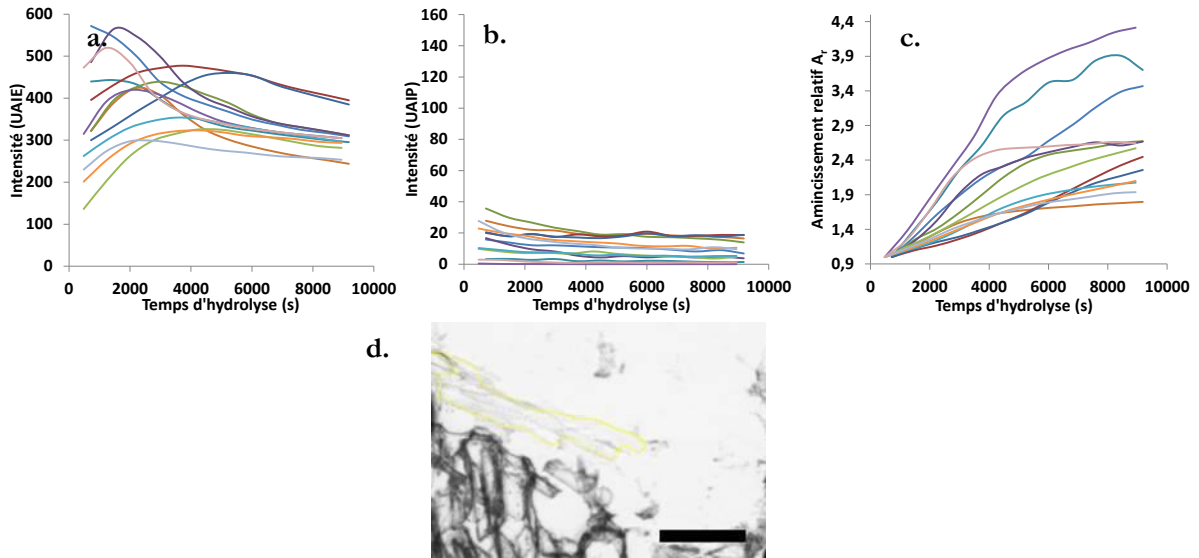


Figure 154 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents parenchymes non lignifiés, observées en coupes longitudinales, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Exemple de parenchyme non lignifié délimité, et vu en coupe longitudinale, par imagerie en transmission. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

L'amincissement est significatif (jusqu'à 4,2, Figure 155) de même que le cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  (jusqu'à 3500 UAIE). La forte pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  ( $3,7 \cdot 10^{-4}$  à  $1,2 \cdot 10^{-3}$  UAIE $^{-1}$ ) exprime que les enzymes sont particulièrement efficaces sur ces tissus.

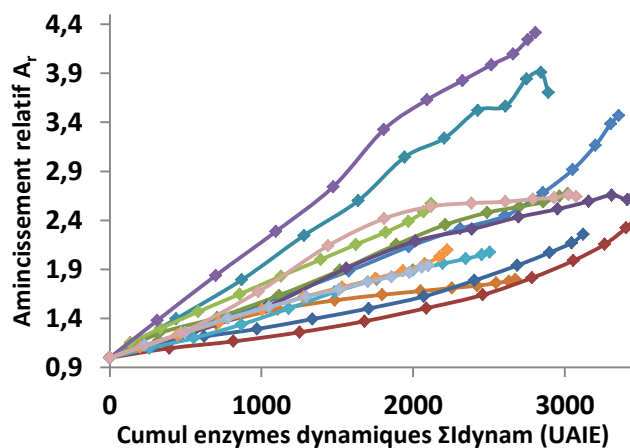


Figure 155 : Amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul des enzymes productives  $\Sigma I_{\text{dynam}}$ , pour du parenchyme non lignifié

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### Les épidermes

Les épidermes possèdent des profils très différents, comme l'illustre la Figure 156, tant en termes d'affinité vis-à-vis des enzymes, de fluorescence de paroi, que d'amincissement de la paroi. En effet on observe que 2 des 6 épidermes choisis ne présentent aucune affinité enzymatique ni amincissement progressif (Figure 156a et c, traits continus). Un de ces 2 profils est attribué de manière certaine à un épiderme de tige, car le brin de paille entier était conservé, ce qui permet de s'assurer que ces deux profils similaires sont des épidermes de tige. Cette récalcitrance observée en dépit d'une teneur en lignine réduite peut s'expliquer par la forte présence de silice et de composés cireux présents à ce niveau [94]. Ces épidermes indigestes présentent la plus faible fluorescence de paroi (0 à 15 UAIP), comparativement aux autres profils d'épidermes considérés (10 à 65 UAIP). Les autres épidermes (par conséquent, des épidermes de feuille en toute logique) possèdent une fluorescence d'enzymes plus intense et qui augmente au cours du temps, signe qu'il y a une adsorption de plus en plus intense sur la surface de ces tissus, puis finit par stagner voire diminuer. Cela s'accompagne d'ailleurs d'un léger amincissement de la paroi au niveau de l'image en transmission. On montre une image en exemple pour chacun des trois épidermes rencontrés (Figure 156d).

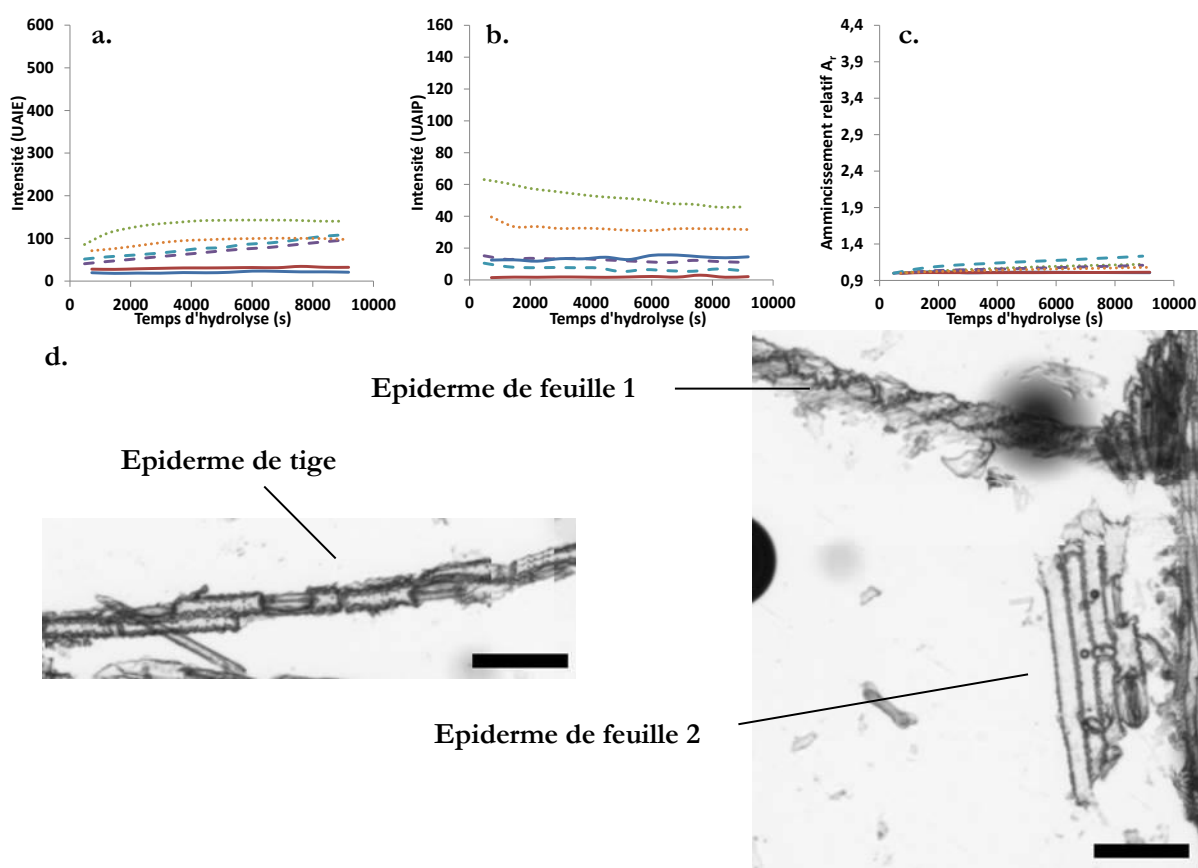


Figure 156 : a, b, et c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différentes zones d'épidermes, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c). Les trois types d'épidermes identifiés sont indiqués en trait continu (épiderme de tige), tirets (épiderme de feuille, inférieur ou supérieur), et pointillés (épiderme de feuille supérieur ou inférieur) ; d : Images des trois types d'épidermes rencontrés. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

La Figure 157 confirme la présence suggérée de trois types d'épiderme : un épiderme de tige non digeste (cumul enzymatique nul, pas d'amincissement), un premier type d'épiderme (de feuille *a priori*) pour lequel le travail potentiel des enzymes est plutôt significatif (le cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  atteint 550 UAIE), mais dont l'amincissement associé est très modéré (jusqu'à 1,1), et un deuxième type d'épiderme (de feuille *a priori*) pour lequel le travail potentiel des enzymes est plus faible (le cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  est de l'ordre de 460 UAIE), mais s'accompagne d'un amincissement plus conséquent (jusqu'à 1,25). Au niveau des pentes, on a donc dans le premier cas une pente faible ( $1.10^{-4}$  UAIE $^{-1}$ ), et dans un second cas, une pente plus élevée (2,2 et

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

$3,9 \cdot 10^{-4} \text{ UAIE}^{-1}$ ), qui exprime que l'efficacité des enzymes à l'hydrolyse est meilleure pour ce type d'épiderme. Les cinétiques très lentes de saccharification font que l'on néglige probablement une part conséquente de la dégradation qui se serait poursuivie après la fin de l'expérimentation. D'ailleurs on remarque l'augmentation de la pente sur la Figure 157 pour les dernières mesures, qui témoigne de ce biais.

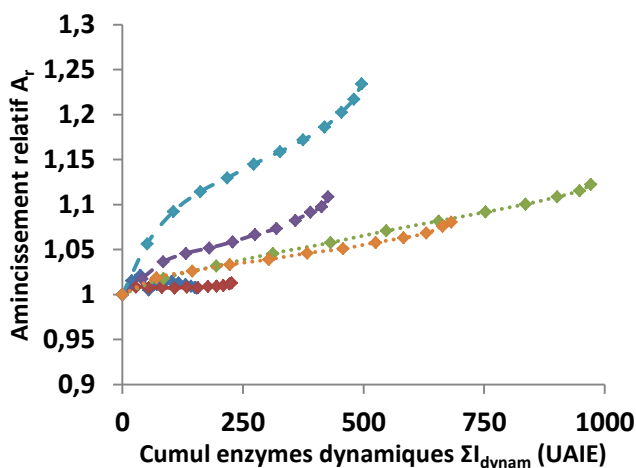


Figure 157 : Amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul le cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  de l'intensité de fluorescence des enzymes productives, pour les différents épidermes

En conclusion, le comportement de l'épiderme en hydrolyse enzymatique semble donc être dépendant de son origine au niveau du plant de blé. Des trois types de profil mesurés, seul l'épiderme de tige a pu être détecté comme tel, par sa localisation au niveau de la tige de blé. Il est totalement indigeste et est l'épiderme le moins fluorescent. L'épiderme présentant la plus forte affinité enzymatique est aussi celui qui présente la plus forte fluorescence de paroi. Ceci est particulièrement vrai au niveau des stomates (indépendamment de la feuille ou de la tige) pour lesquelles, les cellules de garde présentent une fluorescence de paroi et une affinité enzymatique légèrement plus élevée que pour le reste de l'épiderme qui l'entoure (voir la Figure 158). Pour des substrats particulièrement peu prétraités comme celui-ci, ces ouvertures vers les tissus intérieurs pourraient ainsi jouer un rôle léger dans la cinétique de saccharification en rendant les tissus internes accessibles localement. Par ailleurs, l'épiderme de feuille semble être le seul tissu pour lequel on observe à la fois une fluorescence de paroi non nulle et une digestibilité au moins partielle, notamment au niveau des cellules de garde des stomates. L'observation de la présence d'acides hydroxycinnamiques au niveau des stomates a déjà été vue au microscope à fluorescence UV-VIS (Annexes 5).

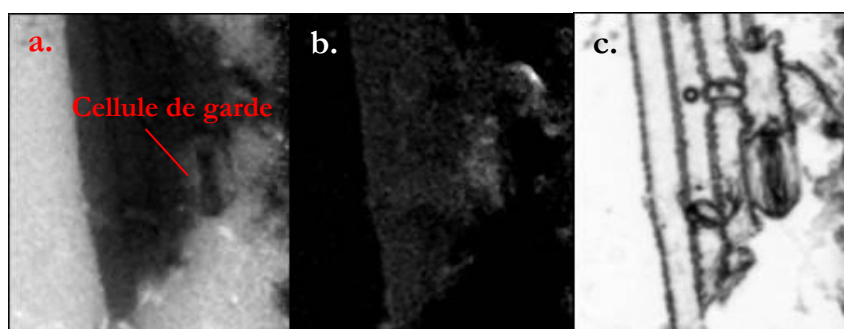


Figure 158 : Images d'un épiderme réactif au niveau d'un stomate. a : fluorescence d'enzyme ; b : fluorescence de paroi ; et c : imagerie de transmission

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### Tissus minoritaires : collenchyme, parenchyme xylémien, phloème

Quelques tissus ont été retrouvés sans avoir pu faire l'objet d'un nombre satisfaisant de mesures de qualité. Il s'agit du collenchyme, du parenchyme xylémien (non lignifié, présent dans le faisceau vasculaire), et du phloème (idem). Les résultats présentés ci-dessous sont donc à considérer avec réserve.

Pour l'unique profil de collenchyme (Figure 159, tirets bleus), une affinité enzymatique est présente. L'amincissement relatif semble quant à lui très faible (1,06) par rapport à d'autres tissus.

Pour le parenchyme xylémien, les 2 profils de mesure (traits continus en vert et rouge), indiquent que ce tissu est quasiment dégradé dès le début de l'observation, puisque le pic d'adsorption semble déjà avoir été passé. Ce tissu peu fluorescent au niveau de ses parois s'amincit significativement au cours de l'hydrolyse, bien qu'au moment de l'observation l'avancement de la saccharification de ce tissu soit bien avancé. Cela témoigne du caractère fortement accessible de la cellulose qui le constitue.

Le phloème (trait noir) se comporte comme le parenchyme xylémien : ce tissu est quasiment dégradé dès le début de l'observation. Cet échantillon est donc très digeste, d'une magnitude similaire à celle observée pour le parenchyme xylémien.

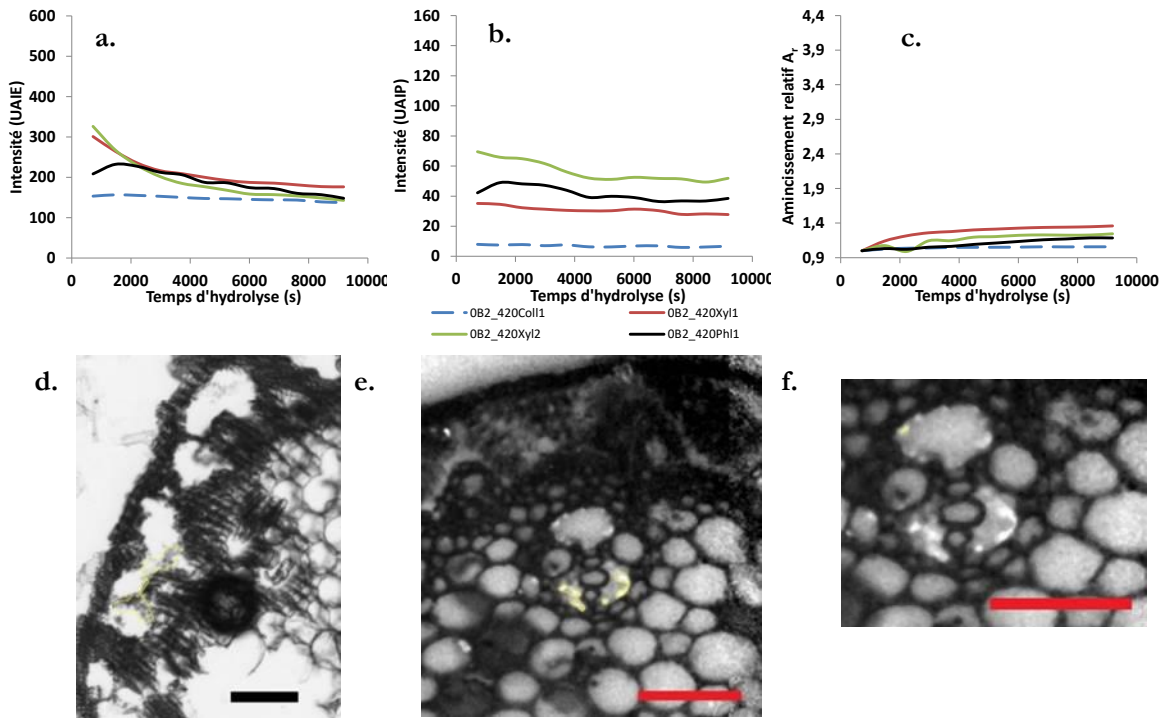


Figure 159 : a, b, c : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de collenchyme, parenchyme xylémien, et phloème, et dans les trois canaux d'acquisition : fluorescence d'enzyme (a), fluorescence de paroi (b), et imagerie de type fond clair (c) ; d : Collenchyme en coupe transversale, imagé en transmission ; e : Parenchyme xylémien en coupe transversale avec sa délimitation utilisée. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

La Figure 160 montre la relation liant l'amincissement relatif du tissu avec le cumul  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  des enzymes productives. Le collenchyme semble être le tissu pour lequel l'amincissement est le plus modéré, et également le tissu pour lequel les enzymes actives sont les moins présentes. Par ailleurs, pour le parenchyme xylémien et le phloème, la majorité de la dégradation a visiblement eu lieu avant le premier temps de mesure. De ce fait, on sous-estime très probablement la valeur de l'amincissement relatif réel. Donner la valeur de la pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  ne serait donc pas informatif.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

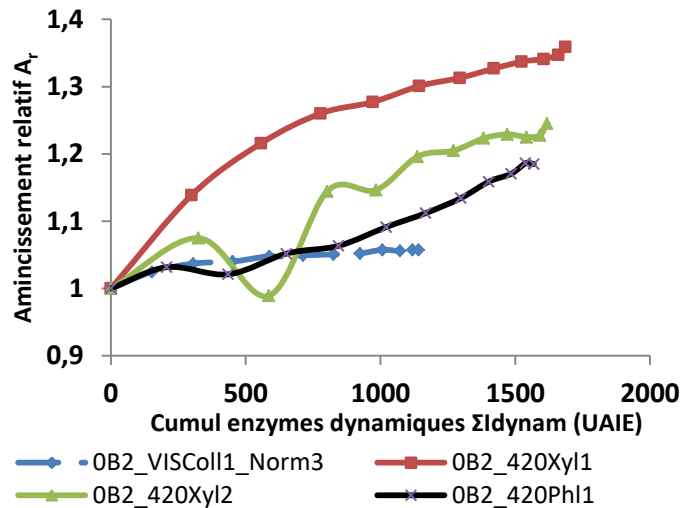


Figure 160 : Aminçissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul le cumul  $\Sigma I_{dynam}$  des enzymes productives, pour le collenchyme, parenchyme le xylémien, et le phloème

### ii Comparaison de la digestibilité des différents tissus présents dans l'échantillon faiblement prétraité

On montre en Figure 161 les graphiques d'intérêts (fluorescence d'enzyme et aminçissement relatif en fonction du cumul enzymatique  $\Sigma I_{dynam}$ ), pour les profils moyens des tissus les plus présents, à savoir : le parenchyme lignifié, le sclérenchyme, le parenchyme non lignifié, et les épidermes. Les valeurs de  $\Sigma I_{dynam}$  ont été déterminées à partir des profils de fluorescence moyens de chaque tissu.

Les différents tissus présentent de forts contrastes en termes d'affinité enzymatique, d'aminçissement relatif ( $A_r$ ) au cours du temps, et d'aminçissement rapporté à l'adsorption d'enzymes productive (i.e. la pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{dynam}$ ). Pour pouvoir comparer la digestibilité des tissus entre eux, on s'appuie notamment sur l'aminçissement relatif  $A_r$  provoqué pour un travail donné par les enzymes productives, c'est-à-dire la pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{dynam}$  :

Les parenchymes non lignifiés sont ceux qui présentent les pentes les plus fortes (moyenne à  $5,8 \cdot 10^{-4}$  UAIE<sup>-1</sup>), suivis par les épidermes de feuilles ( $1,6 \cdot 10^{-4}$  UAIE<sup>-1</sup>), et enfin les tissus indigestes (épiderme de tige, parenchyme, et sclérenchyme) pour lesquels la pente est nulle. Pour ce qui est des tissus minoritaires, la digestion significative du phloème et du parenchyme xylémien dès la première acquisition, laisse penser que la pente réelle serait de l'ordre de celles des parenchymes non lignifiés (ou même plus élevée, vu l'avancée de la digestion).

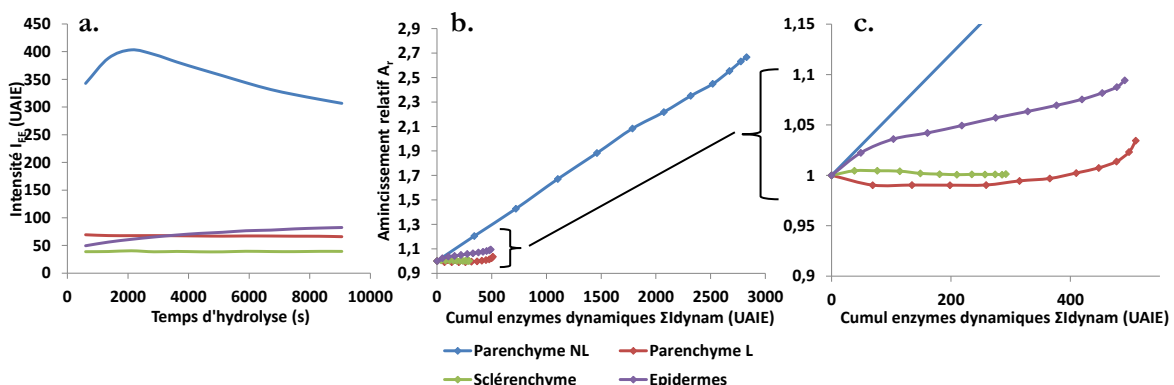


Figure 161 : a et b : Profils temporels moyens de parenchymes non lignifiés (bleu), parenchyme lignifié (rouge), sclérenchyme (vert), et des épidermes, en fluorescence d'enzyme (a) et d'aminçissement relatif en fonction du cumul des enzymes productives  $\Sigma I_{dynam}$  (b et c)

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Les caractéristiques extraites à partir des mesures précédentes sont résumées dans le Tableau 29. Ce classement est en accord avec la littérature [24,51,70,239,273], à savoir que le parenchyme lignifié et le sclérenchyme sont connus pour être récalcitrants, comparativement aux parenchymes lignifiés ou au phloème qui sont plus aisément hydrolysés.

Excepté le cas des épidermes, la récalcitrance des tissus est directement en lien avec la présence couplée de lignine et d'hémicelluloses dans un tissu. Ces tissus (parenchyme lignifié et sclérenchyme donc) sont les plus présents dans la paille de blé. Il est donc crucial de rendre accessible la cellulose qui y est présente, grâce à des prétraitements un peu plus intenses par exemple, qui hydrolysent les hémicelluloses et forcent la migration et le regroupement de la lignine en zones riches et spatialement distinctes des zones cellulosiques qui sont restées à leur place dans la paroi secondaire.

La fluorescence des parois observée pour un épiderme de feuille digeste, et la non digestibilité observée des épidermes de tiges non fluorescents, tendent à montrer ici que la présence ou l'absence des composés fluorescents n'est pas nécessairement le paramètre clefs qui explique le degré de récalcitrance d'un tissu. Par la suite, et à sévérité plus élevée, l'absence de fluorescence de paroi constatée y compris sur des échantillons lignifiés restés non digestes même après prétraitement confirme cette thèse.

Tableau 29 : Caractéristiques des différents tissus en termes de digestibilité et de fluorescence de paroi

	Digestibilité	Fluorescence de paroi
<b>Parenchyme lignifié</b>	Aucune à très faible	Forte : 45 à 130 UAIP
<b>Sclérenchyme</b>	Aucune	Assez forte : 55 à 110 UAIP
<b>Epiderme de tige</b>	Aucune	Très faible : 1 à 15 UAIP
<b>Epiderme de feuille 1</b>	Intermédiaire	Très faible : 5 à 15 UAIP
<b>Epiderme de feuille 2</b>	Intermédiaire	Intermédiaire : 35 à 65 UAIP
<b>Collenchyme</b>	Intermédiaire	Très faible : ~ 8 UAIP
<b>Parenchyme xylémien</b>	Excellente	Intermédiaire : 30 à 70 UAIP
<b>Phloème</b>	Excellente	Intermédiaire : ~40 UAIP
<b>Parenchymes non lignifiés</b>	Bonne à excellente	Très faible : 0 à 35 UAIP

En résumé, seuls **les tissus non lignifiés sont digérés, et tous les tissus lignifiés restent intacts**. Les épidermes qui représentent une part négligeable de la biomasse, présentent une digestibilité intermédiaire. De ce fait, le rendement en glucose mesuré à cette faible sévérité de prétraitement ne serait fonction que de la proportion que représentent ces tissus non lignifiés. C'est d'ailleurs ce que confirme une étude secondaire présentée en Annexe 6, qui a permis d'estimer la proportion que représente ces tissus non lignifiés dans la paille de blé, à partir d'analyses d'images d'une coupe transversale de paille de blé avant et après hydrolyse enzymatique, pour laquelle seuls les tissus non lignifiés ont été hydrolysés.

### j. L'analyse des substrats prétraités à plus forte sévérité

On considère maintenant les échantillons C020C et D020C en reprenant la même trame analytique que pour le premier échantillon. Ces échantillons ont subi une température de prétraitement plus élevée (140 °C pour l'échantillon C020C et 160 °C pour l'échantillon D020C). L'état des tissus est plus altéré, et on retrouve en moins grand nombre les tissus digests qui ont été dispersés et possiblement partiellement hydrolysés. Les tissus minoritaires ne sont plus rencontrés, et ne font donc plus l'objet de mesures.

#### *i Les profils d'adsorption spécifiques des tissus considérés*

Peu d'informations peuvent être récupérées à partir de l'observation visuelle des images mosaïques, c'est pourquoi on s'intéresse de nouveau à une quantification de profils d'intensité pour des objets sélectionnés. Dans cette partie, et pour plus de clarté, seuls les résultats obtenus sur les tissus prépondérants seront



## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

reportés, à savoir le parenchyme lignifié, le sclérenchyme et les zones déstructurées. Les résultats obtenus sur les tissus minoritaires sont reportés en Annexe 7.

Le canal de la fluorescence des parois étant quasiment à 0 suite à l'altération des acides hydroxycinnamiques par le prétraitement, ce canal ne sera pas reporté. Les échelles utilisées pour représenter les profils sont les mêmes pour les différents tissus.

### Le parenchyme lignifié

Les parenchymes lignifiés sont constitués de **zones assez hétérogènes en termes d'affinité enzymatique** : sur un même parenchyme, dans le canal de la fluorescence des enzymes, certaines zones sont quasiment noires et donc sans enzymes adsorbées, et d'autres sont plus claires, indiquant une présence d'enzymes localisées. Il en est de même pour les sclérenchymes. Une illustration de ce phénomène est présentée pour ces deux tissus sur la Figure 162.

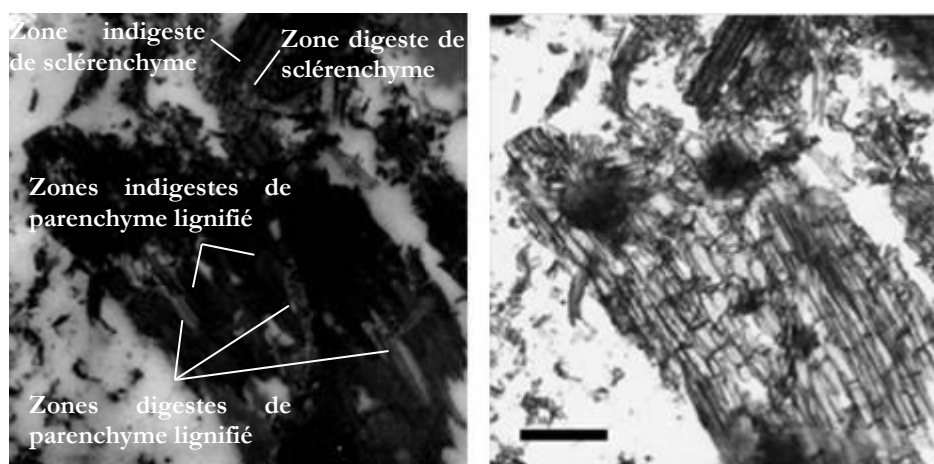


Figure 162 : Exemples d'hétérogénéités en termes d'affinité enzymatique, sur des fragments de parenchyme lignifié et de sclérenchyme, vues sur l'échantillon D020C. Observation en fluorescence d'enzymes (gauche) et en transmission (droite). Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$

Ainsi plutôt que de considérer des particules entières de parenchyme lignifié ce qui moyennerait un comportement, des mesures locales ont été réalisées en sélectionnant des régions en fonction des différences d'affinité trouvées. Ces disparités se remarquent bien sur la Figure 163a et b, où plusieurs profils assez distincts sont différenciés, de même que dans la représentation des amincissements relatifs  $A_r$  en fonction du cumul enzymatique  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  (Figure 163c). La pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  varie entre  $9,4 \cdot 10^{-5}$  et  $9,8 \cdot 10^{-4}$  UAIE<sup>-1</sup>.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

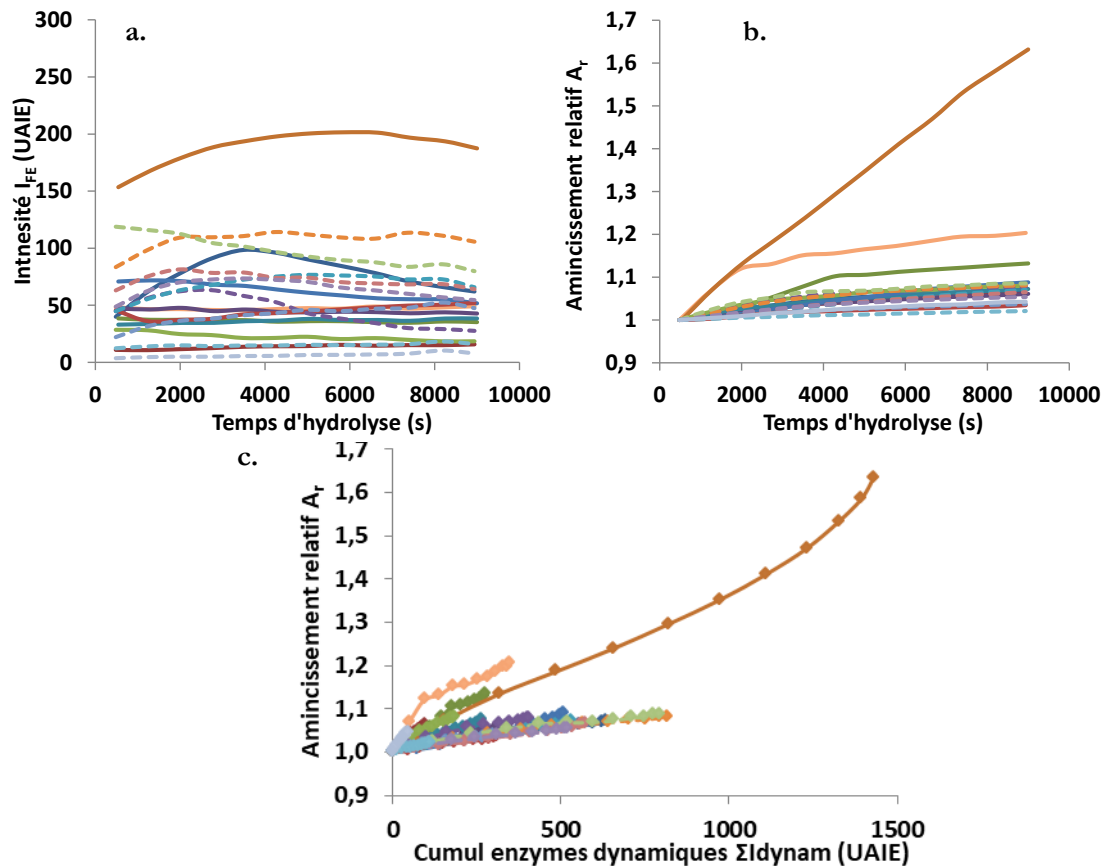


Figure 163 : a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité de différents fragments de parenchyme lignifié observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et amincissement en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des amincissements relatifs en fonction des sommes  $\Sigma I_{dynam}$  pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments de parenchyme lignifié de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des  $t_i$ , compris entre  $t_1$  et  $t_{12}$

### Sclérenchyme

A ces sévérités de prétraitement, le **sclérenchyme présente visiblement une affinité enzymatique faible mais hétérogène comme chez le parenchyme lignifié, contrairement à l'échantillon produit à faible sévérité**. En effet, un grand nombre de profils d'intensité de fluorescence (Figure 164a) sont autour de 10-30 UAIE, mais plusieurs autres profils sont au-dessus, et atteignent même 100 UAIE. Pour quelques-unes des mesures, on constate même la présence d'une légère phase d'adsorption suivie d'une légère phase de désorption. L'amincissement reste faible mais réel pour un certain nombre de mesures, à en juger par la Figure 164b. La Figure 164c qui montre l'amincissement relatif en fonction du cumul des enzymes productives, confirme que pour certaines zones de sclérenchymes, le tissu est dégradé : on observe à la fois un amincissement et une adsorption-désorption dynamique des enzymes. La pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{dynam}$  varie de 0 à  $4,9 \cdot 10^{-4}$  UAIE<sup>-1</sup>.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

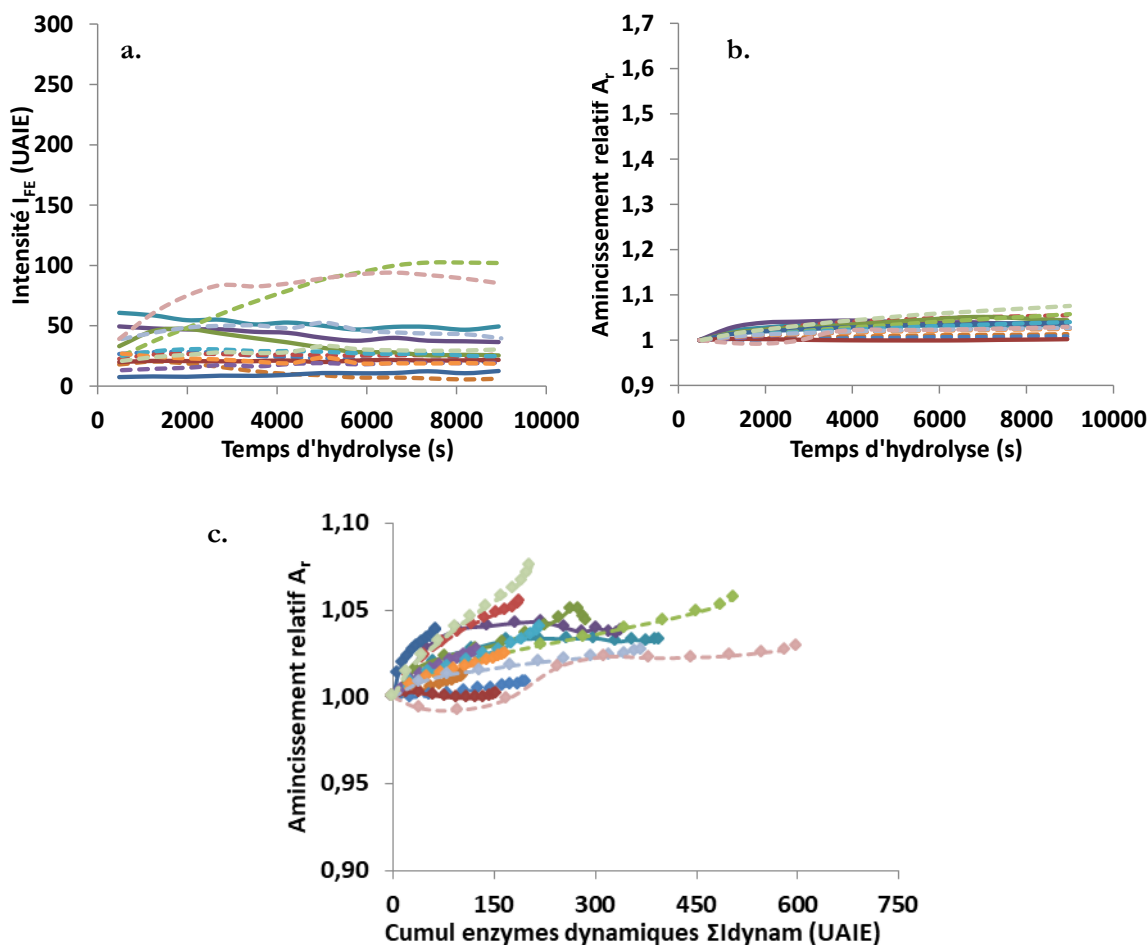


Figure 164 : a. et b. : Profils temporels d'intensité de différents fragments de sclérenchyme observés en coupes longitudinales, en fluorescence d'enzyme (a) et en amincissement relatif (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, les tirets concernent l'échantillon D020C ; c : Evolutions de l'amincissement relatif  $A_r$  en fonction de  $\Sigma I_{dynam}$  pour l'ensemble des mesures faites sur des fragments de sclérenchyme de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des  $t_i$ , compris entre  $t_1$  et  $t_{12}$

### Les zones déstructurées/non identifiées

Sur ces échantillons prétraités à 140 °C et 160 °C, des particules non identifiables en l'état sont présentes. Dans le cas de l'échantillon D020C, certaines de ces zones sont même totalement dépourvues de structures cellulaires (voir en préambule de l'étude, la Figure 141). Ces zones non définies pouvant représenter une proportion significative des échantillons observables sur les mosaïques, il paraissait intéressant de les étudier, en dépit de l'impossibilité de les rattacher à des tissus clairement identifiés.

D'après les profils en fluorescence d'enzymes et en transmission présentés sur la Figure 165, les enzymes s'adsorbent significativement (intensité de fluorescence 50 et 275 UAIE) et l'amincissement des tissus est observé (entre 1 et 1,3). Ces profils ont été mesurés non pas localement mais en moyennant toute la zone déstructurée considérée (voir Figure 165d). En se basant sur l'évolution de l'amincissement relatif  $A_r$  en fonction du cumul  $\Sigma I_{dynam}$  des enzymes productives, on constate que les comportements des différentes zones mesurées sont relativement homogènes, tout du moins au niveau de la pente, qui est comprise entre  $7,6 \cdot 10^{-5}$  et  $1,6 \cdot 10^{-4}$  UAIE<sup>-1</sup>, qui lie l'amincissement en fonction de la présence dynamique des enzymes, ce qui laisse penser que ces particules non identifiées sont relativement homogènes en termes de physicochimie à cette échelle. Ces particules possèdent donc une digestibilité certaine.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

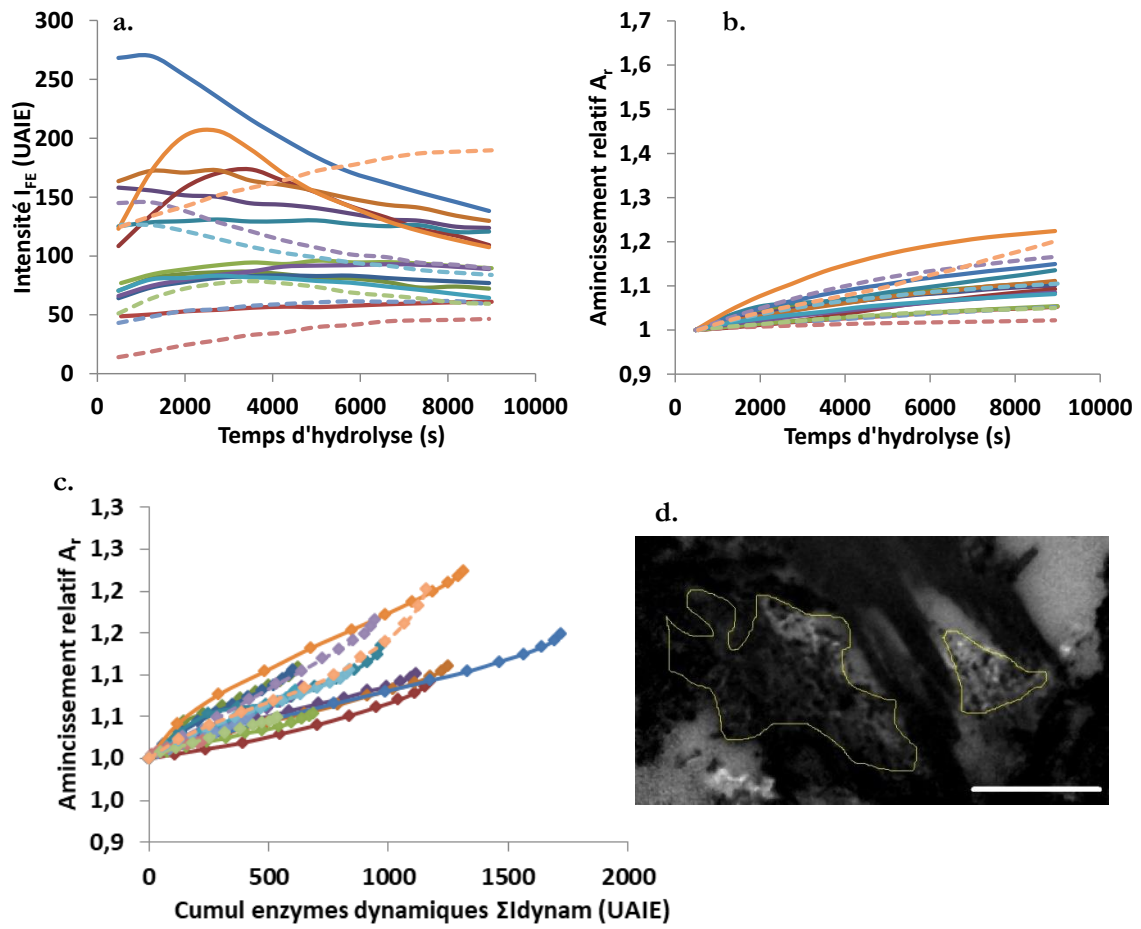


Figure 165 : a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité en des zones non identifiées, en fluorescence d'enzyme (a) et en image en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des amincissements relatifs  $A_r$ , en fonction des sommes  $\Sigma I_{\text{dynam}}$  pour l'ensemble des mesures faites sur des zones non identifiées de l'échantillon C020C (traits continus) et de l'échantillon D020C (tirets), et pour l'ensemble des  $t_i$ , compris entre  $t_1$  et  $t_{12}$  ; d. : Exemple de zones déstructurée, ici chez l'échantillon D020C, observée en fluorescence d'enzyme. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

A l'échelle de la dizaine de microns, ces particules sont assez hétérogènes pour ce qui est de l'adsorption des enzymes, comme on le voit sur la Figure 166.

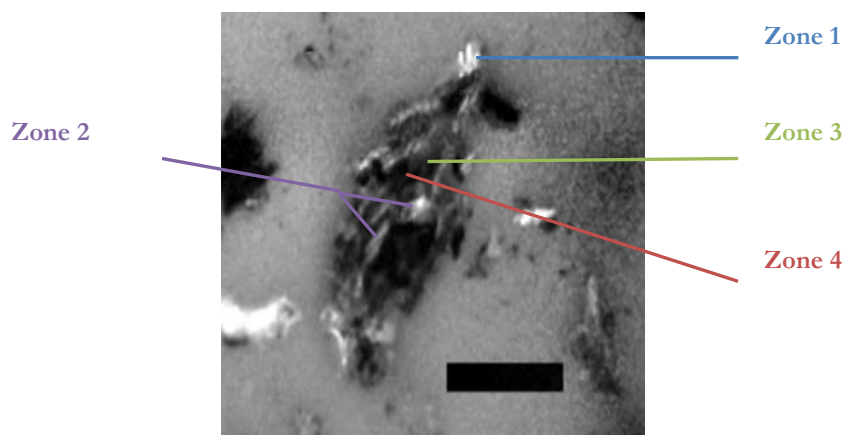


Figure 166 : Image en fluorescence d'enzyme de la particule étudiée en plusieurs zones. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

Cette hétérogénéité est soulignée sur la Figure 167 au niveau des profils d'intensité obtenus en différentes zones. Les 4 zones définies se distinguent par des affinités enzymatiques très contrastées en intensité, et

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

dans le temps. De plus, il est intéressant de constater sur la Figure 167c que l'efficacité de conversion semble plus grande lorsque l'affinité enzymatique est faible.

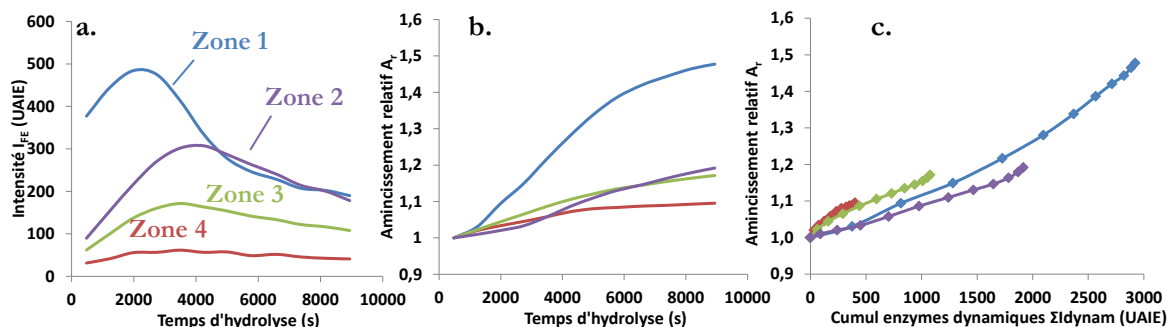


Figure 167 a. et b. : Profils temporels des différentes mesures d'intensité d'une des zones non identifiées, en fluorescence d'enzyme (a) et en image en transmission (b). Les traits continus concernent l'échantillon C020C, et les tirets concernent l'échantillon D020C ; c. : Évolutions des aminoissements relatifs en fonction des sommes  $\Sigma I_{dynam}$  pour l'ensemble des mesures faites et pour l'ensemble des  $t_b$ , compris entre  $t_1$  et  $t_{12}$

## k. Discussion : digestibilité des tissus, dépendamment des conditions de prétraitement

Nous avons vu précédemment que les tissus avaient des comportements différents vis-à-vis de l'adsorption/désorption des enzymes et de leur dégradation enzymatique, dépendamment de leur nature et de leur chimie. Il convient de s'intéresser maintenant à l'influence des conditions opératoires de prétraitement sur le comportement de ces tissus.

Les profils moyens d'intensité de fluorescence d'enzymes et d'amincissement relatif sont représentés sur la Figure 168 pour chaque type de tissus et pour les trois échantillons A020C, C020C et D020C. Ces profils ont été calculés en réalisant la moyenne des mesures sur un même type de tissu, pour chaque échantillon. Ces données permettent ainsi de comparer l'évolution moyenne de l'adsorption/désorption des enzymes et la dégradation dépendamment du tissu considéré et des conditions opératoires de prétraitement.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

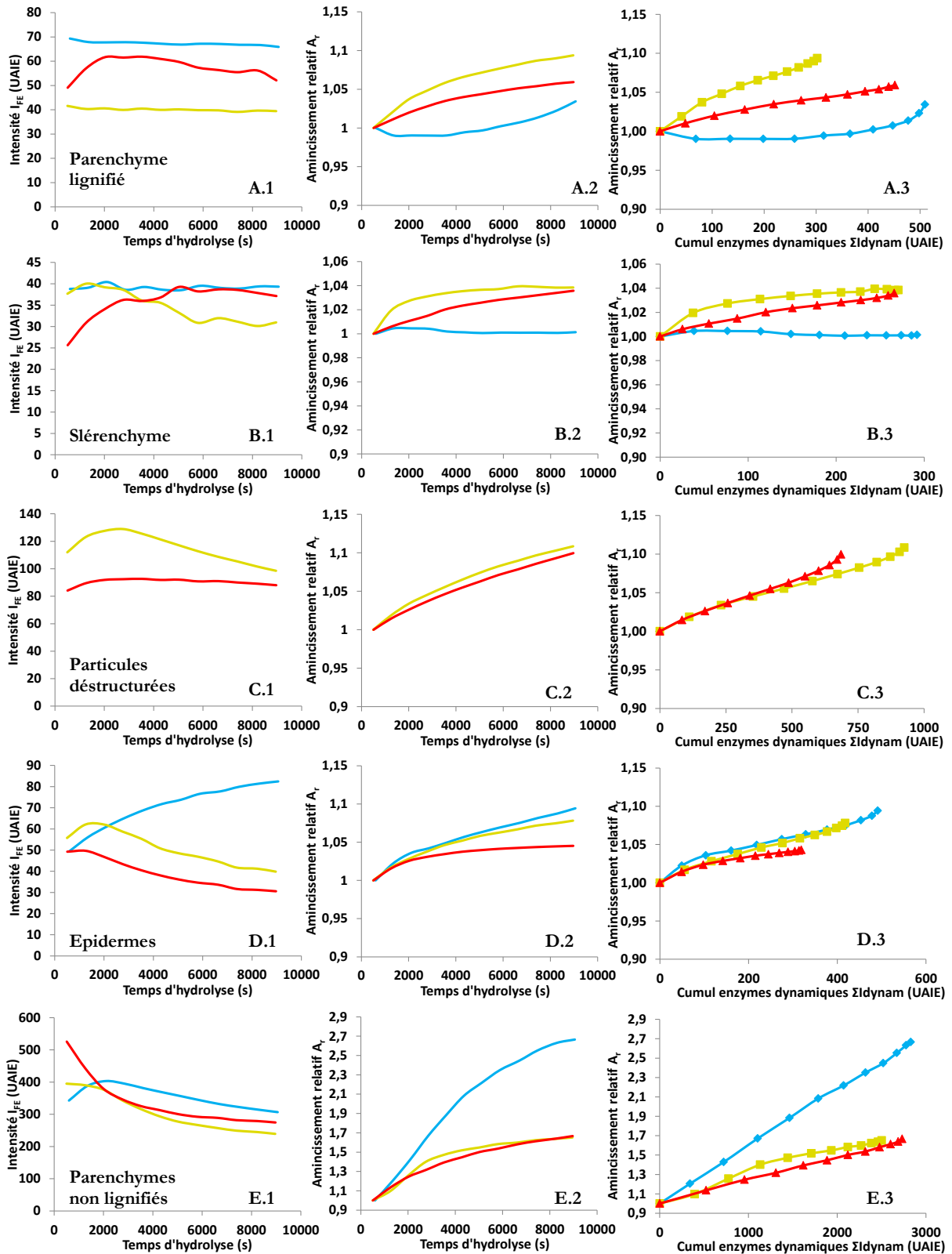


Figure 168 : A gauche : profils d'intensité de fluorescence d'enzyme moyenne (1), d'aminçissement relatif (2), et évolution de l'aminçissement relatif en fonction du cumul des enzymes participant à l'hydrolyse (3), pour le parenchyme lignifié (A), le sclérenchyme (B), les particules déstructurées/ indéfinies (C), les épidermes (D), et les parenchymes non lignifiés (E). Le courbes relatives à l'échantillon A020C sont représentées en bleu, celles relatives à l'échantillon C020C en jaune, et celles relatives à l'échantillon D020C en rouge

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### *i Effet du prétraitement sur la présence des tissus*

L'augmentation de la sévérité du prétraitement a un effet sur les tissus présents dans l'échantillon après prétraitement. En effet, les tissus cellulosiques (phloème, parenchymes non lignifiés) semblent de moins en moins abondants à mesure que la sévérité augmente, soit par hydrolyse partielle de ces tissus, soit par une dispersion plus fine qui les rend moins visibles. Nous avons pu constater que ces tissus cellulosiques sont très réactifs et sont hydrolysés aisément.

Par ailleurs, les prétraitements associés aux échantillons C020C et D020C ont aussi eu pour effet de rendre certaines zones non identifiables, sans structure cellulaire apparente. Ces zones sont très présentes et hétérogènes spatialement : certaines zones sont probablement ligneuses, sont très peu digestes, et d'autres au contraire sont extrêmement digestes (tant par l'affinité enzymatique que l'amincissement de ces zones au cours du temps observés sur les Figure 168 C1, C2 et C3) et plus transparentes, comme le serait un parenchyme non lignifié.

### *ii Effet du prétraitement sur la digestibilité moyenne des différents tissus*

En ce qui concerne la digestibilité des différents tissus, les résultats trouvés sont conformes à ceux trouvés dans la littérature [24,51,70,239,274]. Ainsi on confirme que les tissus les plus ligneux sont également les moins digestes : sclérenchyme, parenchyme lignifié. A l'inverse les tissus cellulosiques sont les plus digestes : tous les parenchymes non lignifiés.

Ces tendances restent globalement valables quel que soit le prétraitement effectué (voir Figure 169). Les différences de digestibilités sont directement en lien avec les affinités enzymatiques (niveau d'intensité de fluorescence des enzymes similaires) qui dépendent de l'état de lignification du tissu, qui découle directement de la nature du tissu et de la température de prétraitement.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

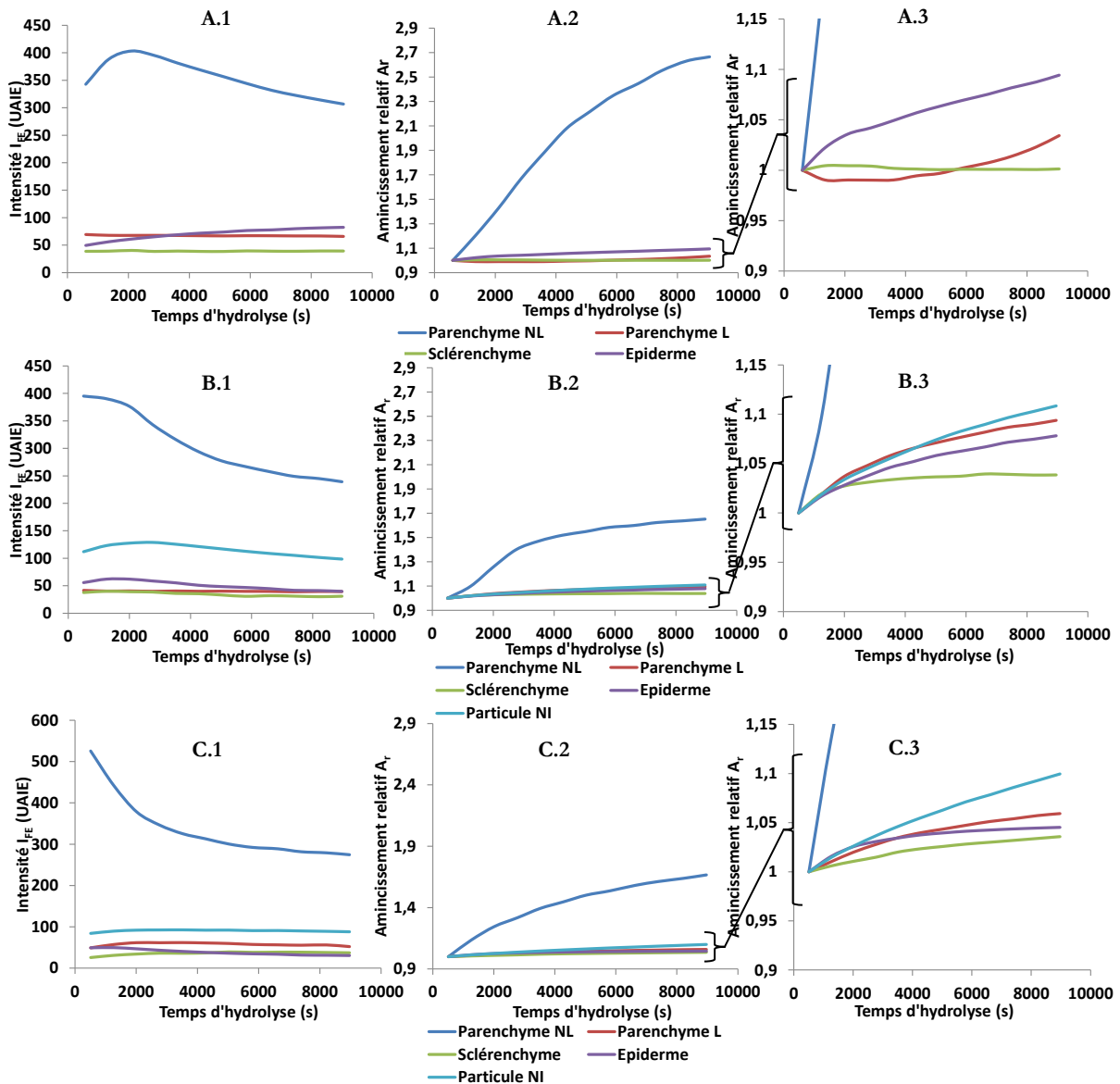


Figure 169 : Intensité de fluorescence d'enzyme (1) et amincissement relatif (2 et 3) pour les différents échantillons (A020C : A ; C020C : B ; et D020C : C), en fonction du temps, et pour tous les types de tissus

### iii Effet du prétraitement sur le taux d'hydrolyse des différents tissus

Les conditions de prétraitement semblent avoir une influence sur l'adsorption/désorption des enzymes sur les tissus, ainsi que sur l'ampleur de la dégradation des tissus

La comparaison des amincissements relatifs mesurés sur les tissus peu digests tels que le parenchyme lignifié et le sclérenchyme souligne une dégradation plus avancée des tissus en fin d'hydrolyse pour les échantillons prétraités à 140 et 160 °C (voir les Figure 168 A2, B2). Cependant, ce gain n'est pas homogène sur l'ensemble du tissu : parfois significatif avec une cinétique d'adsorption-désorption d'enzymes couplée à un amincissement, d'autres fois une affinité quasi-nulle sur toute la durée des expérimentations, et sans digestion observable.

L'amélioration de la digestibilité avec l'augmentation de la sévérité du prétraitement se retrouve aussi sur les tissus plus digests (voir les Figure 168 D1 et E1) pour lesquels la dégradation semble commencer avant même la première acquisition pour les échantillons C020C et D020C, dès l'introduction des enzymes, comme cela peut être observé sur les profils d'intensité de fluorescence d'enzymes Figure 168 D1 et E1. De plus, l'affinité enzymatique est aussi améliorée comme l'indiquent les intensités de



## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

fluorescence d'enzymes mesurées sur les parenchymes non lignifiés, distribuées entre 100 et 600 UAIE pour l'échantillon A020C et entre 200 et 830 UAIE pour les échantillons C020C et D020C.

### *iv Effet du prétraitement sur la cinétique d'hydrolyse des différents tissus*

Les évolutions relatives des intensités de fluorescence d'enzymes obtenues sur les différents types de tissus pour chaque échantillon sont reportées sur la Figure 172. Ces profils ont été présentés précédemment sur la Figure 168 mais cette nouvelle figure permet d'illustrer le temps pour lequel on observe le maximum de d'adsorption.

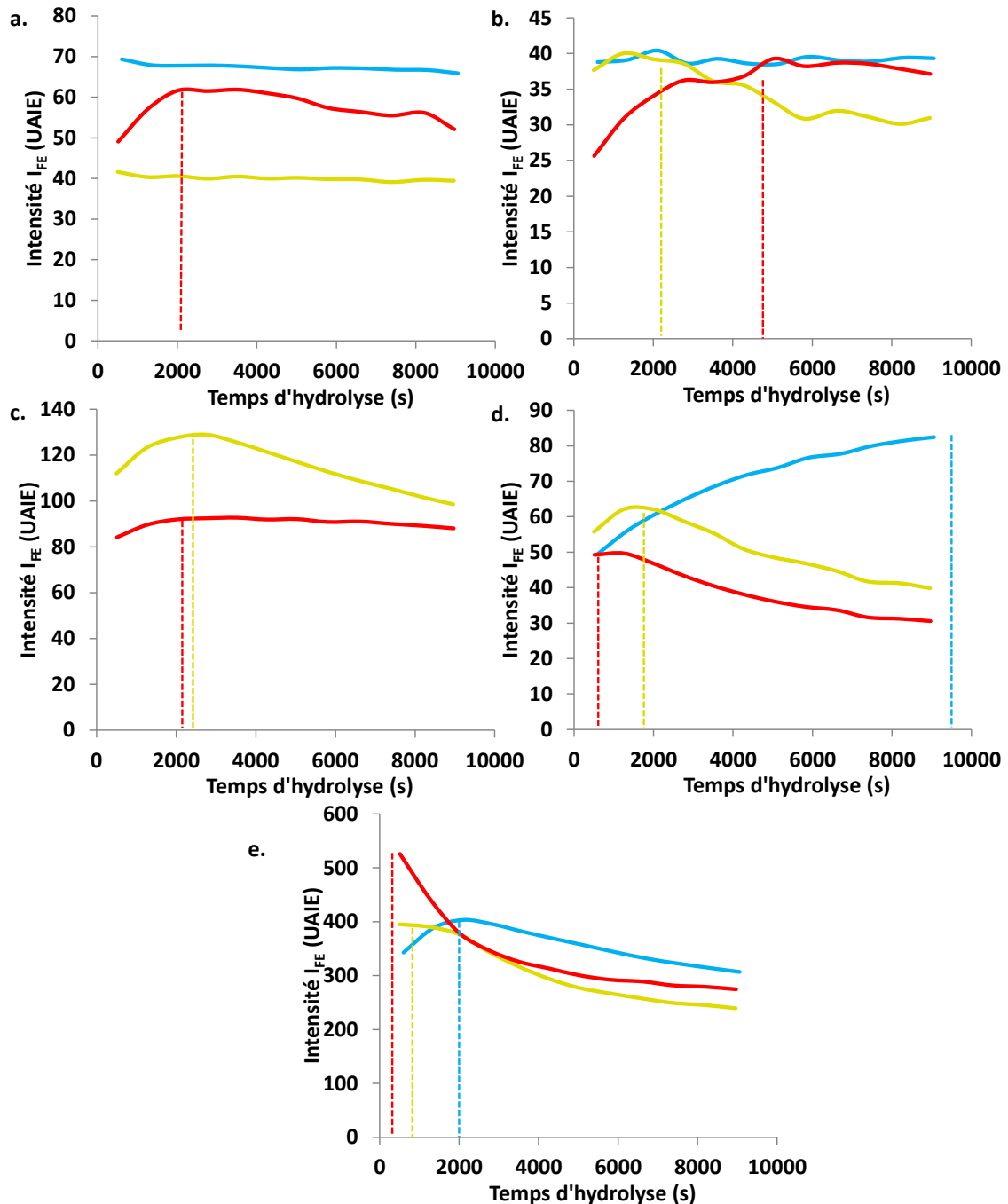


Figure 170 : Profils temporels moyens d'intensité de fluorescence d'enzymes des tissus trois échantillons de l'étude (A020C, bleu, C020C, jaune, D020C, rouge) : parenchyme lignifié (a), sclérenchyme (b), particules déstructurées/non identifiées (c), épidermes (d), et parenchymes non lignifiés (e)

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

Il apparaît que le **principal effet du prétraitement**, outre le fait d'améliorer légèrement l'affinité enzymatique et le taux de conversion des tissus, **est d'accélérer la cinétique d'hydrolyse enzymatique, c'est-à-dire la dynamique d'adsorption-désorption des enzymes**. En effet, le maximum d'intensité de fluorescence, marquant la fin de l'étape d'adsorption et le début de la phase de désorption des enzymes, semble se décaler la plupart du temps en fonction des conditions de prétraitement : plus la température de prétraitement augmente, plus ce maximum d'adsorption se décale vers les temps courts d'hydrolyse. C'est particulièrement le cas entre l'échantillon traité à 100 °C (échantillon A020C), comparativement aux échantillons traités à 140 et 160 °C (C020C et D020C) :

- Pour le parenchyme lignifié, le maximum d'adsorption a lieu vers 35 min chez l'échantillon D020C, alors qu'il n'a pas lieu (car adsorption totalement non productive et donc statique) chez l'échantillon A020C
- Pour le sclérenchyme, le cas est similaire : le maximum d'adsorption a lieu à 35 et 85 min pour les échantillons C020C et D020C, alors que le profil est parfaitement statique pour l'échantillon A020C
- Pour les épidermes, le maximum d'adsorption a lieu vers la 8<sup>ème</sup> minute pour l'échantillon D020C et vers 35 min pour l'échantillon C020C, alors que chez l'échantillon A020C, ce maximum a lieu vers 2h40, à la toute fin de l'expérimentation
- Pour les parenchymes non lignifiés, le maximum d'adsorption a lieu avant la première acquisition (8 min 30 s) pour l'échantillon D020C, vers 15 min pour l'échantillon C020C, et vers 35 min pour l'échantillon A020C

### *v Création d'hétérogénéités locales*

La simple considération des profils moyens de fluorescence et d'amincissement n'est pas pleinement satisfaisante par le fait que certains tissus (sclérenchyme et parenchymes) et particules déstructurées, présentent des hétérogénéités spatiales. L'observation des profils individuels des tissus lignifiés que sont le parenchyme lignifié ou le sclérenchyme ont permis de constater que l'augmentation de la sévérité de prétraitement semble créer :

- des zones qui deviennent partiellement digests et pour lesquelles une réelle phase d'adsorption puis de désorption est observée par la même occasion. Ce sont ces zones qui s'amincissent le plus, c'est-à-dire qui sont le plus dégradées (voir Figure 163). Ceci n'est pas observé pour les tissus lignifiés de l'échantillon A020C.
- des zones qui n'ont pas gagné en affinité enzymatique, et ne présentent pas de dégradation significative au cours du temps. Pour ces zones, le niveau de fluorescence de ces zones est même plus faible que dans le cas de l'échantillon moins prétraité. Dans le cas du parenchyme lignifié, les valeurs des intensités statiques de fluorescence d'enzymes (relatives aux enzymes non productives) varient entre 30 et 100 UAIE pour l'échantillon A020C, entre 3 et 50 UAIE pour les parenchymes lignifiés restés indigestes des échantillons C020C et D020C. Dans le cas du sclérenchyme, elles passent de 30-45 UAIE (constante au cours du temps) pour l'échantillon A020C, à 5-60 UAIE (constante au cours du temps), pour les échantillons C020C et D020C. Il semble donc qu'en moyenne, l'augmentation de la température de prétraitement permet de diminuer la quantité d'enzymes adsorbées sur des zones non digests (notamment les zones restées ligneuses), ce qui peut expliquer pourquoi les niveaux d'intensité des fonds d'enzymes (milieu réactionnel sans particule) sont plus élevés pour l'échantillon D020C (paragraphe VII.g.iii).

### *vi Conclusion*

Ainsi, loin d'avoir gommé les différences de digestibilité entre les différents tissus, les prétraitements à 140 et 160 °C ont créé des hétérogénéités de digestibilité au sein de tissus. En effet, pour les quelques tissus non lignifiés retrouvés, les prétraitements à température plus élevée (140 et 160 °C) rendent la cellulose encore plus accessible (forte phase d'adsorption, et augmentation de la pente liant  $A_r$  à  $\Sigma I_{\text{dynam}}$ ),

et pour les tissus lignifiés, une partie semble rendue digeste (ou partiellement digeste), alors qu'une autre partie semble avoir complètement préservé son caractère indigeste. Par ailleurs, sur les tissus lignifiés, la part d'enzymes adsorbées de manière non productive semble réduite par un prétraitement plus intense. De plus, l'augmentation de la sévérité du prétraitement a pour effet d'améliorer la cinétique d'hydrolyse, ou tout du moins la cinétique d'adsorption/désorption d'enzymes.

### 1. Mode d'adsorption des enzymes sur les particules digestes

Dans le cas idéal d'une particule homogène et digeste, il est possible d'étudier plus localement le mode d'adsorption des enzymes et la dégradation de la particule afin de mieux appréhender ces phénomènes. Pour cela, des mesures ont été réalisées sur différents fragments de parenchymes non lignifiés des échantillons A020C, C020C et D020C.

Des images obtenues dans le canal de fluorescence d'enzymes d'une particule digeste de l'échantillon A020C est présenté sur la Figure 171 pour des temps d'hydrolyse de 25 min et 75 min. On remarque que l'adsorption des enzymes ne se fait pas de manière homogène spatialement : les enzymes s'adsorbent en premier lieu sur les contours de la particule. Seulement après, l'adsorption se poursuit jusqu'au centre de la particule (là où l'épaisseur devient plus significative), alors qu'au niveau des extrémités des particules, les enzymes commencent déjà à se désorber de la surface. Au cours du temps, la particule semble être "attaquée" par les enzymes depuis ses extrémités, et ensuite les enzymes se propagent vers son centre, où la matrice a moins d'aspérités.

Au cours de la cinétique cet effet disparaît peu à peu jusqu'à atteindre un niveau d'adsorption homogène sur toute la particule.

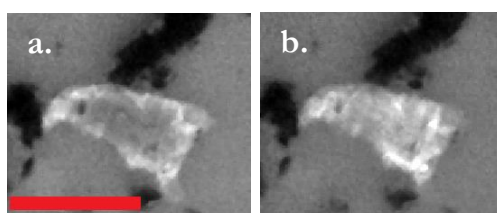


Figure 171 : Particule non lignifiée en fluorescence d'enzyme à 25 min (a) et 75 min (b) montrant l'inversion de contraste se produisant entre le contour et l'intérieur de la particule. : Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$

Les profils mesurés au centre de la particule et à son extrémité permettent de quantifier le décalage temporel d'adsorption (Figure 172b). Les maximums d'adsorption ont lieu à  $t=50$  min pour l'extérieur du parenchyme, et à  $t=90$  min pour l'intérieur, soit un décalage temporel de 40 minutes. De plus, les intensités de fluorescence convergent vers la même valeur en fin d'hydrolyse. Cet effet est donc transitoire et tend à s'estomper au cours du temps.

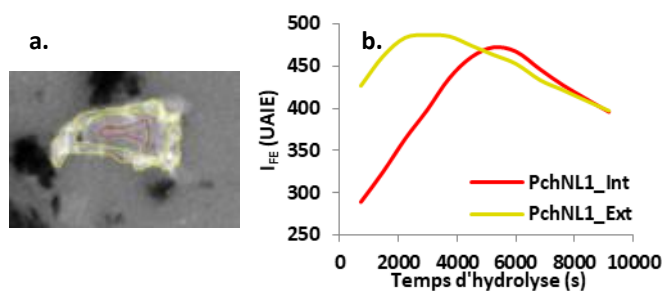


Figure 172 : A gauche, délimitation des zones de mesures de profils temporels de l'intensité de fluorescence d'enzyme à l'extérieur (contour et courbe jaunes) et intérieur (contour et courbe rouges) d'un fragment de parenchyme non lignifié ; à droite, graphique représentant les deux profils temporels obtenus. La courbe rouge est le profil du centre de la particule, la courbe jaune est le profil de l'extérieur de la particule

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

En délimitant un contour rectiligne à mi-chemin entre la particule et le milieu réactionnel (Figure 173a), on peut déterminer que ce gradient temporel d'adsorption d'enzyme s'étend initialement sur 14  $\mu\text{m}$  et tend à s'estomper au cours de l'hydrolyse (Figure 173b). On retrouve cette valeur autour de 10-30  $\mu\text{m}$  pour plusieurs autres mesures effectuées sur d'autres fragments digestes (résultats non présentés). Le décalage temporel d'adsorption varie autour de 10 à 50 min, et semble d'autant plus court que la particule est digeste.

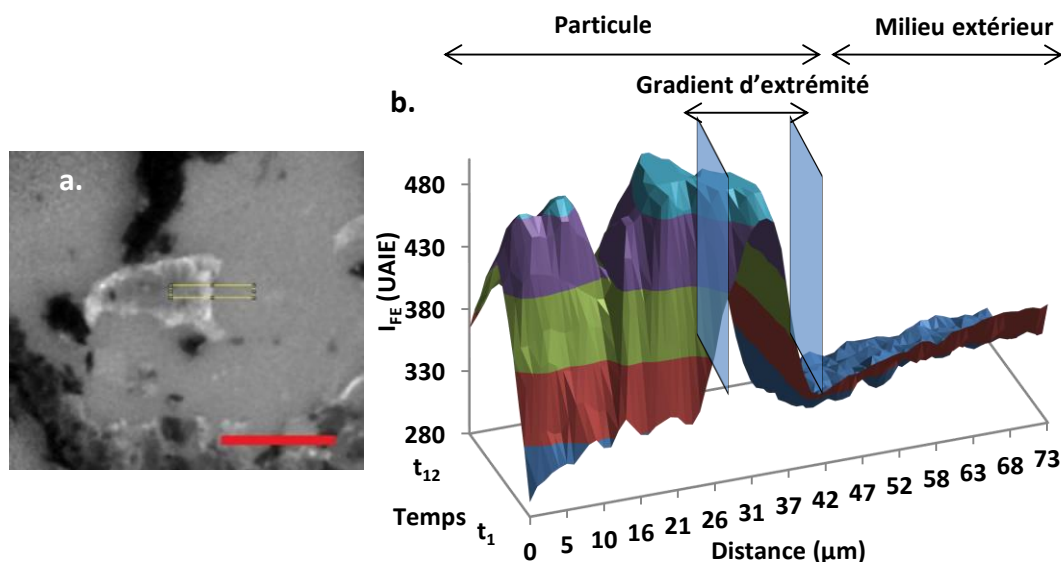


Figure 173 : a. Clicé en fluorescence d'enzyme d'un parenchyme non lignifié au temps initial, présentant un contraste d'adsorption entre le contour de la particule et son centre, avec une délimitation d'un profil rectiligne pour voir l'évolution de ce contraste au cours de l'hydrolyse. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$  ; b. Evolution de la fluorescence d'enzyme du profil rectiligne défini, au cours de l'hydrolyse

Les fragments de parenchymes non lignifiés des échantillons C020C et D020C présentent les mêmes types de différences d'adsorption d'enzymes entre leur contour et leur centre. En Figure 174a est donné un exemple sur une particule et pour laquelle un profil de contour et un profil central sont donnés. Le décalage temporel du maximum d'adsorption entre l'extrémité et le centre de la particule est de l'ordre de 20 min. L'épaisseur de la zone extrême sur laquelle l'adsorption préférentielle est de l'ordre 11  $\mu\text{m}$ , d'après le profil rectiligne au premier temps d'acquisition.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

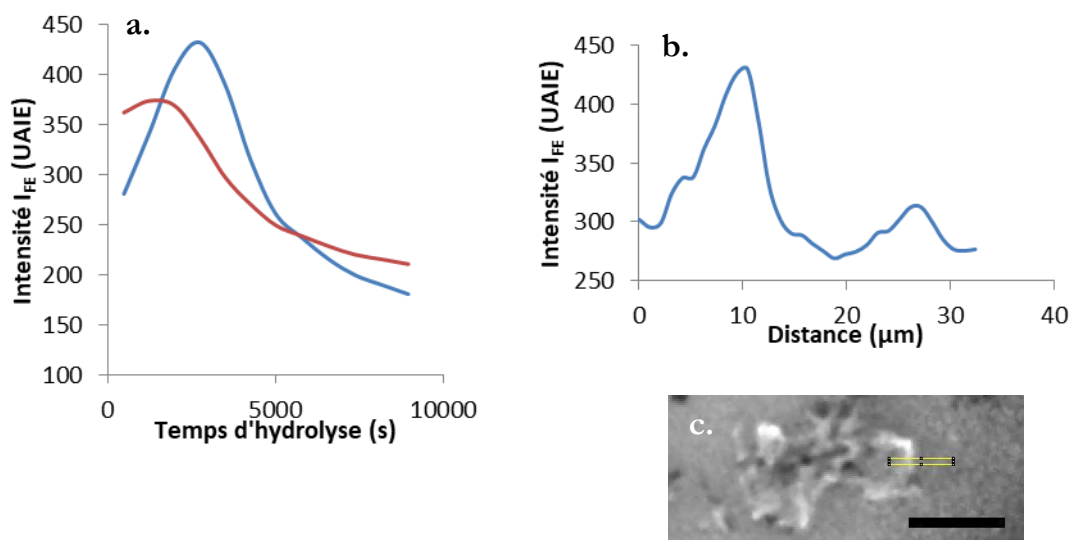


Figure 174 : a. : Profils temporels de fluorescence d'enzyme de l'intérieur (bleu) et de l'extérieur (rouge) de la particule ; b. : Profil spatial rectiligne de fluorescence d'enzyme au premier temps d'acquisition ; c. : image délimitant le profil rectiligne défini. Barre d'échelle : 50 µm

Les contours des particules qui sont des zones de ruptures, de déchirures (issues de l'étape de broyage par exemple), présentent des aspérités (par opposition aux surfaces "natives" des tissus, qui sont lisses), qui constitueraient alors autant des sites propices à l'adsorption des enzymes sur des terminaisons de chaînes celluloses rendues accessibles. Une fois ce phénomène d'adsorption aux extrémités commencé et la dégradation des aspérités amorcée, le nombre de sites d'adsorption s'équilibrerait progressivement entre les extrémités qui deviennent graduellement lisses, et les faces des tissus, qui sont lisses dès le départ.

En tout état de cause, on peut penser que cet effet de gradient d'adsorption pourrait induire une variation de la digestibilité entre un tissu digeste non broyé, et ce même tissu finement broyé. Les extrémités étant préférentiellement choisies par les enzymes, le substrat/tissu finement broyé serait plus rapidement digéré. Comme l'étendue de ce gradient se situe aux environs de 10-20 µm, il faudrait probablement un broyage générant des particules d'une taille inférieure ou égale à cette gamme de granulométrie pour observer une augmentation significative de digestibilité attribuable à cet effet-là. Pour rappel, de telles conclusions sont en accord avec des articles de la littérature, dont les résultats indiquent que la diminution de la taille des particules n'a pas d'impact majeur sur la réactivité des substrats (différents des nôtres, certes) dans le cadre d'un broyage grossier (et même la baisse un peu entre 2,5 cm et 500 µm, [88]) mais qu'il existe une gamme en dessous de laquelle la taille de particule a un impact sur la digestibilité des substrats ([79,89] et notamment un seuil vers 30 µm pour l'un de ces travaux [79]).

Les gradients d'adsorption sont observés pour les trois échantillons analysés. La seule différence notable remarquée entre l'échantillon A020C et les échantillons C020C et D020C prétraités à plus haute température, est la diminution du délai observé entre l'adsorption au bord et au cœur de la particule. Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec les précédents résultats qui montraient une amélioration de la cinétique d'adsorption/désorption sur les deux échantillons prétraités C020C et D020C. Ainsi le possible gain de digestibilité occasionné par un affinement de la granulométrie devrait être atténué lorsque le prétraitement est effectué à une sévérité intermédiaire, proche des conditions optimales de prétraitement. Ceci est plutôt cohérent avec les travaux de thèse de Jessica Jane MacAskill [79] qui montre sur substrat de conifère qu'avec un broyage à boulets post-prétraitement, la conversion de la cellulose passe de 25 à environ 47 % à haute sévérité de prétraitement (explosion à la vapeur), alors qu'elle passe d'environ 12 % à 65 % à faible sévérité de prétraitement.

### m. Conclusions et perspectives sur les expérimentations DISCO

#### *i La faisabilité technique, mise en œuvre et intérêt*

La première conclusion porte sur la faisabilité de l'approche, de même que sur ses possibilités d'amélioration pour d'éventuelles nouvelles expérimentations. Ce type d'expérimentation avait déjà été réalisé sur des coupes transversales de tiges de maïs [239]. Toutefois, dans notre cas, le défi technique était de pouvoir mettre en œuvre une préparation d'échantillon adaptée, une cellule d'observation ainsi qu'un protocole adapté à des échantillons de biomasse lignocellulosiques pulvérulents. En ce sens, les expérimentations ont constitué un vrai succès puisqu'elles ont permis l'étude *in situ* de la dégradation de particules au cours d'une hydrolyse enzymatique, dans des conditions les plus proches possibles de celles employées de manière standard en laboratoire. Toutefois, le protocole pourrait encore être amélioré en optimisant la dilution des enzymes ou encore le pH.

#### *ii Le traitement des données*

A travers cette étude, une méthodologie d'analyse de données a été mise en place pour apprécier le comportement des enzymes et la dégradation des tissus dépendamment de la température de prétraitement. Elle intègre des concepts d'amincissement relatif et de travail potentiel des enzymes "utiles" adsorbées de manière dynamique et productive, rendant plus efficace l'analyse comparative. Ceci a permis d'une part de mieux quantifier la digestion effective de la matrice et d'autre part de distinguer les enzymes présentes sur un substrat qui participent ou ne participent pas à la saccharification. Ces dernières sont soit adsorbées de manière non productive, soit libres mais situées derrière la particule en cours de digestion. Dans ce cas, lorsque la particule est suffisamment fine, les enzymes libres peuvent participer à la fluorescence totale mesurée, par transparence partielle de la particule.

L'exploitation de données pourrait probablement encore être poursuivie, par exemple d'un point de vue plus statistique, en raisonnant sur les profils temporels pixel par pixel, sur des zones d'intérêt sans artefacts. Les pixels pourraient alors être classés en fonction de leur profil d'évolution, ce qui permettrait à la fois de réaliser des analyses plus fines et de produire des données plus représentatives et complètes que par l'utilisation de sélections manuelles. Cependant l'analyse chimiométrique ne se prête probablement pas à ces données, notamment car les profils temporels de fluorescence sont intéressants surtout pour les décalages temporels (ou spatiaux) des phases d'adsorption et de désorption, or les décalage de ce type sont mal pris en compte par ACP par exemple.

#### *iii La représentativité des expérimentations*

Les différentes avancées permises par ces expérimentations sont à considérer avec précaution compte tenu du fait que les conditions opératoires ne sauraient être représentatives de celles rencontrées à l'échelle industrielle, ou même pour des hydrolyses standards. Les différences majeures qui peuvent mener à des problèmes de représentativité sont :

- l'absence d'agitation et le dimensionnement qui peuvent mener à des phénomènes limitant : la diffusion de l'eau et des enzymes à l'échelle du tissu ou des parois, ou encore l'inhibition locale des cellulases par le glucose et oligomères de glucose,
- la dose d'enzymes utilisée plus élevée, notamment concernant la quantité d'enzymes par rapport à la quantité de substrat,
- Le court temps de saccharification observé.

Une amélioration possible serait de réaliser une hydrolyse enzymatique standard reliée à une cellule d'observation microscopique microfluidique. Ce système permettrait de limiter les incertitudes liées à l'absence d'agitation, le dimensionnement, et les doses d'enzymes. De plus, par la circulation d'une grande quantité d'enzymes non exposées au faisceau, la dénaturation éventuelle des enzymes serait d'autant plus ralentie.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

### *iv La digestibilité des tissus et positionnement par rapport à la littérature*

Concernant la digestibilité des tissus, les résultats trouvés sont conformes à ceux trouvés dans la littérature [24,51,70,239,274]. Les tissus les plus ligneux semblent les moins digestes : sclérenchyme, parenchyme lignifié. A l'inverse les tissus cellulosiques sont les plus digestes comme par exemple les parenchymes non lignifiés. L'épiderme de tige est très récalcitrant alors que les épidermes de feuilles possèdent une certaine digestibilité. Ces différentes tendances observées restent valables quel que soit le prétraitement effectué. Concernant le parenchyme xylémien, le phloème et le collenchyme, il aurait été nécessaire de posséder plus de spécimens et des acquisitions qui débutent véritablement en début d'hydrolyse enzymatique (à l'imprégnation) pour pouvoir donner des conclusions robustes sur ces trois tissus.

### *v Les effets du prétraitement sur la digestibilité des tissus*

En premier lieu, il peut être noté que la fluorescence des parois issue de la lignine et des acides hydroxycinnamiques est visiblement un témoin de la sévérité du prétraitement puisqu'elle est très présente pour l'échantillon A020C produit à 100 °C, très affaiblie pour l'échantillon C020C, et absente pour l'échantillon D020C.

L'augmentation de la sévérité de prétraitement provoque différentes modifications visibles lors du suivi microscopique de la cinétique. Tout d'abord, la reconnaissance des tissus est d'autant plus délicate que la sévérité du prétraitement est élevée, et la proportion relative de chaque tissu/particules est modifiée :

- les tissus cellulosiques semblent de moins en moins abondants à mesure que la sévérité augmente, soit par hydrolyse partielle de ces tissus, soit par une dispersion plus fine qui les rend moins visibles. Ils présentent une affinité enzymatique, une dynamique d'adsorption-désorption et une dégradation d'autant plus forte que la température de prétraitement est élevée.
- Par contre, les prétraitements à 140 °C et 160 °C ont aussi eu pour effet de rendre certaines zones non identifiables, sans structure cellulaire apparente. Ces particules déstructurées sont abondantes et très hétérogènes : certaines zones sont probablement ligneuses (d'après les observations faites en microscopie confocale) et très peu digestes, et d'autres au contraire sont extrêmement digestes.

Ensuite, tous les tissus reconnus (cellulosiques ou ligneux) présentent une dynamique de saccharification (marquée par un amincissement et une phase d'adsorption puis de désorption) d'autant plus accélérée que la sévérité du prétraitement est grande. Pour les tissus lignifiés, le prétraitement à 100 °C ne permet pas de les rendre digestes (seule une faible adsorption statique non productive est mesurée) alors qu'à 140 et 160 °C, ils peuvent présenter une relative digestibilité. Cependant, pour un tissu donné, ce gain en affinité n'est pas homogène sur l'ensemble du tissu : parfois il est significatif, avec une cinétique d'adsorption-désorption d'enzymes couplée à un amincissement, et parfois il est quasi-nul sur toute la durée des expérimentations, et sans digestion observable. Toujours pour les tissus lignifiés, les zones qui ont perdu leur récalcitrance présentent une phase d'adsorption et de désorption qui est visible même si l'intensité absolue de fluorescence d'enzyme est assez faible, ce qui montre l'importance de ce régime dynamique dans la conversion de la cellulose, quelle que soit l'intensité absolue de l'adsorption des enzymes.

### *vi Les modes d'action des enzymes*

La digestion des particules se fait dans le sens de l'épaisseur de la paroi, et non dans le sens de la longueur, ce qui est plutôt logique car l'adsorption se réalise en surface (ou en volume dans le cas des échantillons prétraités suffisamment), et la surface développée par l'épaisseur des parois est négligeable par rapport à la surface développée par la longueur et le diamètre de la cellule. En conséquence, l'hydrolyse s'observe ainsi de manière moins prononcée en coupe longitudinale (cas de la plupart des particules trouvées) qu'en coupe transversale (brin de paille complet par exemple).

A faible sévérité de prétraitement, les enzymes s'adsorbent sur tous les tissus et dès le début de l'hydrolyse. En revanche, la quantité d'enzymes va rester faible et constante pour les tissus non digestes,

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

alors qu'elle sera importante pour les tissus digestes. Par ailleurs, le temps pour lequel l'adsorption d'enzymes est maximale est d'autant plus court que les particules sont réactives. A plus forte sévérité de prétraitement, les maxima d'adsorption d'enzymes sont observés à des temps plus courts : en ce sens la cinétique semble être améliorée. De plus, il n'y a pas d'adsorption constante au cours du temps sur les zones non digestes, **ce qui montre qu'à ces sévérités de prétraitement, la lignine n'est plus une source significative d'adsorption non productive.**

Les enzymes adsorbées sur une particule ne participent pas toutes à la conversion de la cellulose : au cours de l'hydrolyse, certaines enzymes se bloquent en surface (que ce soit de manière non productive sur de la lignine ou par blocage purement physique sur de la lignine ou de la cellulose), sans contribuer à la conversion de la cellulose. Ce phénomène étant irréversible, il s'accumule au cours du temps pour les particules partiellement digestes. La part d'enzymes adsorbées de manière fonctionnelle est, elle, directement corrélée à la digestion des particules.

L'efficacité des enzymes qui peut être vue comme la capacité à dégrader un tissu donné compte tenu de la quantité d'enzymes adsorbées de manière fonctionnelle, est dépendante des tissus (les tissus les moins ligneux sont les plus efficacement dégradés), mais aussi de la sévérité de prétraitement. L'augmentation de la température ne permet pas toujours d'augmenter la part d'enzymes productives adsorbées, ni d'accentuer l'amincissement de la paroi. Cependant on suppose que la détermination de ces grandeurs peut être biaisée notamment si l'échantillon est trop rapidement dégradé (auquel cas les observations faites ne sont pas représentatives de la dégradation et des enzymes qui ont participé à la dégradation), ou si au contraire la cinétique d'adsorption est réelle mais très lente. Il semble que c'est plutôt une période réduite d'adsorption et de désorption lorsque la température de prétraitement augmente qui permet de conclure de la plus grande digestibilité des tissus produits par un prétraitement à température élevée.

On constate par ailleurs qu'il existe une adsorption préférentielle plus précoce des enzymes au niveau des extrémités des particules, comparativement aux faces lisses des particules. Cet effet tend à s'estomper au cours de l'hydrolyse, possiblement par la diminution progressive des sites d'adsorption (suite au lissage provoqué à ces endroits par les enzymes) au niveau des aspérités, déchirures, etc.

### *vii Facteurs gouvernant la digestibilité du matériel cellulosique*

**Les facteurs qui semblent caractériser une grande digestibilité** observée dans le canal en transmission et par l'intermédiaire de l'amincissement relatif, **sont une grande affinité enzymatique, une grande proportion d'enzymes adsorbées de manière productive, et surtout une dynamique d'adsorption-désorption rapide.**

Par les différentes observations faites, on peut dire que **la présence conjointe de lignine et d'hémicelluloses** (cas des parois secondaires S2 lignifiées des sclérenchymes par exemple) **est le principal facteur de récalcitrance.** En effet, les tissus non lignifiés sont parfaitement digestes (forte adsorption, rapide, et efficace), et les tissus lignifiés pour lesquels les hémicelluloses ont été majoritairement retirées (adsorption modeste, plus ou moins rapide, mais efficace). Ceci est cohérent avec le fait que la teneur en lignine n'a pas été retenue au chapitre précédent comme descripteur pertinent de l'hydrolyse enzymatique dans le cadre d'échantillons traités à l'acide dilué. **C'est donc la distribution spatiale de la lignine au niveau des parois, et ses liens avec les hémicelluloses qui sont potentiellement critiques.**

En revanche, **le niveau de fluorescence des parois ne permet pas de présager directement de la digestibilité des tissus** : à faible sévérité, certaines présentent à la fois une fluorescence de paroi et une digestibilité observable (notamment au niveau des stomates où la fluorescence et la digestion sont plus marquées). A l'inverse, on peut trouver à plus forte sévérité des tissus lignifiés qui ont perdu leur fluorescence de paroi et qui sont toujours indigestes. Cette indépendance observée entre la présence de composés phénoliques et la saccharification est en accord avec d'autres travaux réalisés à l'IFPEN pour lesquels l'adjonction de la fraction des espèces phénoliques d'un hydrolysat de prétraitement à un substrat lignocellulosique mis en hydrolyse enzymatique n'a pas d'effet néfaste sur la conversion de la cellulose en glucose, tout du moins aux concentrations rencontrées. En revanche, cette fluorescence de paroi reste un bon indicateur de l'impact du prétraitement sur la nature chimique du substrat.



L'observation d'une adsorption préférentielle des enzymes aux extrémités des particules (sur une étendue de 10-30  $\mu\text{m}$ ), est cohérente avec l'hypothèse selon laquelle ces zones présentent un grand nombre de sites d'adsorption au niveau des aspérités, zones de rupture/déchirure, qui délimitent les particules. Cet effet s'atténue lorsque les aspérités sont progressivement hydrolysées par les enzymes, et la perte temporaire de surface accessible observée en début de chapitre tend à confirmer cette hypothèse. De cette observation, on peut penser que pour les particules d'une taille de cet ordre de grandeur, la conversion serait considérablement améliorée. Cependant, cet effet étant prépondérant seulement durant les premières heures de la saccharification, il n'est pas certain que cet effet puisse être exploité pour des hydrolyses longues.

D'un point de vue procédé, on souhaite en général obtenir une matrice homogène prétraitée de manière optimale. Or cette situation est par définition impossible, car la matrice de départ n'est pas homogène, et, comme on vient de le voir, le prétraitement à l'acide dilué n'homogénéise pas réellement les propriétés des différents tissus. Pour un prétraitement proche de l'optimum, les tissus cellulosiques seront inutilement prétraités car suffisamment digests à l'état natif, tandis que les tissus partiellement lignifiés seront correctement prétraités (par la délocalisation de la lignine et hydrolyse importante des hémicelluloses, comme dans le cas du parenchyme lignifié), et les tissus les plus indigestes ne le seront pas encore assez (cas du sclérenchyme). La mise en place à bas coût d'un fractionnement sélectif des tissus, sur la base de certaines analyses de leurs propriétés (électrostatisme, décantation en solvant spécifique, fragmentation aux ultrasons, etc.), pourrait permettre d'optimiser le procédé global de production d'éthanol à partir de biomasse en améliorant la réactivité du substrat et en minimisant le taux d'inhibiteurs de fermentation.

### 3. Conclusion

---

Les deux études de ce chapitre sont complémentaires et visaient à étudier l'évolution des paramètres macroscopiques mesurés par prélèvement *ex situ* et établir des liens avec les observations microscopiques *in situ*.

#### a. Scénario d'hydrolyse enzymatique d'une biomasse prétraitée à l'acide dilué

En début d'hydrolyse enzymatique, les enzymes s'adsorbent en premier lieu aux extrémités des particules qui sont rapidement lissées et digèrent en priorité les tissus cellulosiques.

Une fois ce phénomène transitoire passé, et si le substrat est suffisamment bien prétraité, l'hydrolyse se poursuit au niveau des tissus lignifiés (parenchyme lignifié et sclérenchyme), dans le volume des parois secondaires, là où la cellulose est majoritairement présente. L'hydrolyse de la cellulose dans la paroi laisse une porosité visible par l'augmentation de la surface accessible et de la taille des pores au cours de la saccharification. La matrice est alors fragilisée, ce qui entraîne une fragmentation, en particulier en fin d'hydrolyse, et de manière d'autant plus marquée que le prétraitement est réalisé à haute température. Cependant, cette hydrolyse des tissus lignifiés ne se fait pas de manière homogène. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par un différentiel d'affinité enzymatique au sein d'un même tissu lignifié, ce qui pose question quant à son origine et aux moyens d'y remédier. De plus, ce phénomène explique peut-être pourquoi les rendements en glucose n'atteignent jamais des valeurs proches de la valeur maximale de 100 %, quelles que soient les conditions opératoires choisies. Par ailleurs, à partir d'une température de prétraitement de 140 °C, certains tissus sont suffisamment déstructurés pour que l'on ne puisse plus reconnaître les tissus originels. Ces particules relativement abondantes présentent des zones peu digests, probablement constituées de lignine comme vu par microscopie confocale, et d'autres au contraire plus digests.

A faible température de prétraitement (100 °C), la conversion de la cellulose se limite essentiellement aux tissus non lignifiés, de sorte que l'on peut se demander si certains tissus lignifiés ne seraient-ce qu'imprégnés par le mélange réactionnel (à l'échelle de la cellulose, dans le lumen, et à l'échelle inférieure,

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

dans les parois), par la forte hydrophobicité de la lignine qui est présente (et dans le cas du sclérenchyme, par l'étroitesse des lumens).

Concernant l'hydrolyse en elle-même, le ralentissement temporel de la cinétique est un phénomène systématiquement rencontré lors de la saccharification d'un substrat. Plusieurs facteurs semblent intervenir. D'abord, après digestion préférentielle des tissus cellulosiques et lissage des zones d'aspérité, la conversion se poursuit dans des zones où la cellulose est bien moins accessible. Un autre phénomène participe au ralentissement de la conversion, c'est la dynamique d'adsorption et de désorption imparfaite. Des enzymes restent progressivement bloquées en surface.

Un autre point important est que l'hydrolyse de la cellulose se fait de manière non spécifique sur les phases amorphe et cristalline qui sont par ailleurs intimement liées (liens covalents sur les chaînes, liaisons hydrogène entre les chaînes) et se succèdent au sein des microfibrilles. De ce fait, l'efficacité de l'hydrolyse d'une région amorphe peut dépendre de l'hydrolyse des zones cristallines qui l'entourent.

L'augmentation de la température du prétraitement permet d'augmenter la digestibilité de chaque tissu, pas tant par une augmentation de l'affinité enzymatique des substrats que par une accélération de la dynamique d'adsorption et de désorption des enzymes.

### **b. Lien avec les descripteurs définis au chapitre précédent**

Les études présentées dans ce chapitre peuvent permettre de comprendre quelles sont les interactions existant entre le comportement des enzymes (au cours du temps, vis-à-vis des différents tissus, et dépendamment de la température de prétraitement), et les modifications physicochimiques induites par le prétraitement. En effet, nous avons montré qu'il existait un certain nombre de descripteurs qui permettaient d'expliquer et de modéliser la conversion de la cellulose au cours du temps : la surface accessible, le taux d'hémicelluloses et d'humines, et la cristallinité de la cellulose. Ces paramètres étaient toutefois susceptibles d'évoluer au cours de l'hydrolyse enzymatique. Grâce au suivi des propriétés physico-chimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique, nous avons pu montrer que ce n'était pas le cas de l'indice de cristallinité de la cellulose. Par contre, nous avons vu que la surface pouvait augmenter significativement au cours de l'hydrolyse, notamment en fin d'hydrolyse enzymatique (à partir de 24-48 h). Ces résultats pourraient expliquer en partie la déviation du modèle à 144 h d'hydrolyse, qui considère la constante de vitesse  $k$  et l'accessibilité  $R_m$  de la cellulose comme des valeurs constantes au cours du temps. En l'occurrence, les rendements à 144 h prédits sous-estimaient souvent les rendements expérimentaux effectivement mesurés. Ainsi, la valeur sous-estimée du rendement en glucose à 144 h pourrait s'expliquer par l'augmentation de la surface accessible au cours de l'hydrolyse enzymatique, exposant de ce fait plus de cellulose aux enzymes et de manière tardive.

Cela permet donc à la fois de conforter le fait que la surface accessible est un descripteur clef de la saccharification, et également de montrer la nécessité de connaître l'évolution des descripteurs ciblés par le fait qu'elle rétroagit directement sur l'accessibilité de la cellulose et sur l'efficacité des enzymes. Ceci est important pour déterminer de manière plus fidèle une cinétique de rendements en glucose au cours de l'hydrolyse.

### **c. Synthèse des descripteurs et enjeux pour le procédé de conversion**

Au terme de ces deux études, il est possible de compléter et synthétiser de manière schématique l'importance des paramètres physicochimiques qui semblent impacter la conversion de la cellulose, dans nos conditions de prétraitement et d'hydrolyse. La Figure 175 montre l'importance des différents descripteurs sur l'accessibilité  $R_m$  de la cellulose (a) et de la constante  $k$  de vitesse (b), dépendamment de la sévérité du prétraitement.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

- La couleur rouge représente un effet négatif, la couleur verte un effet positif.
- Les hachures signifient que le rôle de ces paramètres dans la saccharification est mal caractérisé, et nécessiterait des investigations plus spécifiques et plus approfondies. Les paramètres concernés sont la proportion des particules très fines dans le substrat (de l'ordre d'une dizaine à quelques dizaines de microns), et de la distribution de la lignine dans les tissus, qui peut causer à la fois un masquage physique de la cellulose, et une adsorption non productive qui diminue de ce fait la quantité d'enzymes productives et donc la vitesse de conversion.
- Les couleurs pleines reportent simplement les descripteurs déterminés au chapitre précédent. On rappelle ici que le rôle des humines et des hémicelluloses dans la limitation de l'accessibilité de la cellulose est d'autant plus crucial que leur teneur est faible, ce qui a lieu lorsque les conditions opératoires sont proches de l'optimum (ni trop sévères, ni trop douces), et ce qui donne lieu expérimentalement à des rendements en glucose assez différents pour des conditions opératoires proches.

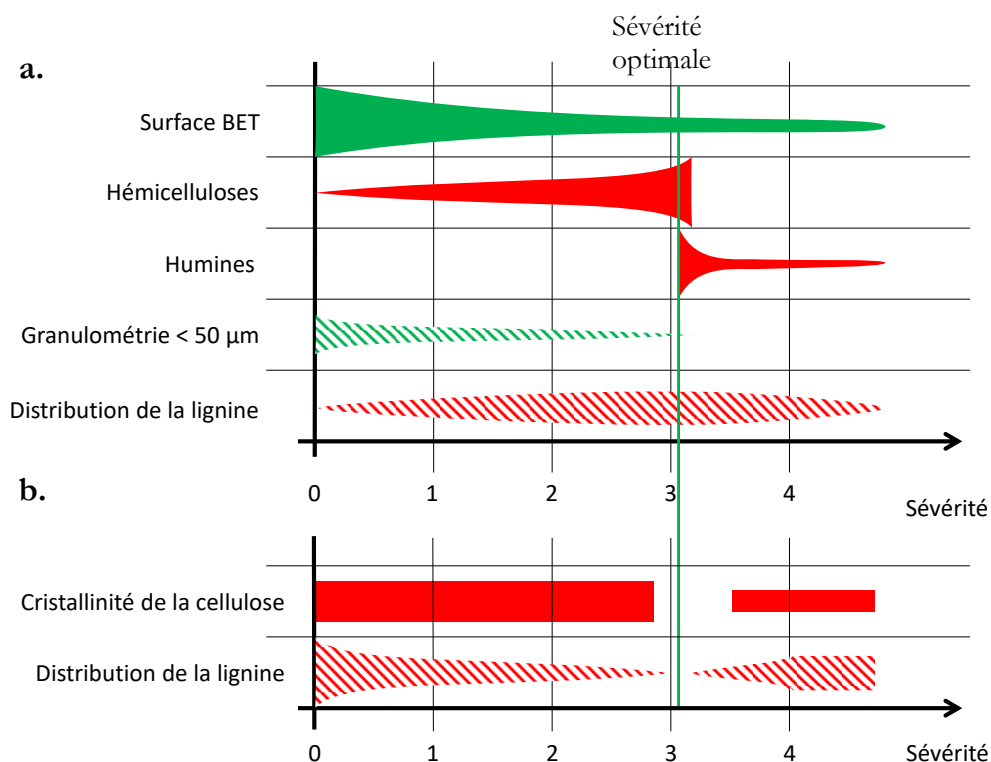


Figure 175 : Représentation schématique de l'importance relative de différents paramètres des substrats lignocellulosiques sur l'accessibilité  $R_m$  de la cellulose (a) et la constante  $k$  de vitesse de conversion (b), en fonction de la sévérité de prétraitement

L'importance de ces paramètres sur l'hydrolyse enzymatique dépend de leur valeur. Par exemple, l'impact de la teneur en hémicelluloses est d'autant plus important à prendre en compte qu'elle est présente en faible proportion. A l'inverse, pour des fortes teneurs en hémicelluloses, une variation significative de cette teneur aura des effets beaucoup plus ténus sur le rendement en glucose. Il semble intéressant d'illustrer ceci en montrant de la même manière le rôle des différents paramètres non plus en fonction du facteur de sévérité du prétraitement, mais en fonction de la valeur de chaque grandeur (Figure 176). Cependant, cette représentation n'est pas parfaite car elle n'indique pas les dépendances existant entre ces paramètres qui rendent peu probables certaines combinaisons, comme par exemple un échantillon avec une surface accessible très élevée, un taux d'hémicelluloses très élevé, et une teneur nulle en humines.

## Suivi des propriétés au cours de l'hydrolyse enzymatique

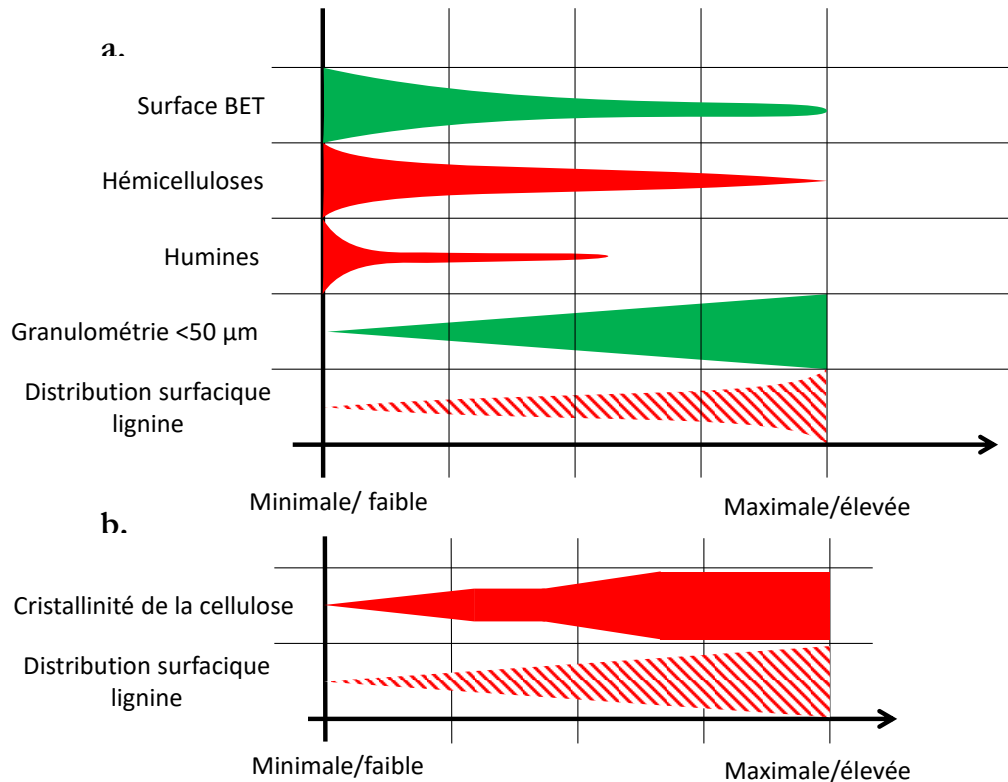


Figure 176 : Représentation schématique de l'importance relative de différents paramètres des substrats lignocellulosiques sur l'accessibilité  $R_m$  de la cellulose (a) et la constante  $k$  de vitesse de conversion (b), en fonction de la valeur de chaque paramètre

Ainsi, de cette analyse globale, différentes pistes s'ouvrent dans l'optique d'une amélioration de l'étape de prétraitement :

- Eliminer totalement les hémicelluloses, sans créer d'humines (et donc aussi d'inhibiteurs solubles), par excès de sévérité. Dans le cas d'hémicelluloses résiduelles, on suggère l'ajout d'hémicellulases (dont la dose sera à optimiser pour maximiser la synergie avec les cellulases),
- Chercher des conditions opératoires/design de réacteur qui permettent de délocaliser sous la forme de gouttes la lignine qui recouvre initialement la surface des tissus, de même que de réduire l'hétérogénéité d'efficacité de prétraitement pour les tissus lignifiés (voir le chapitre sur l'*in situ*). Ces deux phénomènes sont d'ailleurs très probablement liés,
- Compte tenu de l'inhomogénéité de digestibilité à l'échelle des tissus notamment, envisager la possibilité de réaliser un pré-tri, sélectif de la biomasse (sur la base de la densité, caractère électrostatique, taille des particules, etc.), pour adapter les conditions opératoires de prétraitement à chaque fraction, dépendamment de ses propriétés et de sa digestibilité avant prétraitement,
- Explorer la possibilité de réaliser des prétraitements peu énergivores capables de créer de la porosité/surface d'exposition : cycles de congélation/décongélation des substrats humides (dans les pays nordiques par exemple), sablage, vaporisation du solvant pendant le prétraitement,...
- A l'inverse, ne pas s'attarder sur la cristallinité de la cellulose (et sur les moyens de la modifier) puisqu'elle n'intervient pour ainsi dire plus lorsque le temps d'hydrolyse est suffisamment long,
- Explorer la possibilité de coupler différents prétraitements aux conditions opératoires assez douces, mais dont les effets complémentaires créeraient une synergie bénéfique à la digestibilité du substrat : délignification partielle alcaline, puis hydrolyse des hémicelluloses, ou encore délignification fongique partielle et cycles de congélation/décongélation, et enfin prétraitement à l'acide dilué (ou autohydrolyse) pour hydrolyser les hémicelluloses.