



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

SIMPPÉ



Université de Lorraine

Faculté des Sciences et Technologies

École doctorale Sciences et Ingénieries des Molécules, des Produits, des Procédés et de l'Energie

Laboratoire d'Études et de Recherche sur le Matériau Bois EA 4370 UL-FST

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 2020 pour l'obtention du grade
de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Sciences du Bois et des Fibres

par **Sébastien NGWA OBAME**

Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de l'industrie du bois d'okoumé : vers une production d'éthanol cellulosique

Composition du Jury

Bertrand CHARRIER	Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour/France	Rapporteur
Evelyne MAURET	Professeure, Université de Grenoble Alpes/France	Rapporteur
Rodrigue SAFOU TCHIAMA	Maître assistant (CAMES) Université des Sciences et Technique de Masuku/Gabon	Invité
Isabelle ZIEGLER-DEVIN	Maître de conférences, Université de Lorraine/France	Co-directeur de thèse
Nicolas BROSSE	Professeur, Université de Lorraine/France	Directeur de thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE	ii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
REMERCIEMENT	xi
DEDICACE	xii
SIGLES ET ABREVIATIONS	xiii
RESUME	xiv
ABSTRACT	xv
Introduction générale	17
Chapitre I. Contexte et revue bibliographique	22
1. Généralités sur l'okoumé, sur les matériaux lignocellulosiques, procédés d'extractions des lignines et techniques d'analyses de la lignine et de la cellulose	23
Introduction	23
1.1. Origine et répartition de l'okoumé	23
1.2. Production et rendement matière (quantité de déchets produit/an)	24
1.3. Commerce du bois	25
1.3.1. Production et exportation de sciages	26
1.3.2. Production et exportation de placages	27
1.3.3. Production et exportation de contre-plaqués	27
1.4. Description du bois	28
1.4.1. Structure anatomique du bois	29
1.4.1.1. Echelle macroscopique	29
1.4.1.2. Echelle microscopique	30
1.4.1.3. Echelle pariétale	31
1.4.1.4. Echelle moléculaire	32
1.4.2. Composition chimique du bois et structures des polysaccharides et de la lignine 34	
1.4.2.1. Les polysaccharides	34
1.4.2.2. La lignine	37
1.4.2.3. Composition chimique de l'okoumé	41
1.5. Description des procédés d'extractions des lignines	43
1.5.1. Le procédé Kraft	43
1.5.2. Le procédé au sulfite	43
1.5.3. Le procédé à la soude	44

1.5.4.	Le procédé organosolv	44
1.5.5.	Le procédé d'explosion à la vapeur.....	45
1.5.6.	Les lignines pyrolytiques.....	45
1.5.7.	Le procédé au dioxane (milled wood lignin)	45
1.6.	Techniques d'analyses de la cellulose et de la lignine.....	46
1.6.1.	Analyse gravimétrique de la cellulose : méthode au chlorite	46
1.6.2.	Caractérisation structurale de la cellulose	46
1.6.2.1.	Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC).....	46
1.6.2.2.	Viscosimétrie	47
1.6.2.3.	Caractérisation par DRX.....	47
1.6.2.4.	Caractérisation par RMN CP/MAS ¹³ C	48
1.6.3.	Analyse gravimétrique de la lignine: méthode Klason.....	49
1.6.4.	Spectrophotométrie : lignine soluble	50
1.6.5.	Analyse structurale de la lignine par RMN.....	50
2.	Généralités sur les procédés de conversion énergétiques de la biomasse lignocellulosique (BLC) : <i>présentation des deux voies de transformation de la BLC en biocarburants</i>	52
	Introduction	52
2.1.	La voie thermochimique	53
2.2.	La voie biochimique	53
2.2.1.	Production d'éthanol.....	53
2.2.2.	Etape de prétraitement	55
2.2.2.1.	Procédés physiques.....	57
2.2.2.2.	Procédés chimiques	58
2.2.2.3.	Procédés thermo-physico-chimique	59
3.	Généralité sur le processus d'hydrolyse enzymatique et de fermentation de la biomasse végétale.	61
	Introduction	61
3.1.	Hydrolyse enzymatique de la cellulose	61
3.1.1.	Mode d'action des cellulases.....	62
3.1.2.	Technologie de l'hydrolyse enzymatique.....	64
3.2.	Fermentation éthanolique des sucres : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
3.3.	Présentation des principaux procédés commercialisés	66
	Chapitre II. Matériel et méthodes.....	67
1.	Procédures générales.....	68
1.1.	La matière première.....	68

1.2.	Produits chimiques	68
2.	Partie expérimentale	70
2.1.	Composition chimique du cœur et de l'aubier	70
2.1.1.	Les extractibles	70
2.1.2.	Taux de centres	70
2.1.3.	Dosage de la Lignine Klason et des sucres simples	71
2.1.3.1.	Dosage de la lignine de Klason	71
2.1.3.2.	Dosage des lignines solubles	71
2.1.3.3.	Sucres simples	72
2.2.	Prétraitement par explosion à la vapeur	73
2.2.1.	Procédure expérimentale	74
2.2.2.	Choix du solvant d'extraction et protocole de récupération de la lignine d'explosion à la vapeur.	75
2.2.2.1.	Extraction au dioxane	76
2.2.2.2.	Extraction à l'Ethanol	76
2.2.2.3.	Extraction à l'hydroxyde de sodium	76
2.3.	Plan d'expérience	77
2.3.1.	Influence de la granulométrie : imprégnation à l'eau	77
2.3.2.	Influence de la catalyse acide : imprégnation à l'acide sulfurique	78
2.4.	Utilisation de scavengers : imprégnation au Naphtol	79
2.5.	Lignine de bois broyé (Milled wood lignin)	79
2.6.	Structure chimique de la lignine durant le prétraitement d'explosion à la vapeur ..	80
2.6.1.	Purification	80
2.6.2.	Préparation des échantillons de lignine pour la RMN du phosphore ³¹ P et quantification des groupes –OH	80
2.6.3.	RMN ¹³ C et la chromatographie de cohérence magnétique hétéronucléaire (HSQC) ..	81
2.6.4.	Distribution moléculaire en masse (Mw) et en nombre (Mn)	82
2.7.	Caractérisation chimique et morphologique de la biomasse traitée.	82
2.7.1.	Dosage des sucres simples et de la lignine résiduelle	82
2.7.2.	Caractérisation de la cellulose par SEC	83
2.7.2.1.	Extraction de l'holocellulose par la méthode aux chlorites de sodium	83
2.7.2.2.	Obtention de la cellulose	83
2.7.2.3.	Tricarboxylation de la cellulose et analyse	83
2.7.3.	Caractérisation de la cellulose par diffraction aux rayons X	84

2.8.	Analyse de la phase liquide issue du traitement EV	84
2.8.1.	Teneur en sucres	84
2.8.2.	Teneur en produits de dégradation : acide acétique, acide formique, acide lévulinique, furfural et HMF	84
2.8.3.	Taux de lignine soluble.....	85
2.9.	Hydrolyse enzymatique de la biomasse traitée :	85
2.10.	La fermentation des sucres hydrolysés	87
Chapitre III. Caractérisation du bois d'okoumé		89
Introduction		90
1.	Composition chimique du bois d'okoumé	90
2.	Caractérisation de la lignine de bois d'okoumé	92
Conclusion.....		96
Chapitre IV. Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur		98
Introduction		99
1.	Choix du solvant pour l'extraction de la lignine de bois explosé	100
2.	Optimisation du prétraitement	101
2.1.	Influence de la granulométrie.....	101
2.1.1.	Teneur en cellulose résiduelle.....	103
2.1.2.	Teneur en xylose résiduel.....	104
2.1.3.	Taux de lignine extraite à l'éthanol après traitement par explosion à la vapeur (LEV)	106
2.1.4.	Lignine résiduelle.....	108
Conclusion		109
2.2.	Influence de la catalyse acide.....	110
2.2.1.	Perte de masse.....	112
2.2.2.	Analyse de la fraction solide	113
2.2.2.1.	Glucose résiduels	113
2.2.2.2.	Hémicelluloses résiduelles	115
2.2.2.3.	Lignine résiduelle.....	117
2.2.2.4.	Lignine extraite ou Lignine d'Explosion à la Vapeur (LEV).	117
2.3.	Analyse de la phase liquide	120
2.3.1.	Hémicelluloses solubilisés	120
2.3.2.	Furfural et HMF formés	121
Conclusion.....		124

Chapitre V Caractérisation de la lignine et de la cellulose du bois explosé. Production d'éthanol cellulosique	126
Introduction	127
1. Caractérisation de la lignine de bois explosé d'okoumé et étude des changements structuels de la lignine au cours du traitement EV.....	128
1.1. Etude du changement structurel par RMN HSQC	128
1.2. Dépolymérisation de la lignine et mise en évidence des phénomènes de recondensation.	130
1.3. Formation des cétones d'Hibbert lors du traitement EV.....	131
1.4. Etude du changement structurel par RMN ³¹ P	133
1.4.1. Pré imprégnation à l'eau.....	133
1.4.2. Pré imprégnation à l'acide sulfurique dilué.....	133
1.5. Traitement au naphthol	135
1.6. Répartition du poids moléculaire	136
Conclusion	138
2. Caractérisation de la cellulose et hydrolyse enzymatique	139
2.1. La cellulose de bois explosé.....	139
2.1.1. Degré de polymérisation	139
2.1.2. Cristallinité.....	140
2.2. Hydrolyse enzymatique de la biomasse traitée	142
2.3. Discussion	144
Conclusion	146
3. Etape de fermentation.....	147
3.1. Etude de la fermentescibilité des hydrolysats	147
3.2. Bilan massique de production d'éthanol	148
Conclusion.....	149
Conclusion générale et perspectives.....	151
Bibliographie.....	155
Annexe	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aire naturelle de l'okoumé tracée par CTFT (Brunck et al., 1990).....	24
Figure 2: Evolution de la production et exportation de grumes au Gabon entre 2007 et 2014. D'après le Ministère des Eaux et Forêts du Gabon, 2016.....	25
Figure 3: Evolution des volumes de bois débités (production, exportation, vente locale) au Gabon entre 2007 et 2014. D'après TBE et publié par la DGI.....	26
Figure 4: Evolution des volumes de sciages (production, exportation, vente locale) entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014).....	26
Figure 5: Evolution des volumes de placages (production, exportation, vente locale) entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014).....	27
Figure 6: Evolution de la production, exportation et vente locale de contre plaqués entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014).....	28
Figure 7: Illustration de l'organisation multi-échelle de la matière lignocellulosique (Clair, 2001)	29
Figure 8: Section transversale de l'Okoumé.	30
Figure 9: Tissus fibreux et éléments de vaisseaux de l'okoumé. D'après Medzegue (2005).....	30
Figure 10: Illustration d'une cellule de bois avec l'organisation des différentes couches de paroi cellulaire. D'après Montéro (2010).	31
Figure 11: Représentation schématique de l'organisation cristalline des fibres de cellulose enchevêtrées de chaînes d'hémicelluloses amorphes (El Hage, 2010).	33
Figure 12: modèle détaillé de l'association des fibres de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine dans la paroi à l'état anhydre: section longitudinale (Navi et Hager, 2005)	33
Figure 13: Structure d'une chaîne de cellulose	35
Figure 14: Organisation supramoléculaire des microfibrilles. Pris dans Safou-Tchiamia (2005).....	36
Figure 15: Structure fine des fibres de cellulose montrant les cristallites (A), des zones amorphes (B), des jonctions interfibrilles (C), les clusters (D) et des espaces vides (E) Pris dans Safou Tchiamia (2005).	36
Figure 16: Hémicelluloses de feuillus: (a) chaîne de xylane avec position des principales substitutions, (b) principale structure des glucuronoxylanes (Laine, 2005).	37
Figure 17: monomères constitutifs de la lignine	38
Figure 18: Exemple de liaisons éthers labiles (a) et condensées (b) entre monomères de lignine	39
Figure 19: Diffractogramme des fibres de cellulose d'okoumé avec l'attribution des différents plans cristallins caractéristiques de la cellulose (Safou Thiamia, 2005).	48
Figure 20: Spectre RMN ¹³ C CP-MAS de la cellulose. Les bornes d'intégration sont utilisées pour le calcul de l'indice de cristallinité (IC) à partir des aires du C ₄	49
Figure 21: Réaction du TMDP sur les lignines et le cyclohexanol.	51
Figure 22: Localisation des différentes fonctions présentes dans les lignines après réaction avec le TMDP sur le spectre RMN ³¹ P (Yang et al., 2016).	51
Figure 23: Différentes voies de conversion de la biomasse à des fins énergétiques (Kpogbemadou, 2011). (PAC : pile à combustible, FT : synthèse Fisher Tropsch, ETBE : éther éthyle tertibutyle (additif de l'essence)	52
Figure 24: Types de procédés de transformation biochimique de la biomasse lignocellulosique en éthanol (Ogier et al., 1999).....	54
Figure 25: illustration de l'effet du prétraitement sur la BLC:.....	60

Figure 26: Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose en glucose par des enzymes cellulolytiques (van Zyl et al., 2011).....	63
Figure 27: Installation pilote de l'explosion à la vapeur.	73
Figure 28: Schéma expérimental du procédé de traitement de la biomasse par explosion à la vapeur.	75
Figure 29: Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences d'hydrolyse enzymatique.	86
Figure 30: Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences de fermentation.	87
Figure 31: Spectre RMN ¹³ C quantitatif de la lignine de la MWL.....	93
Figure 32: Structure des unités de lignine identifiées.....	95
Figure 33: Spectre 2D RMN HSQC de principales sous-structures de la MWL A: chaînes latérales, B: noyaux aromatiques.....	96
Figure 34: Influence de la taille des particules et de la sévérité du traitement EV sur la teneur en glucose de la biomasse traitée.	103
Figure 35: Surface de réponse présentant l'influence de la granulométrie et de la température sur la production de la cellulose EV.....	104
Figure 36: Influence de la granulométrie et de la sévérité du traitement EV sur la teneur en xylose de la biomasse traitée.	105
Figure 37: Surface de réponse présentant l'influence de la granulométrie et de la température sur la teneur en xylose résiduel après EV.	106
Figure 38: Influence de la taille des particules sur le taux d'extraction de la lignine par le traitement EV avec imprégnation à l'eau.	107
Figure 39: Surfaces de réponse présentant l'influence de la granulométrie et la température sur la production de la lignine EV.....	108
Figure 40: Influence de la granulométrie et de la sévérité du traitement sur la teneur en lignine résiduelle de la biomasse traitée.	109
Figure 41: Influence de la sévérité et de la concentration en acide sur la perte de masse.....	112
Figure 42: Teneur en glucose de la biomasse traitée en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.	114
Figure 43: Surfaces de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et du temps sur la production de la cellulose EV.	115
Figure 44: Teneur en xylose de la biomasse traitée en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.	116
Figure 45: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur la teneur en xylose résiduel.	117
Figure 46: Influence du type d'imprégnation et de la sévérité des conditions sur la teneur en lignine extraite après traitement EV.	118
Figure 47: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration acide sulfurique et de la température sur la production de la LEV.	119
Figure 48: Taux d'hémicelluloses hydrolysées récupérées dans le liquide issu du traitement EV en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.	120
Figure 49: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur l'hydrolyse des hémicelluloses par EV.	121
Figure 50: Taux de furfural formé en fonction de la sévérité du traitement EV et du type d'imprégnation.	122
Figure 51: Taux de HMF formé en fonction de la sévérité du traitement EV et du type d'imprégnation.	122

Figure 52: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur la formation du furfural.	123
Figure 53: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température du traitement EV sur la formation du HMF.	123
Figure 54: Procédés de production d'éthanol cellulosique.	128
Figure 55: Spectre 2D RMN HSQC de principales sous-structures de la MWL, E11 et E8. A: chaînes latérales, B: noyaux aromatiques.....	129
Figure 56: Effet du traitement EV sur le rapport S/G et la teneur en β -O-4.....	131
Figure 57: Effet du traitement EV sur le rapport S/S' et la teneur en β -O-4.....	132
Figure 58: Influence du prétraitement EV avec imprégnation à l'eau sur la teneur en groupement OH de la lignine	133
Figure 59: Influence du traitement EV avec imprégnation à 0,25% H_2SO_4 sur la teneur en groupement OH de la lignine	134
Figure 60: Influence du prétraitement EV avec imprégnation à 0,5% H_2SO_4 sur la teneur en groupement OH de la lignine.	134
Figure 61: Chromatographie d'exclusion stérique de la LEV: A imprégnation à l'eau, B: imprégnation à l'acide sulfurique dilué.....	137
Figure 62: Mécanisme de clivage des liaisons β -aryle éther.	138
Figure 63: Influence du traitement EV sur la taille des fragments de la cellulose.	140
Figure 64: Influence du traitement EV sur la cristallinité de la cellulose.....	141
Figure 65: Influence de la sévérité du traitement EV avec imprégnation à l'eau sur la digestibilité de la cellulose par T. Reesei.....	143
Figure 66: Influence de la sévérité du traitement EV à 0,25% H_2SO_4 sur la digestibilité de la cellulose.	143
Figure 67: Influence de la sévérité du traitement EV à 0,5% H_2SO_4 sur la digestibilité de la cellulose par T. Reesei.....	144

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition relative des différents constituants chimique des feuillus et résineux ,exprimée en pourcentage de matière sèche initiale (Condassamy, 2015a).	34
Tableau 2: Proportions relatives des différentes liaisons entre les unités de lignine dans les deux classes de bois (Almada, 2015).	40
Tableau 3: Proportions relatives des différents monomères (unités) constitutifs de la lignine dans les deux classes de bois (Almada, 2015)	41
Tableau 4: Teneur des principaux constituants chimiques de l'okoumé	42
Tableau 5: les étapes de transformation de la biomasse lignocellulosique en éthanol. D'après Grammont (2006).	55
Tableau 6: Les principaux produits de dégradation des sucres (Brahim, 2016).....	56
Tableau 7: Principaux procédés de prétraitement.	57
Tableau 8: Exemple de prétraitements physiques.	57
Tableau 9: Principaux prétraitements chimiques.	58
Tableau 10: Exemple de prétraitements physico-chimiques.	61
Tableau 11: Présentation des principaux procédés commercialisés de la transformation de la BLC en éthanol (Wertz, 2012).....	66
Tableau 12: Liste des solvants utilisés.	69

Tableau 13: Liste des réactifs utilisés.....	69
Tableau 14: Liste des produits purs utilisés pour l'étalonnage en HPAE-PAD.....	70
Tableau 15: Matrice d'expérience du traitement EV avec imprégnation à l'eau (unités codées).....	78
Tableau 16: Matrice d'expérience du traitement EV avec imprégnation à l'acide sulfurique.....	79
Tableau 17: Groupes fonctionnels et zones d'intégration utilisées pour les spectres de RMN ³¹ P des lignines phosphorylées.	81
Tableau 18: Composition chimique de l'aubier de tranchage et du cœur de déroulage d'okoumé.....	91
Tableau 19: Attributions des bandes RMN ¹³ C des lignines non acétylés du bois d'okoumé.....	93
Tableau 20 : Attributions des signaux croisés dans les spectres RMN HSQC de la MWL du bois d'Okoumé.....	95
Tableau 21: Teneur en lignine extraite en fonction du solvant d'extraction.....	101
Tableau 22: Teneur en lignine extraite et composition chimique du bois explosé.....	102
Tableau 23: Teneur en lignine isolée par le traitement EV et composition chimique de la fraction solide et liquide après prétraitement EV.	111
Tableau 24: Conditions préalables de traitement EV pour l'étude de l'effet des conditions d'imprégnation de la biomasse.....	136
Tableau 25: Suivi de la fermentation.	148
Tableau 26: Bilan massique d'éthanol produit après prétraitement EV par le procédé de saccharification et fermentation séparé.	149

REMERCIEMENT

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMaB) de l'Université de Lorraine à l'aide d'une bourse de l'Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG). Je tiens en conséquence, à remercier **Nicolas BROSSE** et **Isabelle ZIEGLER-DEVIN** d'avoir accepté de diriger ces travaux de thèse. Je leur suis très reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail au sein de leur équipe. Je leur réitère ma profonde gratitude pour leurs qualités scientifiques et professionnelles mais aussi pour leurs qualités humaines.

Je souhaite également remercier **Laurent CRUSCIEL** pour son aide et sa bonne humeur pendant ces trois années de thèse. Il m'a beaucoup apporté durant mon stage de master II et cette aide m'a été d'une grande utilité au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie aussi **Safwan SAKER**, du CRITTBois de m'avoir apporté une aide précieuse au cours de mes missions à l'Ecole Nationale Supérieure des technologies et Industries du Bois (ENSTIB). Je remercie également **Arnaud BESSERER** qui a mis à disposition l'ensemble des équipements de l'ENSTIB lors de ces missions.

L'aboutissement de ce mémoire est aussi le fruit de conseils et de soutiens de nombreuses personnes ressources et d'institutions que nous ne pouvons intégralement citer.

Qu'il me soit permis de témoigner mes sincères remerciements au(x) :

- **Samuel IKGOU** pour son professionnalisme et pour sa simplicité. Il s'est montré disponible non seulement pour moi, mais aussi à l'égard de tous les étudiants de la formation RIFEAC qui m'a mis sur le chemin de cette Thèse.
- **Rodrigue SAFOU TCHIAMA** pour son dynamisme. Il m'a beaucoup apporté durant mon stage de master II et cet apport m'a été d'une grande utilité.
- Mes camarades, **Jean Léon ZUE ONDO**, **Walter Fiacre BEDOUNGUINDZI**, pour ces bons moments passés ensemble.
- L'équipe du LERMAB qui m'a accueilli, j'adresse un remerciement très appuyé à tous pour leur accueil et leur patience tout au long de mon initiation aux subtilités scientifiques et aux méthodes d'analyses.

DEDICACE

Je dédie ce mémoire à :

Mon père, **Marcel OBAME NTO** qui m'a élevé et soutenu financièrement pendant ces longues années d'étude, ainsi que pour l'affection, l'attention et pour toutes les valeurs qu'il m'a transmises, et grâce auxquelles j'ai pu atteindre les objectifs fixés dans ce travail,

Ma mère, **Pauline ANGONE OBAME**, pour m'avoir donné la vie et abreuvé d'un amour maternel à travers lequel je trouvais de l'énergie,

Mon fils **Melchisédeck AKACK EYÔ NGWA**,

Mes frères et sœurs qui ont toujours cru en moi, et n'ont jamais cessé de m'apporter un soutien moral. Sans être exhaustif, je pense particulièrement à **Bertrand FOU DA OBAME**, **Raoul EKOME OBAME**, **Hermann OBAME ESSO**, **Constantin NTO OBAME**, **Anastasia FUDA MOSOMO**

Ma compagne **Line NKIEME MBERANGANA**.

SIGLES ET ABBREVIATIONS

ADF : Ateliers de Fos

ATIBT : Association International Technique Bois Tropicaux

BLC : Biomasse Lignocellulosique

CIMV : Compagnie Industrielle de la Matière Végétale

CTFT : Centre Technique Forestier Tropical

ETBE : Ethyl tert- Buthyl Ether (éther éthyle tertiobutyle)

EV : Explosion à la vapeur

FT : procédé Fischer-Tropsch

HMF : Hydroxy-Méthyl-Furfural

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HPAEC-PAD : High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with a Pulsed Amperometric Detector

LEV : Lignine de bois Explosé à la vapeur

NREL-LAP : National Renewable Energy Laboratory-Laboratory Analytical Procedure

PAC : Pile A Combustible

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SEC : Steric Exclusion Chromatography

SHF : Separate Hydrolysis and Fermentation (Hydrolyse et fermentation séparées)

TAPPI : Technical Association of the Pulp and Paper Industry

RESUME

L'objectif de ce travail est d'étudier la valorisation des produits connexes de l'industrie gabonaise du bois d'okoumé dans un contexte de bioraffinerie. La production de bioéthanol cellulosique et de lignine en se basant sur un procédé de prétraitement transposable à l'échelle industrielle a été étudiée. Nos travaux, réalisés à l'échelle du laboratoire, portent sur (1) l'optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur (EV), (2) l'extraction de la lignine de bois explosé par percolation avec de l'éthanol comme solvant, (3) la caractérisation des biopolymères (cellulose et lignine) et l'étude de l'impact des paramètres du prétraitement sur leur structure chimique et (4) la conversion du bois prétraité en éthanol par hydrolyse enzymatique et fermentation.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à optimiser les différents paramètres du procédé EV (granulométrie, pré-imprégnation, temps de séjour et température) concernant les teneurs en glucose, xylose et en lignine du bois explosé. L'impact du procédé sur la production de produits de dégradation des sucres (furfural et le HMF¹) potentiellement inhibiteurs sur les enzymes et microorganismes a également été étudié. Il a été constaté que la taille des particules est un paramètre important à considérer dans l'amélioration du procédé, les particules fines conduisant à une dégradation importante de la cellulose durant le prétraitement. L'influence de la concentration en acide, utilisé pour imprégner la biomasse, ainsi que des paramètres du procédé (temps de séjour et température) sur l'hydrolyse des biopolymères (lignine et hémicelluloses) ont ensuite été étudiés. Des conditions permettant d'optimiser des teneurs en cellulose (> 59%) dans la matière prétraitée ont été retenues.

Afin de mieux comprendre l'impact du prétraitement sur la lignine extraite à partir du bois explosé et anticiper une valorisation future, des analyses spectroscopiques (RMN HSQC et ³¹P) et chromatographiques (SEC) ont été réalisées. Une diminution de la teneur en β -O-4 est observée avec l'augmentation de la sévérité du traitement d'EV avec une dégradation quasi-totale des unités β -O-4 dans des conditions de plus grande sévérité (T = 210°C, t = 2,5 min et H₂SO₄ = 0,5%). Des phénomènes de recondensation par voie radicalaire de la lignine ont également été observés. La cellulose des différentes fractions solides récupérées après traitement EV a également été caractérisée par SEC, DRX pour étudier l'effet du traitement et identifier les paramètres clés dans l'amélioration de l'efficacité de la conversion de la cellulose en glucose. Une augmentation de la cristallinité avec l'augmentation de sévérité a été observée avec une chute importante du DP de la cellulose pour les EV réalisées avec imprégnation acide.

La digestibilité enzymatique des résidus cellulosiques après EV par *T. Reesei* et l'extraction des lignines ont été étudiées. Les principaux paramètres affectant positivement la réactivité aux enzymes sont l'élimination d'une partie des polymères non cellulosiques et la chute de DP de la cellulose. A forte sévérité d'EV, une baisse de réactivité a été attribuée à la formation de pseudolignines. Les conditions optimales d'EV en vue d'une hydrolyse enzymatique sont les suivantes : T = 210°C, t = 5 min et H₂SO₄ = 0,25%. Une bonne fermentabilité des hydrolysats par *Saccharomyces Cerevisiae* a été obtenue. A partir de 100 Kg d'aubier d'okoumé, il est possible dans les conditions de notre étude de produire 11,9 Kg d'éthanol.

MOTS-CLES LIBRES

Aucoumea klaineana Pierre, explosion à la vapeur, hydrolyse enzymatique, fermentation, éthanol cellulosique.

¹ L'hydroxyméthylfurfural

ABSTRACT

The objective of this work is to study the valorization of co-products from the Gabonese okoumé wood industry in a biorefinery context. The production of cellulosic bioethanol and lignin based on a pre-treatment process that can be transposed to an industrial scale was studied. Our work, carried out on a laboratory scale, focused on (1) optimization of pre-treatment by steam explosion (SE), (2) extraction of lignin from exploded wood by percolation with ethanol as solvent, (3) characterization of biopolymers (cellulose and lignin) and study of the impact of pre-treatment parameters on their chemical structure, and (3) conversion of pre-treated wood to ethanol by enzymatic hydrolysis and fermentation.

We were first interested in optimizing the different parameters of the SE process (particle size, preimpregnation, SE residence time and temperature) concerning the glucose, xylose and lignin contents of the exploded wood. The impact of the process on the production of sugar degradation products (furfural and HMF) potentially inhibiting enzymes and microorganisms was also studied. It was found that particle size is an important parameter to consider in process improvement, as fine particles lead to significant degradation of cellulose during pre-treatment. The influence of the concentration of acid, used to impregnate the biomass prior to SE, as well as process parameters (residence time and temperature) on the hydrolysis of biopolymers (lignin and hemicelluloses) was then studied. Conditions for optimizing cellulose contents (> 59%) in the pre-treated material were selected.

In order to better understand the impact of pre-treatment on the lignin extracted from exploded wood and to anticipate future SE lignin utilizations, spectroscopic (HSQC and ^{31}P NMR) and chromatographic (SEC) analyses were carried out. A decrease in $\beta\text{-O-4}$ content is observed with the increase in the severity of the treatment of SE with an almost total degradation of the $\beta\text{-O-4}$ units under conditions of highest severity ($T = 210^\circ\text{C}$, $t = 2.5$ min and $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0.5\%$). Recondensation of lignin through radical coupling processes was also observed. The celluloses of the different solid fractions recovered after EV treatment were also characterized by SEC, DRX to study the impact of the treatment and to identify the key parameters in the improvement of the efficiency of cellulose to glucose conversion. An increase in crystallinity with increasing severity was observed with a significant drop in cellulose DP for acid impregnated SE.

The enzymatic digestibility of cellulosic residues after SE and lignin extraction by *T. Reesei* was studied. The main parameters positively affecting the enzymic reactivity are the removal of part of the non-cellulosic polymers and the drop of cellulose DP. At high SE severity, a decrease in reactivity was attributed to the formation of pseudolignins. The optimal conditions for SE before enzymatic hydrolysis are as follows: $T = 210^\circ\text{C}$, $t = 5$ min and $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0.25\%$. Good fermentability of the hydrolysates by *Saccharomyces Cerevisiae* was obtained. From 100 Kg of okoumé sapwood, it is possible to produce 11.9 Kg of ethanol.

Key words: *Aucoumea klaineana* Pierre, steam explosion, enzymatic hydrolysis, fermentation, cellulosic ethanol

Introduction générale

Parmi les conséquences de la crise financière ayant touché la zone Asie en 1998 et en 2001, la réduction du commerce des bois provenant d'Afrique tropicale, vendus sous forme de grumes dans des pays tels que la Malaisie et la Chine demeure la plus marquante. La mévente de cette ressource stratégique, dont les entrées en devise se chiffrent à plus de 17 millions USD², a constitué pour le Gabon, un véritable manque à gagner dont la contribution du secteur (filère bois, industrie et exportation) dans le PIB est passé de 2,3% =237 millions USD (2005) à 3,8% =362 millions USD (2015) (Banque Mondiale, 2016). De plus, la chute du prix du pétrole de 1998 et 2008 a freiné significativement l'économie non pétrolière du pays, entraînant par exemple une contraction de 11% de la croissance du PIB non pétrolier en 1999. La baisse des cours du pétrole de 2014-2015 a également eu un effet très important sur l'activité non pétrolière (Mecagni et al., 2015). Tout cela témoigne de la vulnérabilité du Gabon fortement dépendant du pétrole dont les recettes d'exportation représentent depuis des années environ 85% et 40% du PIB, tandis que celles du secteur tertiaire tournent autour de 30% (Mbadinga, 2006), ce qui traduit une fragilité des institutions, des structures de gouvernances et le manque de profondeur du secteur financier.

Parmi les leçons tirées de ces crises, une réorientation de la politique forestière, fondée sur le développement d'une industrie tournée vers la transformation plus poussée du bois en produits finis est nécessaire. Ainsi, le gouvernement a adopté en 2001 un nouveau code forestier définissant un nouveau cadre de développement de la filière, avec pour objectif la transformation de près de 75% des grumes à l'horizon 2010. Pour appuyer ces mesures le gouvernement gabonais a interdit en 2010 les exportations de grumes, contraignant ainsi les compagnies forestières à augmenter leurs activités en aval, notamment leurs activités de deuxième transformation, qui transforment le bois brut en matériaux, comme le contreplaqué. Cette initiative semble montrer son efficacité à ce jour. En effet selon la Banque Mondiale (2016), suite à cette mesure, le nombre d'installations serait passé de 82 unités en 2009 à 135 en 2014. Aussi, le gouvernement gabonais, membre de la COMIFAC³ et de l'OIBT⁴, a lancé plusieurs formations visant à développer la filière bois-transformation. C'est ainsi qu'en 2013 débuta le projet RIFFEAC⁵, mené en partenariat avec l'université Laval avec l'appui financier de la BAD⁶ dont l'objectif est de développer le secteur de la transformation du bois et les activités connexes.

L'industrie forestière semble être un domaine porteur pour le Gabon. La production nationale de bois débité (sciage, contreplaqués et placages) est passée de 600 000 m³ en 2007 à 720 000 m³ en 2014, soit une augmentation de 20% (Banque Mondiale, 2016). Mais une quantité considérable de déchets issus des différents segments industriels (cœur d'okoumé, copeaux, dosses de sciage etc.) à laquelle s'ajoutent les grumes déclassées et les houppiers abandonnés en zone d'abattage constituent de nos jours une ressource considérable mal exploitée. Une des seules voies actuelles de valorisation au Gabon consiste en la production artisanale de charbon de bois destiné pour la cuisson et le séchage traditionnel des aliments.

Cette sous-utilisation du bois (ressource lignocellulosique) montre la nécessité d'envisager d'autres voies de valorisation des déchets de la filière bois parmi lesquelles, leur utilisation pour la production de biocarburant.

² Dollars US

³ Commission des Forêts d'Afrique Centrale

⁴ Organisation Internationale des Bois Tropicaux

⁵ Réseau des Institutions de Formation Forestière et Environnementale de l'Afrique Centrale

⁶ Banque Africaine de Développement

En effet, la biomasse est définie comme une matière issue du vivant de laquelle l'on peut obtenir de l'énergie par combustion ou fermentation. Le carbone de la biomasse constitue ainsi la principale source d'énergie renouvelable (Wackett et al., 2009). Cette voie de valorisation concerne les biocarburants, les biocombustibles et les biogaz visant à remplacer le carbone fossile pour produire de la chaleur ou de l'électricité. Les biocarburants sont à cet effet une solution et une opportunité pour résoudre le problème économique de la dépendance aux ressources pétrolières. De plus, ils présentent un double intérêt à l'échelle globale. Premièrement, la formation de la biomasse utilise le carbone présent dans l'atmosphère, à la différence de l'usage des énergies fossiles qui augmentent la teneur en carbone dans l'atmosphère. Dans un deuxième temps, leur production écarte le risque d'entrer directement en compétition avec la filière alimentaire, contrairement aux biocarburants de première génération, et de contribuer à accentuer la crise alimentaire déjà criante en Afrique. Certains pays de l'Afrique investissent actuellement dans l'industrie des biocarburants et notamment le bioéthanol issu de la transformation de la canne à sucre : c'est le cas de pays de l'Afrique australe tels l'Angola, l'Ethiopie, le Kenya, l'Île Maurice, le Malawi, le Swaziland, la Zambie et le Zimbabwe.

Dans l'état actuel de l'organisation de la filière bois tant au Gabon que dans les principaux pays producteurs de bois en Afrique, à l'exception de l'Afrique du Sud, aucune solution de valorisation viable des déchets des industries du bois n'existe. Cela représente donc une réelle opportunité de valorisation énergétique des déchets de la biomasse issue de l'exploitation forestière et des activités de transformation du bois. Le développement d'une stratégie de valorisation énergétique des déchets des industries du bois dans les pays du Bassin du Congo peut prendre pour point d'encrage la production d'éthanol cellulosique. La réalisation de cet objectif favorisera des études plus poussées sur le potentiel énergétique de différentes essences de bois ainsi que d'autres sources lignocellulosiques au potentiel méconnu du Gabon.

L'étude de la production d'éthanol cellulosique est aujourd'hui en pleine expansion en Amérique, en Europe et en Asie (Chine). Le concept de bioraffinerie, né dans les années 1980, rencontre un regain d'intérêt face aux préoccupations environnementales et aux évolutions du prix des ressources fossiles liées à leur épuisement subséquent. Il repose sur le modèle de la bioraffinerie pétrolière qui utilise du pétrole brut. De la même façon, ce concept consiste à fractionner la plante puis à purifier et à transformer les différents éléments (celluloses, lignine et hémicelluloses) afin d'obtenir des produits à usages divers.

Cependant, de nombreux verrous technologiques subsistent pour une production massive, rentable et sûre car la production est plus difficile à l'échelle industrielle, en raison de la complexité structurelle de la biomasse. En effet, la biomasse lignocellulosique est un substrat complexe, constitué de trois principales fractions étroitement liées que sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Le procédé de production de bioéthanol consiste à fractionner la biomasse par prétraitement puis à récupérer par hydrolyse une teneur maximum de sucres (monomères) issus à la fois des fractions cellulosiques et hémicellulosiques, puis à fermenter ces sucres en éthanol.

Les premiers procédés d'hydrolyse utilisés étaient surtout chimiques, mais ils sont peu compétitifs à l'heure actuelle, en raison notamment du coût des réactifs et de la formation de nombreux sous-produits, et de composés inhibiteurs rendant les hydrolysats peu fermentescibles (Ando et al., 2006; Nishikawa et al., 1988; Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000a, 2000b; Van Zyl et al., 2011). Ils sont désormais concurrencés par les procédés enzymatiques, plus spécifiques et qui

permettent d'atteindre des meilleurs rendements d'hydrolyse dans des conditions moins sévères (Ogier et al., 1999).

L'utilisation des polysaccharides pour la production d'éthanol cellulosique nécessite alors une étape de prétraitement visant à extraire, et à séparer les trois biopolymères précédemment cités à fin d'améliorer leur accessibilité pour l'hydrolyse enzymatique.

Plusieurs types de traitements physiques et/ou chimiques de conversion et de valorisation de la biomasse ont été proposés : explosion à la vapeur (Ballesteros et al., 2006, 2002; Boussaid et al., 2000; Söderström et al., 2005), traitement à l'acide sulfurique (Lloyd et Wyman, 2005; Willför et al., 2005), organosolv (El Hage et al., 2009; Hasegawa et al., 2004; Pan et al., 2006), au dioxyde de carbone et à l'ammoniac (Foster et al., 2001) et à l'hydroxyde de sodium/peroxyde d'hydrogène (Chang et al., 1998).

Ainsi, parmi les diverses méthodes de prétraitement actuellement étudiées, le traitement par explosion à la vapeur semble être très prometteur et l'un des seuls actuellement envisageable pour la production de bioéthanol cellulosique à l'échelle industrielle. (Ballesteros et al., 2002, 2006; Boussaid et al., 2000; Brownell et al., 1986; Grous et al., 1986; Josefsson et al., 2002; Kataria et al., 2017a; Li et al., 2009a; Söderström et al., 2005; Tanahashi et al., 1983a; Wang et al., 2009a).

La notion de transfert de connaissance des lieux de formation vers les entreprises étant un pont indispensable dans l'évolution de toute civilisation, principe transcrit dans le nouveau code forestier gabonais, il nous a semblé utile de proposer une réponse à cette exigence, en développant ce projet de thèse. L'objectif de ce travail est donc d'effectuer une étude de la valorisation dans un contexte de bioraffinerie des produits connexes de l'industrie du bois d'okoumé. Pour ce faire, nous nous intéresserons à la production de bioéthanol cellulosique en nous basant sur un procédé de prétraitement transposable à l'échelle industrielle. Nos travaux, réalisés à l'échelle du laboratoire, portent sur (1) l'optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur, (2) la conversion du bois prétraité en éthanol par hydrolyse enzymatique et fermentation, (3) l'étude de l'impact du traitement sur la structure de la lignine et de la cellulose.

Cette étude s'articule comme suit : la première partie présentera le contexte et une revue bibliographique. Dans la deuxième, nous présenterons les matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Les résultats seront présentés et discutés dans les derniers chapitres.

Chapitre I. Contexte et revue bibliographique

1. Généralités sur l'okoumé, sur les matériaux lignocellulosiques, procédés d'extractions des lignines et techniques d'analyses de la lignine et de la cellulose

Introduction

L'okoumé est une essence à croissance rapide que l'on rencontre particulièrement au Gabon. Cette essence a gagné un intérêt particulier dès les années 1995 pendant lesquelles le Gabon a entrepris un vaste programme d'industrialisation de la filière bois. En 2010, suite à la crise qui a touché la zone Asie en 1998, une réorientation de la politique a abouti à l'interdiction d'exportation des grumes afin de résoudre ce problème de fragilité économique. Il s'en est suivi un développement d'unité de transformation de déroulage et de tranchage, générant ainsi d'énormes quantités de biomasse disponible en tant que coproduits. Le Gabon a également intégré plusieurs programmes de recherche sous régionaux visant à transformer le bois de manière plus poussée.

Cette essence phare de la filière bois du pays dont la part dans la production nationale en bois s'élève à 58% (2012) a fait l'objet de nombreuses études. L'essentiel des travaux sur cette essence traite:

- des tentatives de domestication en 1935 (Brunck et al., 1990),
- de la caractérisation chimique (Savard et al., 1959),
- des caractérisations papetières (Doat, 1972),
- de la caractérisation de l'oléorésine (Minkué, 2000, (Bédounguindzi et al., 2020; Medzegue et al., 2013),
- de la caractérisation des composés volatiles (Koudou et al., 2009),
- de la caractérisation des tanins condensés (Engozogho Anris et al., 2020)
- de l'étude structurale de la lignine et de la cellulose (Safou-Tchiama, 2005a; Safou-Tchiama et al., 2017; Tchiama et al., 2019),
- de l'étude de la durabilité naturelle (Tchiama et al., 2018),
- de la mesure des paramètres technologiques (Medzegue et al., 2007),
- des propriétés physique et mécanique (Pambou Nziengui et al., 2018) , etc.

Des travaux préliminaires, sur le prétraitement Organosolv des coproduits de l'industrie du bois pour une valorisation type bioraffinerie, réalisée dans le cadre d'un stage de Master II, ont donné lieu à une publication (Ngwa et al., 2016). Mais aucune étude n'a encore été entreprise sur le prétraitement par explosion à la vapeur. Avant d'entreprendre l'étude de l'optimisation du prétraitement, il était indispensable de connaître l'essence au sens écologique, anatomique et chimique.

1.1. Origine et répartition de l'okoumé

La limite de l'aire naturelle de l'okoumé demeure assez ambiguë. Un regroupement de nombreux travaux réalisés par Brunck (1990), donne un tracé de cette probable limite (**figure 1**). L'okoumé est présent dans la majeure partie du Gabon, depuis la côte jusqu'à une ligne passant par

Okondja à l'Est et entre Mitzi et Oyem au Nord du Gabon. Vers le Sud, l'okoumé est présent au Congo dans le massif du Chaillu situé au Nord-Est du Niari, ainsi que dans une zone littorale atlantique au Nord de l'estuaire du Kouilou dans le massif de Mayombe. Au Nord du Gabon, on le rencontre sur la presque totalité de l'ensemble de la Guinée équatoriale, sauf dans deux poches au Nord-Est et Nord-Ouest de ce pays. L'okoumé est également rencontré dans des zones localisées au Sud du Cameroun dans la région de Maan et Nyabessan. Dans son aire naturelle, l'okoumé pousse à toutes les altitudes et est présent sur des types de sols variés : sols hydromorphes de fonds de vallées et sur tous les types de sols ferralitiques rencontrés au Gabon. Les services forestiers gabonais des zones dites d'exclusion de l'okoumé font état de la production de cette essence dans ces zones et une expérimentation par un particulier en cours dans les environs de Minvoul (Nord du Gabon) donne de bons résultats.

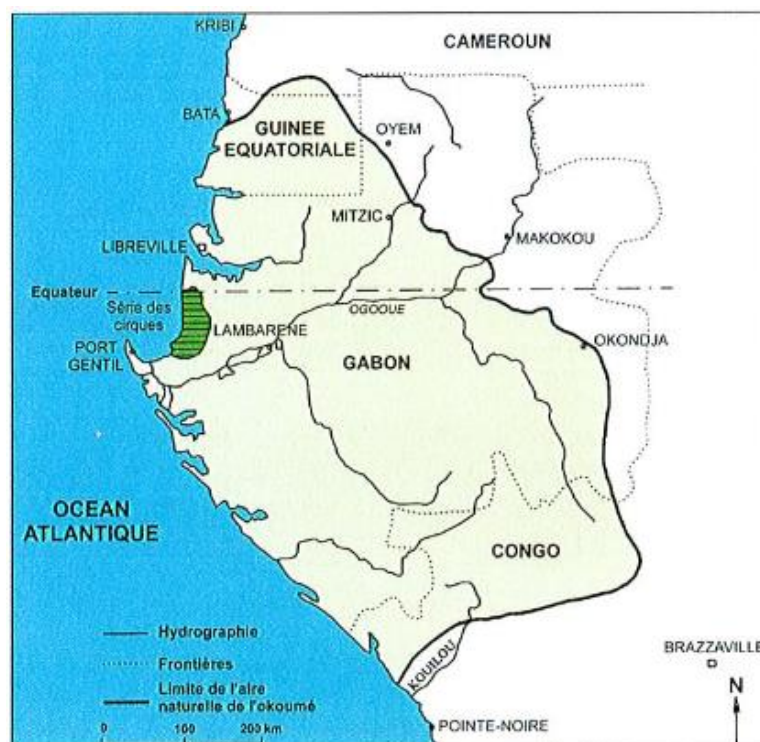


Figure 1: Aire naturelle de l'okoumé tracée par CTFT (Brunck et al., 1990)

1.2. Production et rendement matière (quantité de déchets produit/an)

En l'absence de toutes nouvelles études statistiques sur la productivité de l'okoumé au Gabon, nous nous en tiendrons aux informations antérieures pour comprendre l'intérêt économique porté sur cette essence. L'exploitation de bois au Gabon à but commercial et industriel a commencé avant 1900. Elle était concentrée dans la zone côtière qui constitue aujourd'hui la première zone forestière du Gabon. Les exploitants recherchaient en particulier certaines essences telles que : Padouk (*Pterocarpus soyauxii*) utilisé principalement pour la teinture, Ebène (*Diospyros crassiflora*) utilisé pour la sculpture, Azobé (*Lophira alata*) encore appelé bois de fer utilisé pour les rails de chemin de fer et certaines essences comme Acajou (*Khaya ivorensis*), Bilinga (*Nauclea*

diderrichii), Dibetou (*Lovoa trichilioïdes*), Iroko (*Milicia excelsa Berg*), Kevazingo (*Guibourtia tessmannii*), Tali (*Erythrophleum ivorense*), utilisées en ameublement et menuiserie intérieure.

L'introduction de l'okoumé comme essence (au sens forestier) est à l'origine de l'évolution rapide de l'exploitation forestière au Gabon. L'extraction de cette essence commence en 1889, à la suite des conclusions de l'expertise faite sur la bille d'okoumé envoyée à Hambourg, par le gérant de la maison de commerce Woerman, Emile Schultz, Consul d'Allemagne à Libreville. Il est dit de cet arbre qu'il présente un « bois d'excellente qualité.... pouvant se prêter aux plus nombreuses applications... » (Lasserre, 1957). Depuis cette date l'okoumé n'a cessé de dominer les exportations de bois devenant ainsi l'essence phare du Gabon. La part de la production forestière s'élevait à 90% pour un volume de production globale de 2,8 millions de m³ à 1 million de m³ pour la période de 1980 à 2004 (Direction Générale des eaux et Forêt, 2005).

La production de grumes au Gabon est passée de 2,7 millions en 2009 à 1,6 millions en 2015, soit une baisse de 45% en lien avec la baisse du marché des bois tropicaux. A partir de 2009, date de l'entrée en vigueur de l'interdiction d'exporter les grumes, l'exportation de grumes représentait un volume de 1,6 millions de m³ soit plus de 60% de la production nationale. Mais de 2010 jusqu'à ce jour plus aucune grume n'est exportée (**figure 2**).

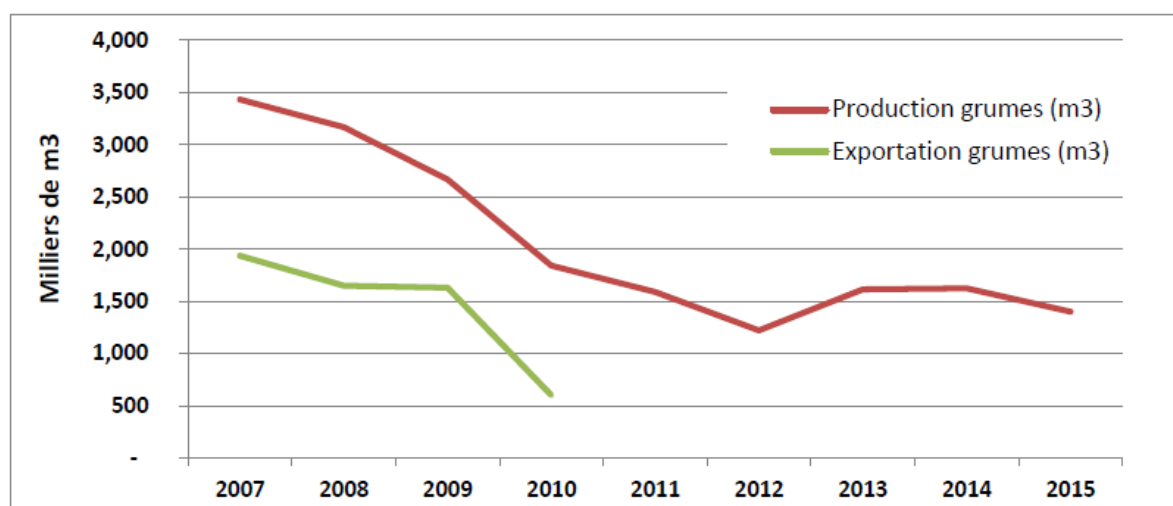


Figure 2: Evolution de la production et exportation de grumes au Gabon entre 2007 et 2014.
D'après le Ministère des Eaux et Forêts du Gabon, 2016.

1.3. Commerce du bois

Les exportations de grumes connaissent pratiquement les mêmes fluctuations que la production. Au moment de l'entrée en vigueur de l'interdiction d'exporter les grumes, 60% de la production nationale de grumes étaient exportés, soit 1,6 millions de m³ (**figure 3**). Cependant, force est de constater l'arrêt total des exportations de grumes dès 2010. Elle marque la concrétisation de l'objectif 2025 en vue de transformer localement plus de 75% de la production forestière. Ces grumes débitées localement sont exportées principalement sous trois formes : en sciages, en plaquages et en contreplaqués. En partant des productions disponibles, la part des grumes

transformées serait répartie à 62% pour la scierie, 6% pour les unités de contreplaqués et 20% pour les unités de placage. Cette répartition ainsi que la proportion de production exportée (autour de 75 à 85%) est assez similaire à la situation avant l'interdiction d'exporter les grumes.

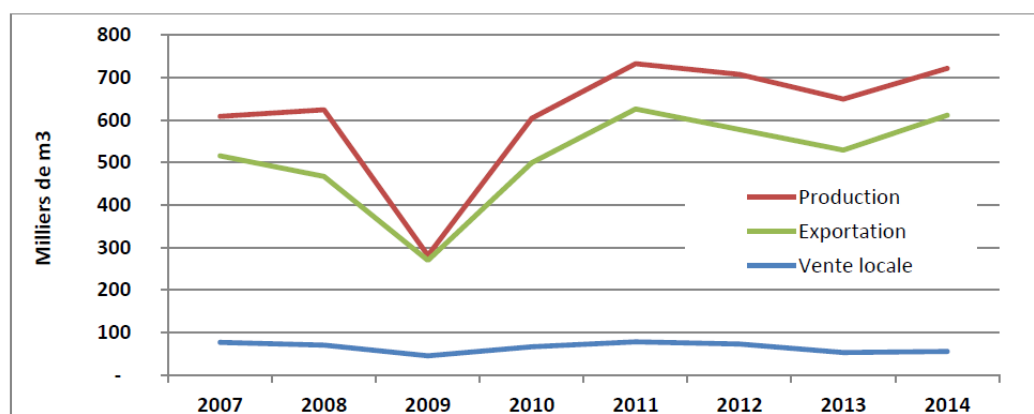


Figure 3: Evolution des volumes de bois débités (production, exportation, vente locale) au Gabon entre 2007 et 2014. D'après TBE⁷ et publié par la DGI⁸

1.3.1. Production et exportation de sciages

La production de sciage est passée de 300 000 m³ avant 2009 à 450 000 m³ en 2014 (**Figure 4**). Cette augmentation est en lien direct avec l'arrêt d'exporter les grumes. Les exportations de sciage sont globalement en progression constante depuis 2011, avec une explosion des exportations à destination de la Chine et une faible progression des autres marchés (européens et nord-américains).

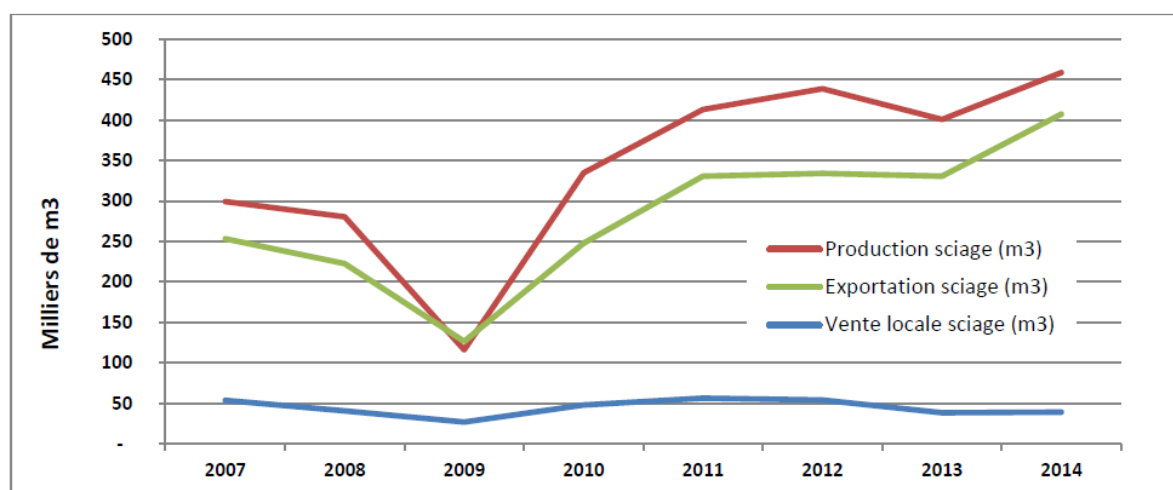


Figure 4: Evolution des volumes de sciages (production, exportation, vente locale) entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014)

⁷ Tableau de Bord de l'Economie

⁸ Direction Générale des Impôts

1.3.2. Production et exportation de placages

La production en placage (2014) se situe autour de 200 000 m³. La majorité du placage est exportée, une partie étant toutefois orientée vers la production intérieure de contre-plaqué (7 000 m³). Le Gabon est le premier exportateur de placage en Afrique Centrale. Après une baisse des exportations observée en 2012/2013 liée à la baisse de la demande en placage d'okoumé pour les industries de déroulage d'Europe, on note une légère augmentation des exportations sur 2014/2015 (**figure 5**). L'essentiel des placages produits en Afrique Centrale (60%) est consommé en Europe (essentiellement la France). On observe cependant un intérêt grandissant des marchés asiatiques (Inde, Chine) pour le placage d'okoumé.

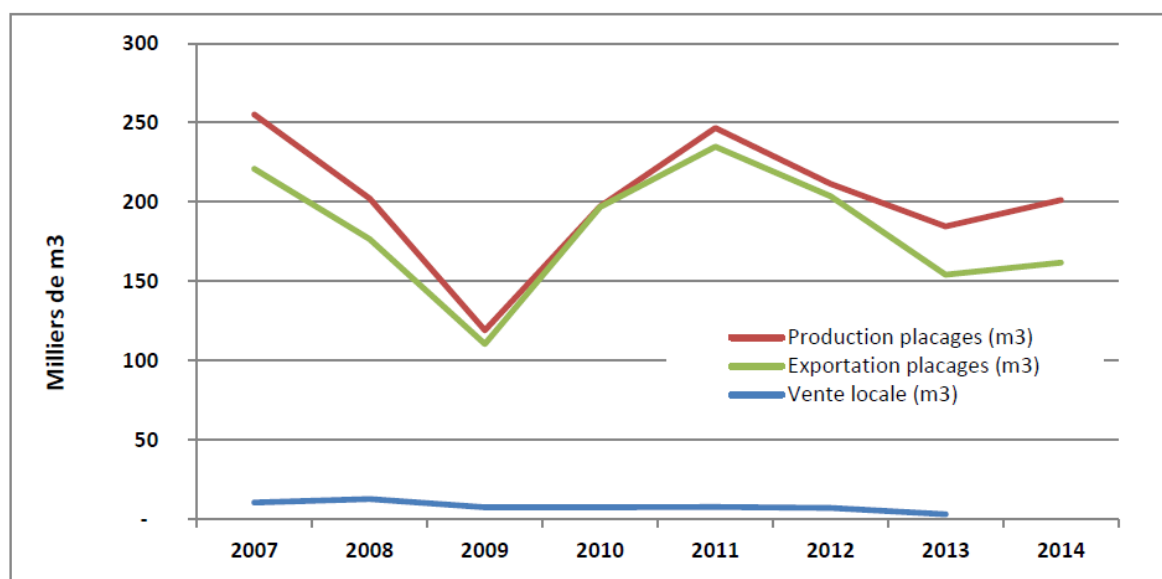


Figure 5: Evolution des volumes de placages (production, exportation, vente locale) entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014)

1.3.3. Production et exportation de contre-plaqué

Bien que sa production en contreplaqué reste insignifiante à l'échelle mondiale (40 000 m³ exportés en 2014), le Gabon, est l'exportateur le plus important d'Afrique Centrale. La décision d'interdire l'export de grumes n'a pas eu de conséquence significative sur l'augmentation de la production et l'exportation de contreplaqués car les volumes exportés restent à des niveaux équivalents à ceux d'avant l'interdiction d'exporter les grumes (**figure 6**).

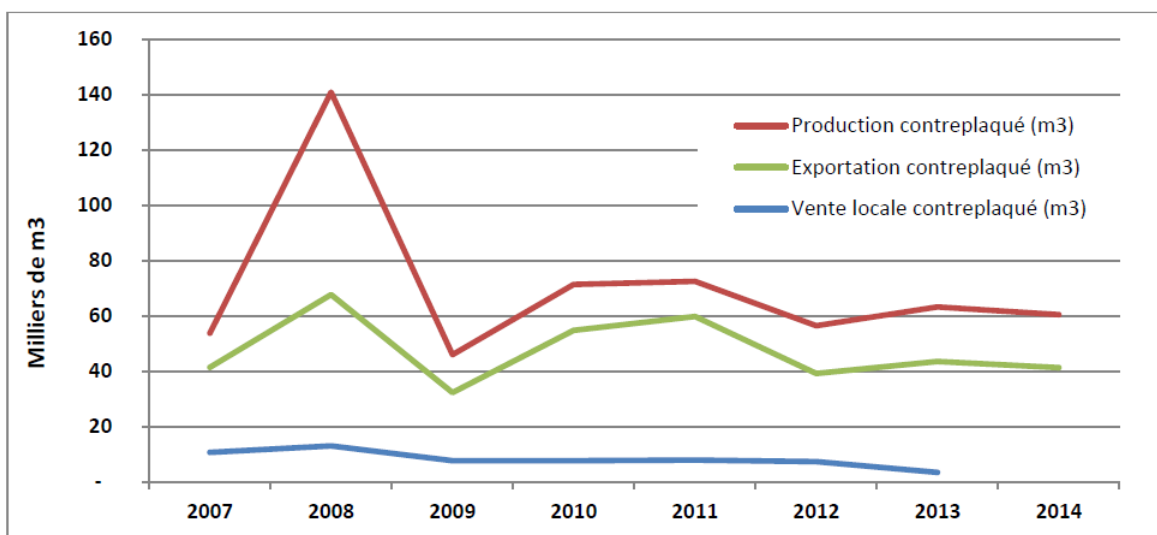


Figure 6: Evolution de la production, exportation et vente locale de contre plaqués entre 2007 et 2014. D'après TBE et DGI (2014)

1.4. Description du bois

Le bois se distingue des autres matériaux par son origine biologique. Ce matériau est issu d'un végétal Spermatophyte (production de graines) que les systématiciens subdivisent globalement en deux catégories : les Gymnospermes, plus communément appelé conifères ou arbres à bois tendre et les Angiospermes, nommés feuillus ou arbres à bois dur. Chacune de ces deux classes renferment des milliers d'espèces ou essences différentes.

Le bois ayant une forte variabilité entre deux espèces, deux individus, ou au sein d'un même individu, de nombreuses caractéristiques ont été étudiées pour essayer de comprendre ses mécanismes de formation, sa composition etc. Le bois peut être caractérisé anatomiquement, physiquement, chimiquement et enfin mécaniquement.

Dans cette étude nous mettrons un accent particulier sur la caractérisation chimique des coproduits des industries forestières. Produit par l'arbre par photosynthèse, le bois est un matériau naturel défini différemment selon l'utilisateur et l'intérêt porté. Pour le chimiste, le bois est un matériau lignocellulosique composé essentiellement de trois familles : les polysaccharides, la lignine et les extractibles. Notons toutefois qu'au sein d'un même arbre les propriétés du bois vont dépendre de la position dans l'arbre de la fraction étudiée. Le bois formé par un cambium jeune appelé bois juvénile a généralement des propriétés assez différentes du bois adulte (bois formé plus tard). Sur le bois adulte on remarque aussi des différences de propriétés entre le duramen et l'aubier (bois récemment formé) qui contribue encore à l'activité de l'arbre. Ces différences sont dues à la synthèse de constituants chimiques nouveaux à la frontière de zones de bois plus ancien (en vue d'une résistance contre les organismes et microorganismes).

1.4.1. Structure anatomique du bois

L'étude du matériau bois nécessite la définition de l'échelle de la description (Detienne, 1988). Plusieurs échelles dans l'anatomie du bois peuvent être utilisées, allant de l'échelle macroscopique de l'arbre ou de grume définis comme un échantillon comportant plusieurs types de tissus, à l'échelle moléculaire des différents constituants (**figure 7**) (Clair, 2001).

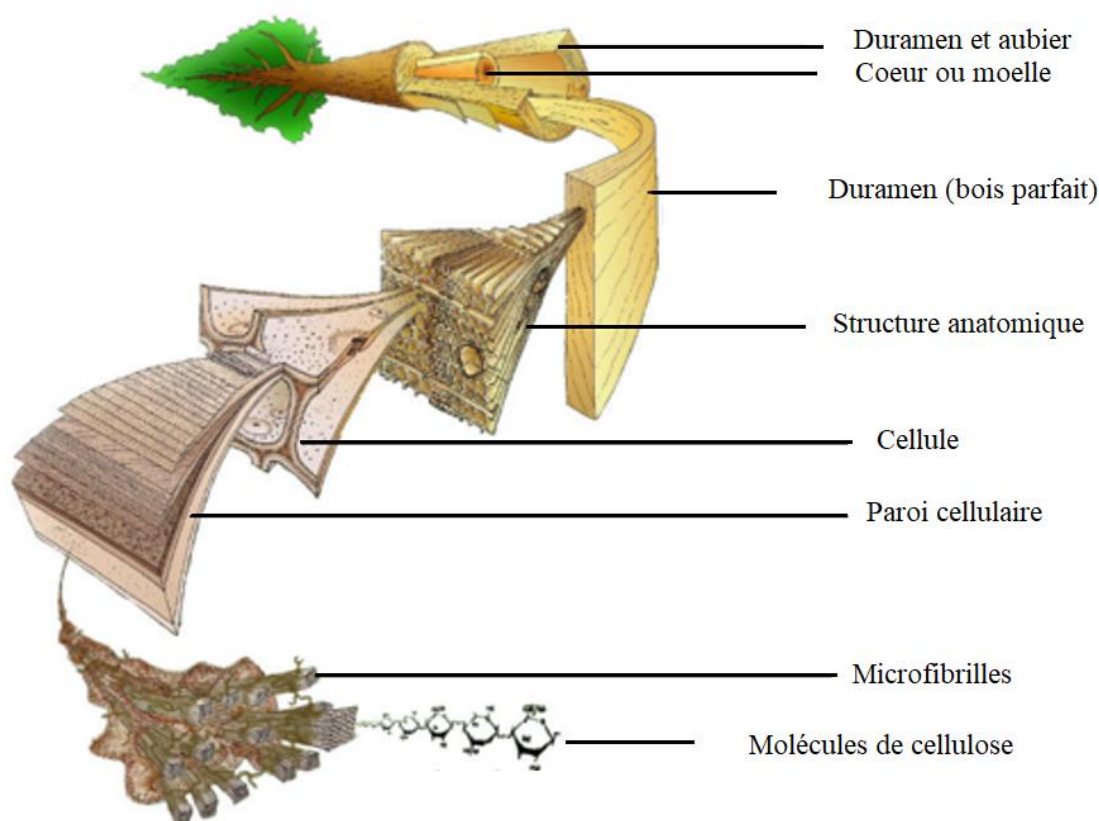


Figure 7: Illustration de l'organisation multi-échelle de la matière lignocellulosique (Clair, 2001)

1.4.1.1. Echelle macroscopique

Le bois est constitué généralement de l'aubier et du duramen (**figure 8**). L'aubier est la partie fonctionnelle du bois : il renferme les cellules vivantes et les matières de réserve (amidon). Au fil des années, il se transforme en bois parfait, en passant par une zone de transition que l'on peut distinguer selon les essences, car elle est variable au cours d'un cycle de duramenisation (Bergström, 2000). Le bois parfait peut avoir une teinte distincte de l'aubier (on parle de duramen, généralement de couleur foncée) c'est par exemple le cas de l'okoumé (*Aucoumea klaineana* Pierre), du chêne (*Quercus sp*) ou du pin maritime (*Pinus pinaster*) (Pinto et al., 2004). Parfois, le bois parfait ne se duramenise pas et il ressemble à un prolongement de l'aubier, c'est le cas par exemple du Doussié (*Afzelia africana*)(Jourez, 2010).



Figure 8: Section transversale de l'Okoumé.

1.4.1.2. Echelle microscopique

A cette échelle microscopique submillimétrique, les observations montrent l'organisation cellulaire au sein des cernes. La cellule est l'élément de base de la structure du bois. Ses dimensions et sa géométrie sont étroitement liées à sa fonction dans l'arbre. Les cellules assurant le soutien mécanique sont les fibres et constituent l'élément le plus étudié. Elles mesurent 1 à 3 mm de long et présentent des diamètres de 20 à 50 μm . L'origine biologique induit une variabilité des formes cellulaires et de l'organisation des tissus caractéristiques de l'espèce (**figure 9**) avec quelques variations résultant de l'adaptation en réponse aux besoins naturels et aux conditions environnementales de l'arbre.

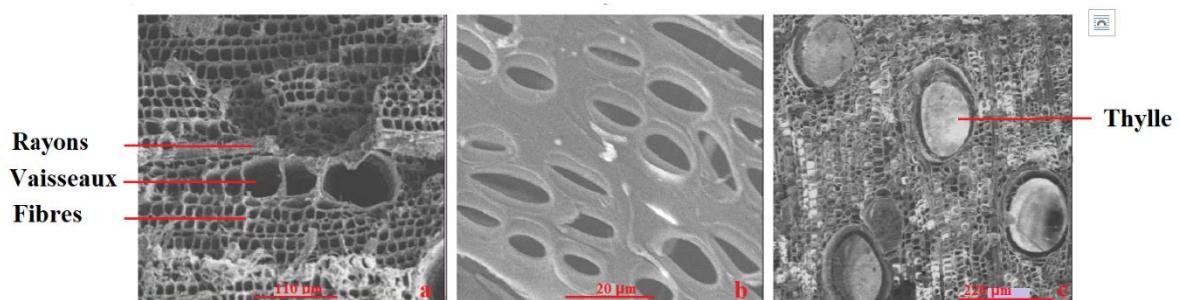


Figure 9: Tissus fibreux et éléments de vaisseaux de l'okoumé. D'après Medzegue (2005)

1.4.1.3. Echelle pariétale

A cette échelle, la paroi des cellules, épaisse de quelques micromètres, s'organise en couches concentriques autour du lumen comme le montre la **figure 10** (Montero, 2010). Lorsqu'elle a atteint sa dimension définitive, la cellule dépose sur la paroi primaire une couche plus épaisse. C'est au niveau de cette paroi que se trouve la quasi-totalité des polysaccharides du matériau bois. Généralement, la paroi secondaire se compose de trois couches : S₁, S₂, S₃.

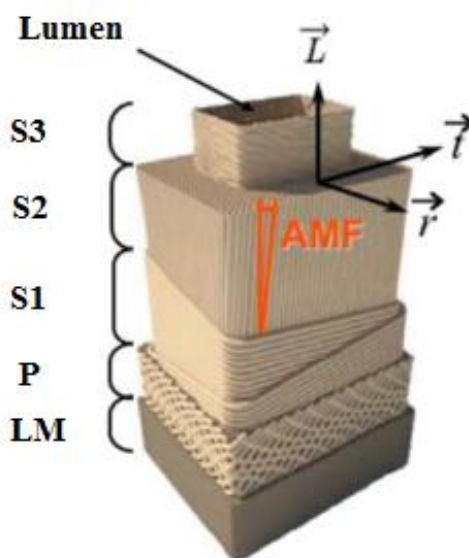


Figure 10: Illustration d'une cellule de bois avec l'organisation des différentes couches de paroi cellulaire. D'après Montero (2010).

LM: lamelle mitoyenne, P: primaire, S: secondaire, représentation de l'angle des microfibrilles (AMF) et du repère orthotrope local.

1.4.1.3.1. La paroi primaire

La paroi primaire apparaît dès la fin de la division cellulaire. C'est une couche très fine mesurant entre 0,1 et 0,2 μm . A l'état vert cette couche contient beaucoup d'eau. Ainsi, alors que son épaisseur est déjà très faible, le retrait dû séchage peut réduire son épaisseur jusqu'à 0,03 μm . le retrait radial total de l'okoumé étant de 3% environ par rapport à l'état saturé (Medzegue, 2007). Elle contient un taux de cellulose relativement faible et elle est constituée de plusieurs couches de cellulose enchevêtrées dans lesquelles se déposent de la lignine, des substances pectiques et des hémicelluloses. Il y a une absence d'organisation préférentielle dans ces premières couches. L'ensemble constitué de lamelle mitoyenne et des parois primaires des deux cellules adjacentes est la lamelle moyenne.

1.4.1.3.2. La paroi secondaire

Elle se dépose sur la paroi primaire, c'est une couche d'épaisseur relativement dense et rigide contenant une forte proportion de cellulose. Par sa structure et son volume, elle constitue la partie la plus résistante mécaniquement. Elle présente une structure en couches déposées successivement dans lesquelles les microfibrilles de cellulose s'orientent en structures parallèles. On distingue ainsi :

La couche S1 :

Dans la couche S1, les microfibrilles de cellulose sont disposées en hélices. Son épaisseur est de 0,1 à 0,35 μ m et représente 5 à 10% de l'épaisseur totale de la membrane cellulaire. L'angle des microfibrilles (AMF, **figure 10**) par rapport à la verticale est de l'ordre de 60 à 80°.

La couche S2 :

Elle constitue la partie la plus volumineuse de la paroi, son épaisseur pouvant varier de 1 à 10 μ m, elle représente 75 à 80% de l'épaisseur de la paroi cellulaire. Elle est formée d'une organisation dense de lamelles de microfibrilles de cellulose en hélices parallèles dont l'angle par rapport à l'axe de la cellule est de l'ordre de 5 à 30° dans le bois normal et peut monter à 45° dans le bois juvénile. L'orientation de la matière et l'importance de cette couche qui forme la masse essentielle de la cellule, sont largement responsables du comportement physique de la paroi cellulaire de la cellule ligneuse.

La couche S3 :

Dans la couche S3, les microfibrilles sont aussi disposées en lamelles, mais moins strictement parallèles entre elles que dans la couche S2. Leur orientation générale est de 60 à 90° par rapport à l'axe de la cellule. Cette couche est relativement mince, son épaisseur est de l'ordre 0,5 à 1,1 μ m.

1.4.1.4. Echelle moléculaire

On distingue trois constituants majeurs dans la paroi : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La cellulose est un polymère composé d'unités cellobioses reliées par des liaisons β -glycosidiques. Cette configuration lui confère une organisation linéaire et rigide. La présence de nombreux groupements hydroxyles en périphérie facilite l'organisation de ces chaînes qui se regroupent en amas pour former des nanofibres de cellulose. Les nanofibres sont constituées de

l'arrangement de fibrilles élémentaires de cellulose sous forme cristalline (dont le taux de cristallinité peut varier selon les essences) avec localement des zones amorphes (**figure 11**).

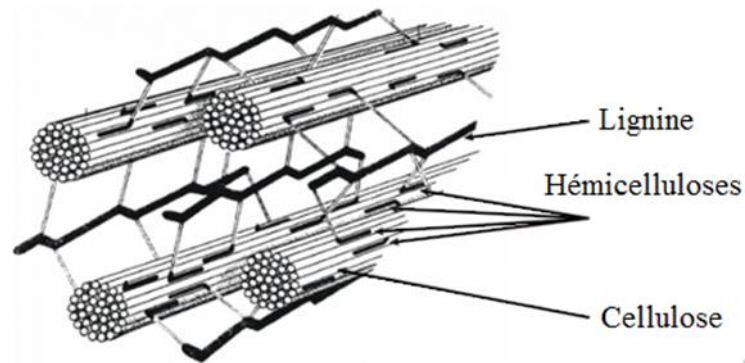


Figure 11: Représentation schématique de l'organisation cristalline des fibres de cellulose enchevêtrées de chaînes d'hémicelluloses amorphes (El Hage, 2010).

L'arrangement des microfibrilles au sein de la matrice d'hémicelluloses et de lignine met en œuvre des mécanismes complexes en raison de l'organisation en couches concentrique de la paroi (**figure 12**) (Navi and Heger, 2005).

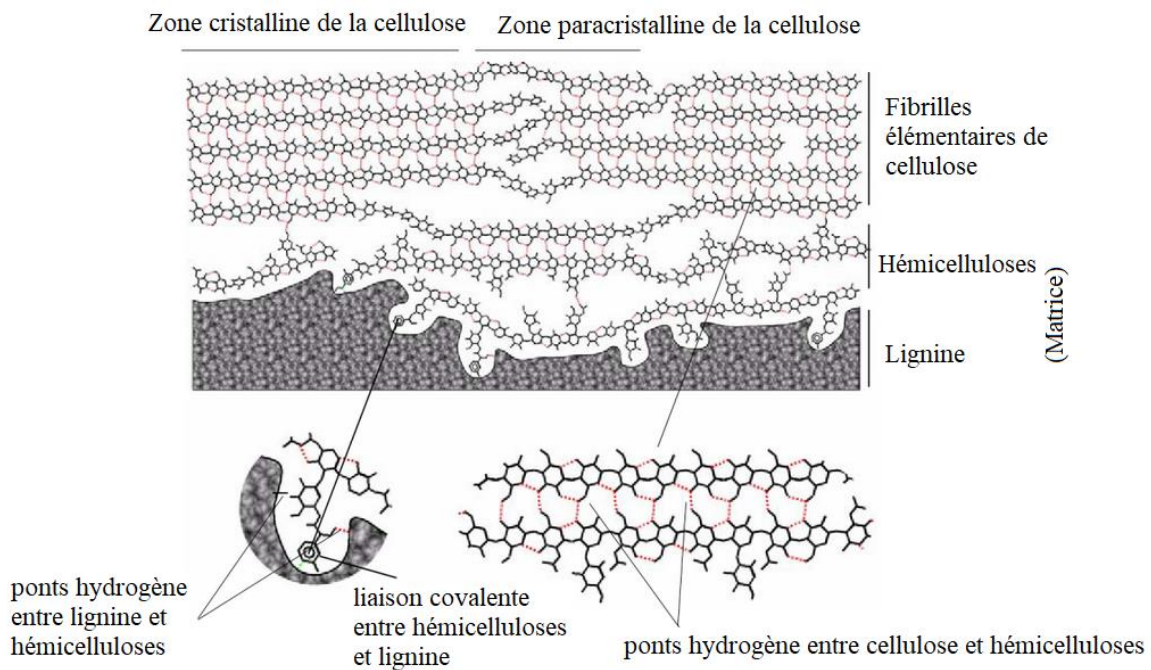


Figure 12: modèle détaillé de l'association des fibres de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine dans la paroi à l'état anhydre: section longitudinale (Navi et Hager, 2005)

1.4.2. Composition chimique du bois et structures des polysaccharides et de la lignine

La composition chimique du bois (matériau hétérogène) est complexe. Le bois est composé de trois biopolymères: la cellulose, les hémicelluloses, la lignine et des molécules libres organiques (extractibles) ou inorganiques (cendres). La proportion relative des différents constituants varie en fonction des essences de bois cependant leur ordre de prépondérance est généralement le même (**tableau 1**) (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a) .

Les polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et la lignine sont les principales substances macromoléculaires constituant le bois. On les trouve à 90% chez les essences tropicales et à plus 97% dans les essences des zones tempérées. Ces composés majoritaires, étant largement favorables aux végétaux (99%) par rapport aux animaux, constituent la quasi-totalité du carbone (96%) présent dans la matière organique vivante.

Tableau 1: Composition relative des différents constituants chimique des feuillus et résineux ,exprimée en pourcentage de matière sèche initiale (Condassamy, 2015a).

	Cellulose	hémicelluloses	lignine	extractibles
résineux	38-52	16-27	26-36	2-3
feuillus	37-57	20-37	17-30	3-5

1.4.2.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides comportent des structures de haut poids moléculaire, surtout la cellulose. Ils représentent environ 60 à 80% du poids sec de la matière lignocellulosique. Ils sont composés de cellulose et d'hémicelluloses. Ce mélange, encore appelé holocellulose, est le résidu solide obtenu par suite d'une délignification du bois.

1.4.2.1.1. La cellulose : Historique et structure

La cellulose a été découverte en 1838 par le chimiste français Anselme Payen. Plusieurs milliers d'années avant la découverte des sucres des parois cellulaires des plantes, la cellulose sous forme de bois, de coton ou plantes fibreuses était utilisée comme source d'énergie, de matériaux de construction ou comme fibre vestimentaire. Depuis les papyrus égyptiens, une part important de la culture de l'humanité a été écrite sur des matériaux cellulosiques.

La cellulose est le plus abondant biopolymère renouvelable à travers le monde. Ce polymère composé exclusivement d'unités d'anhydroglucose, est le principal composant du bois et constitue en général 40 et 45% de la masse sèche des plantes ligneuses (Malinen and Sjostrom, 1973). On le

rencontre généralement dans la paroi cellulaire des fibres de bois, principalement dans la paroi secondaire, où il remplit la fonction de composant structural.

La cellulose est un homopolymère linéaire constitué d'unités β -D-glucopyranose, liées entre elles par des liaisons glycosidiques en $\beta 1 \rightarrow 4$ (**figure 13**). Le motif de répétition de la cellulose est le dimère cellobiose constitué de deux monomères de glucopyranose.

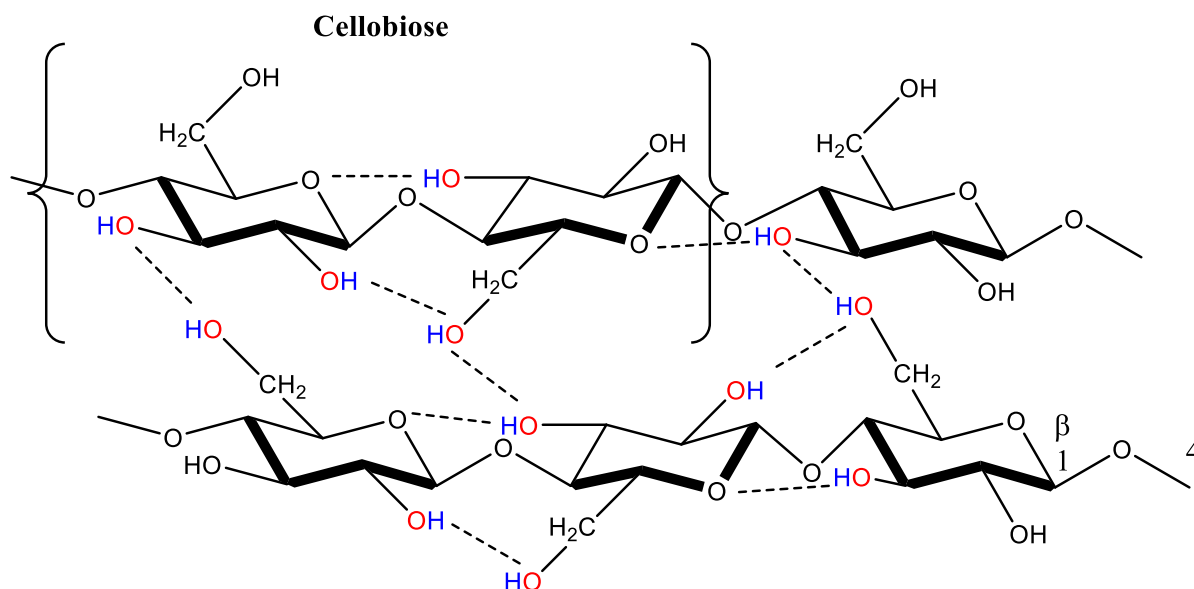


Figure 13: Structure d'une chaîne de cellulose

La structure moléculaire de la cellulose détermine ses propriétés caractéristiques : dégradabilité, réactivité chimique et hydrophilie. Le degré de polymérisation peut atteindre 15000 unités et l'indice de polydispersité est faible. Elle est également le siège d'un très grand nombre de liaisons hydrogènes qui lui confèrent une structure fibreuse partiellement cristalline. Les propriétés de la cellulose sont ainsi déterminées par son organisation supramoléculaire, cette dernière étant directement liée à l'organisation des microfibrilles (**figure 14**). La détermination de la structure de la cellulose est réalisée par diffraction des rayons-X (DRX), microscopie électronique (ME), en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire haute résolution du carbone 13 (RMN ^{13}C) et en diffraction des neutrons.

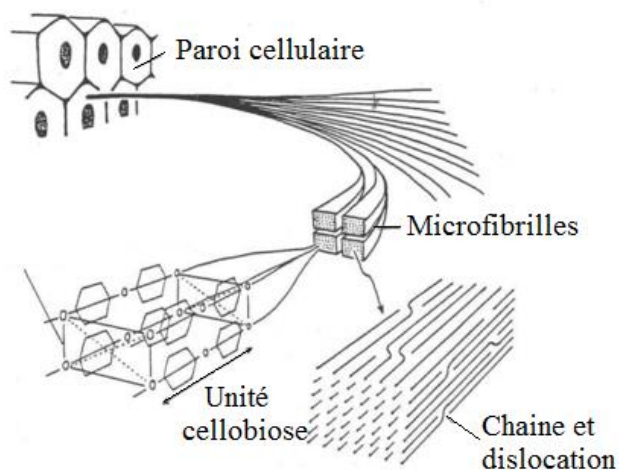


Figure 14: Organisation supramoléculaire des microfibrilles. Pris dans Safou-Tchiama (2005).

La structure cristalline de la cellulose, schématisée à la **figure 15** montre qu'elle est constituée, en plus de sa partie cristalline, d'une zone paracristalline et d'une fraction de vide qui joueraient un rôle important dans la pénétration et la diffusion des solvants. Des travaux récents ont également montré que les fibres de cellulose de l'okoumé ont des index de cristallinité faibles (59%) par rapport à d'autres essences (Béli = 68% et Douka = 71%) (Safou-Tchiama, 2005a).

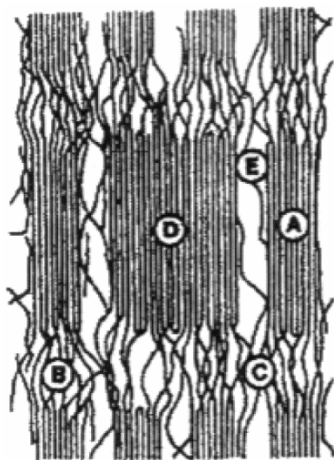


Figure 15: Structure fine des fibres de cellulose montrant les cristallites (A), des zones amorphes (B), des jonctions interfibrilles (C), les clusters (D) et des espaces vides (E) Pris dans Safou Tchiama (2005).

1.4.2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides ramifiés composés de monosaccharides comme le glucose, le galactose, le xylose, l'arabinose, le mannose et d'acides uroniques. Les hémicelluloses sont présentes dans les parois cellulaires. A l'état naturel, les hémicelluloses se rencontrent sous forme amorphe et leur composition varie en fonction de leur origine. Leur degré de polymérisation se situe entre 200 et 300 unités. Leur fonction principale est d'assurer l'union

entre la lignine et la cellulose. Leur présence apporte différentes propriétés au bois comme l'hygroscopicité, le gonflement ou la plasticité.

Les hémicelluloses des feuillus sont majoritairement constituées de polysaccharides de la famille des xylanes (Sjostrom, 1993). Les chaînes de xylane sont constituées d'unités xylopyranoses liées par des liaisons β 1 $\rightarrow$ 4 (**figure 16a**). Les glucuronoxylanes (hémicelluloses majoritaires) sont formées d'une chaîne principale d'unités xylopyranoses liées en 1 $\rightarrow$ 4 et de ramifications de types acétyle et 4-O-Me- α -D-acide glucuronopyranose (1 $\rightarrow$ 2) (**figure 16b**). En plus des xylanes, on peut rencontrer les glucomannanes qui sont bâtis autour d'unités glucoses et mannoses. Ces derniers sont des polymères plus linéaires.

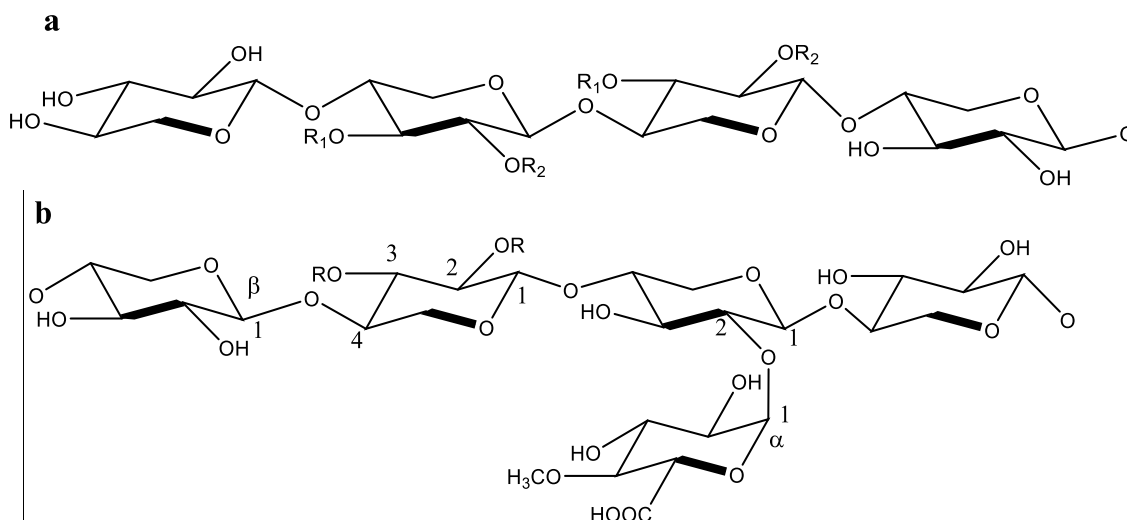


Figure 16: Hémicelluloses de feuillus: (a) chaîne de xylane avec position des principales substitutions, (b) principale structure des glucuronoxylanes (Laine, 2005).

1.4.2.2. La lignine

La lignine est un des trois composés majoritaires de la biomasse lignocellulosique avec la cellulose et les hémicelluloses. À côté de la cellulose, elle est la deuxième ressource naturelle la plus abondante et représente de 18 à 35% de la masse sèche du matériau lignocellulosique soit près de 30% du carbone de la biosphère. Dans la nature, elle est présente sous forme d'un polymère amorphe nommé protolignine. La formation de la protolignine a lieu dans la zone cambiale par activation des précurseurs de lignine (formation de radicaux libres) qui sont polymérisés au hasard dans la paroi cellulaire pour former un polymère tridimensionnel.

La lignine est distribuée tout autour de la paroi secondaire qui compose la lamelle moyenne. La grande majorité de la lignine est comprise dans cette région. Comme beaucoup de composés issus de la biomasse, la composition et la structure de la lignine dépendent fortement de la source de matière première. Ce polymère confère une résistance physique aux plantes et offre ainsi une protection à la cellulose et aux hémicelluloses en réduisant les agressions externes de type biologique.

1.4.2.2.1. Structure et nomenclature des constituants de la lignine.

La lignine, du latin « lignum » qui signifie bois, est le terme générique utilisé pour désigner des composés phénoliques réticulés résultant de la condensation radicalaire de trois alcools dérivés du phénylpropane ou monolignols. Ce composé est un biopolymère ayant une structure tridimensionnelle complexe constitué d'enchaînement aléatoire d'unités phényl-propane (C_6-C_3) diversement substituées. Elle est obtenue par une polymérisation oxydative de trois alcools : l'alcool p-coumarylique (unité p-hydroxyphényle), l'alcool coniférylique (unité guaiacyle) et l'alcool synapylique (unité syringyle). Ces trois monolignols diffèrent par le nombre de groupements méthoxy sur leurs noyaux aromatiques (**figure 17**).

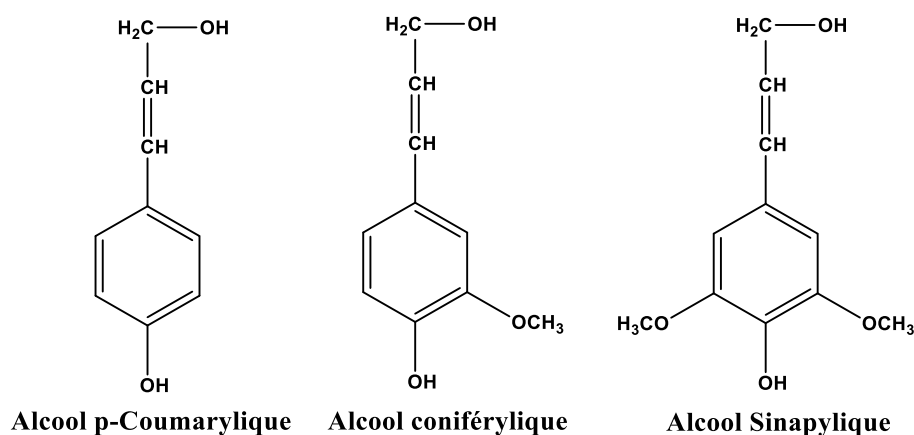
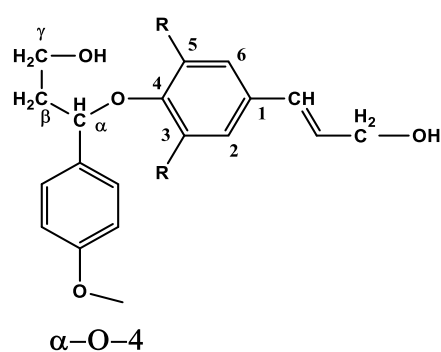
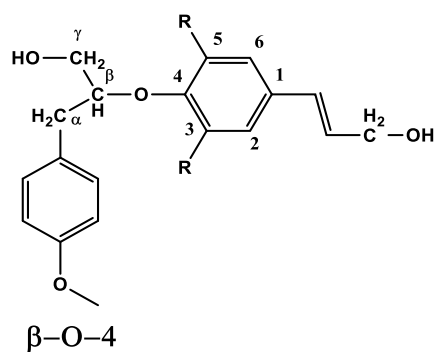


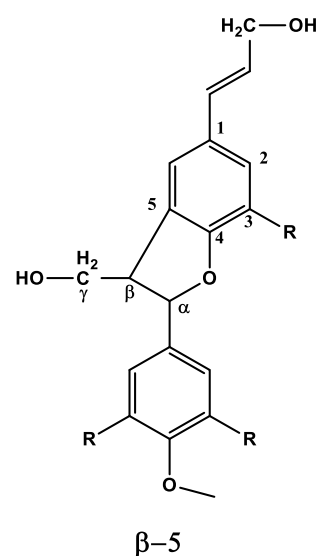
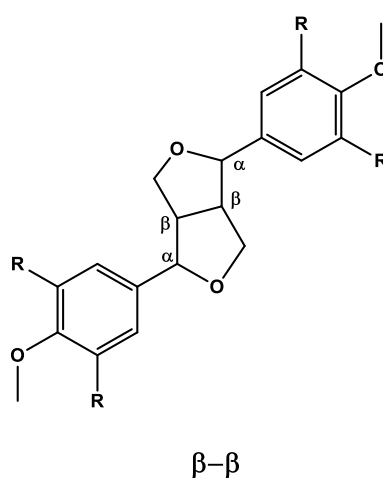
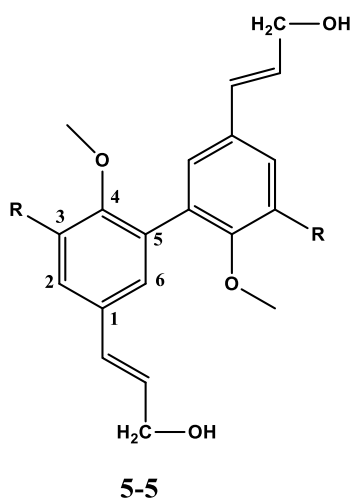
Figure 17: monomères constitutifs de la lignine

La structure de la lignine est complexe et non entièrement élucidée. La polymérisation de ces monomères dans la paroi végétale débute par la génération de radicaux phénoxyles sous l'action des peroxydases. Ces radicaux sont alors capables de se coupler spontanément établissant ainsi une liaison covalente (Boerjan et al., 2003). Ce mode de polymérisation conduit à différents types de liaisons intermonomères classées usuellement en fonction de leur réactivité. La polymérisation de la lignine résulte principalement de la formation, entre les trois précurseurs, des liaisons dites « condensées » (liaison carbone-carbone et diaryl-éther) et des liaisons « non condensées » qui correspondent aux liaisons éthers labiles de types β -O-4 et α -O-4 (**figure 18**).

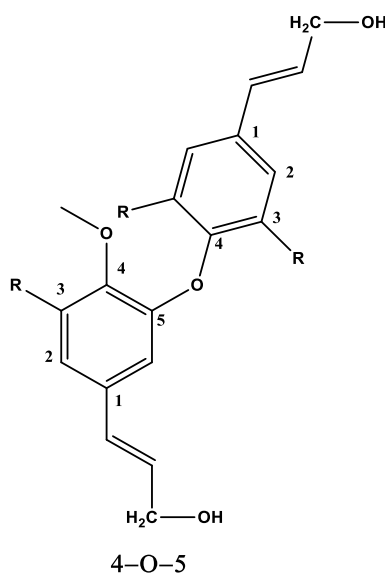
(a) Liaisons labiles, non-condensées



(b) Liaisons condensées



Liaisons carbone-carbone

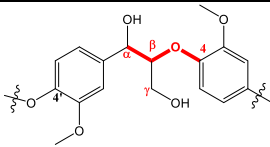
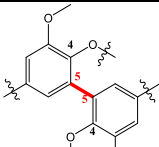
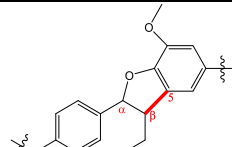
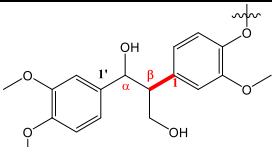
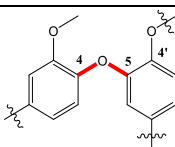
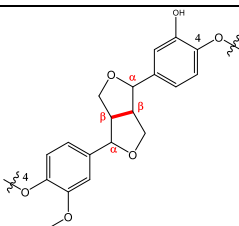
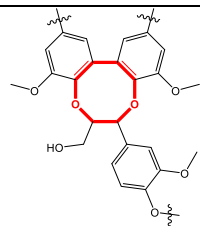
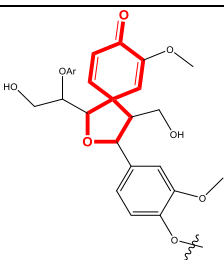


Liaison diaryl éther

Figure 18: Exemple de liaisons éthers labiles (a) et condensées (b) entre monomères de lignine

Les liaisons β -O-4 sont généralement associées à la présence d'une proportion plus importante d'unité S pour former des chaînes relativement linéaires. La liaison β -O-4, la plus abondante dans la lignine, constitue ainsi la cible de choix pour la dépolymérisation de la lignine. Les liaisons dites « condensées » de type carbone-carbone (5-5, β -5 et β - β) et diaryl-éther (4-O-5) sont plus résistantes aux dégradations chimiques. La complexité des lignines vient du caractère non-ordonné et non-répétitif de l'assemblage des trois unités H, G et S mais également du grand nombre de liaisons intermonomériques. Les proportions relatives des diverses liaisons sont répertoriées dans le **tableau 2**.

Tableau 2: Proportions relatives des différentes liaisons entre les unités de lignine dans les deux classes de bois (Almada, 2015).

Liaison	β -O-4	5-5	β -5	β -1
structures				
Bois résineux	45-60%	19-27%	9-12%	1-9%
Bois feuillus	60-62%	3-9%	6-11%	1-7%
Liaisons	4-O-5	β - β	Dibenzodioxocine	spirodienone
structure				
Bois résineux	4-7%	2-6%	5-7%	≈2%
Bois feuillus	6,5-9%	3-12%	<1-2%	3-5%

Les lignines varient donc par le degré de méthylation et le type de liaisons intermoléculaires, en fonction de l'origine botanique, de la nature des tissus, des strates pariétales, des organes et de leur stade de maturation. Dans le cas des feuillus, les lignines sont majoritairement constituées d'unités S et G (**tableau 3**).

Tableau 3: Proportions relatives des différents monomères (unités) constitutifs de la lignine dans les deux classes de bois (Almada, 2015)

	% Hydroxy-benzole	% Guaiacyle	% Syringyle
	Unité H	Unité G	Unité S
Gymnospermes	6-7	89-90	4
Angiospermes	5-7	45-47	46-50

Les alcools p-hydroxybenzyliques et les acides uroniques sont susceptibles de former des liaisons ester entre la lignine et les hémicelluloses. La lignine est donc liée au réseau polysaccharidique et forme des complexes ligno-carbohydrates.

1.4.2.3. Composition chimique de l'okoumé

La composition chimique de l'okoumé a été étudiée depuis 1960. Le **tableau 4** ci-dessous met en évidence les quantités de polysaccharides, de lignine et d'extraits obtenus par plusieurs auteurs. Les proportions d'holocellulose et de cellulose dans l'okoumé sont comprises entre 77% et 80% et 46 et 55% respectivement. Les taux de lignine et des extractibles sont très variables selon les auteurs. Cette différence est due à la méthode d'extraction, notamment les solvants utilisés. Par exemple, Minkué (2000) trouve une teneur de 3% en utilisant l'hexane, puis un mélange éthanol-toluène suivi d'une extraction à l'eau bouillante. Safou (2005) a extrait 2% avec un mélange toluène-méthanol-acétone suivi d'une extraction à l'eau.

Les taux de lignine et de cellulose varient respectivement de 17,2 à 30 % et de 47,8 à 55,7%. Ces différences sont imputables à la méthode d'extraction. Il est connu que la présence de subérine, de polyflavonoïdes et autres molécules à haut poids moléculaires telles que les tanins condensés peuvent limiter l'action des agents de délignification. Ce qui complique la quantification de la lignine et des polysaccharides. Le protocole recommandé pour déterminer le taux d'extraction consiste à procéder à une extraction successive avec des solvants à polarité croissante (Rowell, 2012).

Tableau 4: Teneur des principaux constituants chimiques de l'okoumé

auteurs	Holocellulose (%)	Cellulose (%)	Lignine (%)		Extraits (%)		
	Duramen/Aubier	Duramen/aubier	Duramen/Aubier	Cœur	Solvant organique		Eau
					Duramen/Aubier	Cœur	duramen
Savard (1960)		47,9-45,4	31,4		1,4		0,9
Lal (1977)	77,2	47,8	21,3		12,6		4,2
Brunck et al. (1990)		46,0	30,0		1,5*		
Minkué M'Eny (2000)	75,4**	49,8**	28,3**		3,1**		3,0**
Safou-Tchiama (2005)	80,2±0,3	55,7±1,0	17,2±1,0		2,1±0,1*		
Medzegue (2007)	78,3±2,0	47,8±2	30,4±0,7		2,0±0,4		3,7±0,8
Ngwa (2016)			29,43±1,0**	29,9±1,2**	0,5±0,1**	1,9±0,1**	

Les pourcentages sont exprimés ici en fonction de la masse totale de bois sec.

* indique l'ensemble des extractibles résultants de solvants organiques et de l'eau. Les trois premiers auteurs ont utilisé un mélange éthanol-benzène. Les valeurs de Minkué M'Eny ont été obtenues avec un mélange toluène/éthanol (2v/1v) ; celles de Safou Tchiama ont été obtenues avec un mélange toluène/acétone/méthanol (4v/1v /1v) suivi d'un lessivage à l'eau chaude ; celles de Ngwa quant à elles ont été obtenues avec de l'acétone pur.

**indique les résultats obtenus précisément sur l'aubier et le cœur de déroulage (bois juvénile), les autres auteurs ayant travaillé sur le duramen (bois mature) seul Minkué M'Eny a travaillé sur l'aubier

1.5. Description des procédés d'extractions des lignines

La délignification du bois est une technique principalement utilisée dans l'industrie papetière et dans la bioraffinerie émergente. En effet, ces dernières ont besoin de séparer les fibres de cellulose de la matrice du bois composées de lignine et des hémicelluloses. Pour ce faire, différents procédés d'extraction (procédés physique, chimique et/ou biologique) ont été mis au point. Ils permettent de rompre les liaisons qui unissent ces trois biopolymères et la solubilisation, si libres, des composants.

De nombreux procédés de délignification existent actuellement. Ils ont une grande influence sur la structure de la lignine et conduisent généralement à des types de lignine dont les structures et les propriétés diffèrent les unes des autres, mais également par rapport à celles des lignines natives. En conséquence la méthode d'extraction utilisée influe considérablement sur la structure et les propriétés de la lignine extraite.

1.5.1. Le procédé Kraft

Le procédé Kraft ou procédé sulfate est, de loin, le procédé le plus utilisé dans le monde pour la fabrication de la pâte à papier. Les usines kraft produisent de ce fait plus de 90% de la pâte chimique dans le monde et sont ainsi les plus grands producteurs de lignine (95%). Le but de ce procédé est de dissoudre sélectivement les lignines constitutives du bois pour désolidariser les fibres végétales et permettre ainsi la formation d'une pâte cellulosique. Lors de ce procédé les fragments (sciures ou copeaux) de bois sont traités par un mélange d'hydroxyde de sodium et de sulfure de sodium à 170-175°C pendant 2 à 5 heures selon la source de biomasse. Ces lignines Kraft résultent d'une dépolymérisation intense par rupture des liaisons éthers aryl-alkyl. Elles présentent donc une faible proportion de liaison β -O-4 résiduelles, des masses molaires moyennes relativement faibles et une forte proportion de phénols libres.

1.5.2. Le procédé au sulfite

Le procédé au sulfite était la méthode dominante pour la production de la pâte à papier avant le développement du procédé kraft. C'est aussi un procédé traditionnel mettant également en œuvre des réactifs soufrés à savoir le dihydrogénosulfite (HSO_3^-) de calcium, d'ammonium ou de magnésium contenant l'anhydride sulfureux libre. Le bois est traité à des températures comprises entre 120°C et 180°C pendant 1 à 17 heures.

Des procédés traditionnels mettant en œuvre des réactifs soufrés ont un impact négatif sur l'environnement, c'est ainsi que des procédés dits « sans soufre » se sont développés à petite échelle. Il s'agit d'une part des procédés alcalins et des procédés Organosolv dans la catégorie des procédés chimique et d'autre part du procédé par explosion à la vapeur pour les procédés physico-chimique.

1.5.3. Le procédé à la soude

Le procédé à la soude a été la première technique développée pour la production de la pâte à papier. Il ne diffère du procédé Kraft que par l'absence du sulfure de sodium lors de la cuisson. Le procédé requiert un traitement de la biomasse par une solution de NaOH de 10 à 15% à des températures comprises entre 150°C et 200°C. La lignine obtenue est exempte de soufre ce qui la rend intéressante pour certaines applications. Une étude comparative suggère que les lignines alcalines possèdent des masses molaires moyennes (M_w et M_n) de l'ordre de grandeur de celle des lignines kraft et deux fois plus faibles que celles des lignines organosolv de type formosolv (El Mansouri et Salvado, 2006).

Concernant les groupes fonctionnels, plusieurs études s'accordent à montrer une plus forte proportion de fonctions carboxyliques et phénoliques libres dans les lignines alcalines comparées à d'autres types de lignines (Condassamy, 2015b). Il est toutefois difficile de comparer les données structurales disponibles dans la littérature sur les différents échantillons de lignines industrielles en raison de la diversité des méthodes d'analyses mises en œuvre (El Mansouri and Salvado, 2006).

1.5.4. Le procédé organosolv

Les procédés organosolv sont des techniques de séparation des composants de la biomasse lignocellulosique par l'action de solvants organiques (éthanol, acétone). A 150-200°C et en condition acide, la lignine et une fraction des hémicelluloses sont solubilisées. Qu'elle se fasse dans des conditions acides ou alcalines, l'extraction repose sur le clivage des liaisons éther en α ou β des cycles aromatiques des unités phénylpropanol. Des processus de condensation impliquant des carbocations ou des motifs méthyl-quinones sont observés en fonction des conditions utilisées. Cette technique vient de l'industrie papetière et n'a pas encore connu une prospérité commerciale, parce que la qualité de la pâte produite est jugée inférieure à celle issue du procédé Kraft.

De nombreux projets ont cependant vu le jour dans les trente dernières années, chaque fois avec de nouveaux types de solvants. Les possibilités de solvants, généralement une combinaison d'acide faible et d'alcool solubilisés dans un milieu aqueux, donnent à cette famille de procédé une gamme de conditions de fractionnement de la biomasse plus douces que les deux autres procédés précédents. Cette opération permet d'obtenir une isolation des composés plus facile, permettant ainsi la valorisation de toute la biomasse lignocellulosique. De ce fait, elle reçoit un intérêt croissant de la part des bioraffineries notamment pour la production de bioéthanol.

Les lignines peuvent alors être séparées du solvant par précipitation par ajout d'eau ou par évaporation du solvant. Le pH de la solution d'extraction est faible du fait de la libération d'acides organiques issus des hémicelluloses. En général, les procédés organosolv permettent d'obtenir de bon rendement de récupération en lignine (El Hage et al., 2010c; Safou-Tchiama et al., 2016) et en sucres (Brosse et al., 2009). Le principal inconvénient de cette technique demeure le coût élevé du solvant et la nécessité de le recycler en totalité rendant actuellement ce type de procédé peu rentable.

1.5.5. Le procédé d'explosion à la vapeur

Le procédé, développé en 1924 par Mason, consiste à chauffer rapidement (180-270°C pendant quelques minutes) des copeaux de bois par injection de vapeur d'eau saturée à haute pression (10-50 bar) puis à réaliser une détente brutale qui déstructure la matière. L'effet de cette déstructuration est fonction de la sévérité des conditions expérimentales (température et temps de séjour) et du pH. Dans ce procédé les hémicelluloses sont hydrolysées, et dans une certaine mesure, une partie de la lignine et de la cellulose amorphe (Duff and Murray, 1996). Il a l'avantage de déstructurer intensément et rapidement la biomasse mais son principal inconvénient reste les coûts d'équipement, d'énergie et la formation d'inhibiteur de fermentation. Des variantes ont été développées pour augmenter les rendements et éviter la formation d'inhibiteurs : ajout d'acide sulfurique, de soude, d'ammoniaque ou de CO₂. La plus prometteuse est l'explosion à la vapeur en condition acide. L'acide permet une hydrolyse des hémicelluloses à des conditions moins fortes (150-200°C, 16 bar, 2,5 minutes, 0,1N d'acide sulfurique) ce qui évite la dégradation des sucres.

1.5.6. Les lignines pyrolytiques

Enfin, la pyrolyse de la biomasse permet également d'en extraire les lignines. Durant leur décomposition thermique en absence d'oxygène, les matériaux lignocellulosiques vont conduire à la formation de charbon, de gaz et d'une phase liquide appelée huile pyrolytique. Il est possible d'extraire les lignines présentes dans cette dernière. Le plus souvent cette extraction est réalisée en vue d'améliorer la stabilité de l'huile. Les lignines ainsi extraites ont subi d'importantes dégradations lors de la pyrolyse. En effet, toutes les liaisons éthers sont rompues et de nombreux réarrangement se sont produits conduisant à un polymère de faible masse molaire, caractérisé par un nombre moyen d'unités monomériques très faible. Ces lignines vont, par ailleurs, présenter une forte teneur en carbone, leur conférant un pouvoir calorifique intéressant. Leur valorisation sera donc essentiellement énergétique.

1.5.7. Le procédé au dioxane (milled wood lignin)

Bjorkman a mis au point une procédure d'isolement pour extraire une grande proportion de lignine de bois connu sous le nom de lignine de bois blanchi ou lignine Bjorkman (MWL). Les MWL sont considérées comme les plus représentatives des lignines natives. Elles sont obtenues par un broyage fin du bois jusqu'au stade de « farine » de bois à l'aide de billes. Il s'en suit soit une étape d'extraction avec une solution de dioxane/eau en présence ou non d'acide chlorhydrique (Bjorkman, 1957) soit un traitement enzymatique visant à éliminer les polysaccharides. La lignine extraite par la méthode enzymatique est purifiée par précipitation au solvant et présente une pureté généralement faible (dans le cas de Bjorkman, inférieur à 50%) due à la présence de polysaccharides. Une étude qui compare les deux modes d'extraction (Jääskeläinen et al., 2003) montre que l'extraction par acidolyse permet d'obtenir 40% de la lignine initialement présente d'une pureté de 99%, mais le rendement reste faible. Par contre le traitement enzymatique permet

de récupérer 83% de lignine contenant des impuretés. De plus, le broyage à billes affecte le rendement et la structure chimique de la MWL (Hu et al., 2006).

Comme cela vient d'être présenté, l'obtention de la cellulose et les différents procédés de délignification employés à l'échelle industrielle vont conduire à de la cellulose et des lignines sensiblement différentes. Il est donc nécessaire de connaître précisément la structure et les propriétés de chacune d'elles, d'où l'intérêt d'identifier les méthodes analytiques permettant leur caractérisation.

1.6. Techniques d'analyses de la cellulose et de la lignine

La cellulose et de la lignine du bois nécessitent d'être caractérisées avant d'envisager leur valorisation ; pour cela, des méthodes chimiques et physiques sont généralement utilisées. Les principales méthodes utilisées sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

1.6.1. Analyse gravimétrique de la cellulose : méthode au chlorite

La quantification de la cellulose peut être réalisée selon la norme TAPPI T 203 OM-88. Le mode opératoire sera décrit dans le chapitre II. Cette cellulose est obtenue par extraction chimique de l'holocellulose à l'aide de chlorite de sodium.

1.6.2. Caractérisation structurale de la cellulose

Plusieurs méthodes existent pour caractériser la cellulose parmi lesquelles la Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC), la Diffraction aux Rayons-X (DRX), et la spectrométrie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

1.6.2.1. Chromatographie d'Exclusion Stérique (SEC)

La SEC permet de séparer les polymères selon leur taille. Les molécules sont séparées en fonction de leurs masses molaires décroissantes. Cette technique permet de calculer la masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse moléculaire moyenne en masse (M_w) ainsi que l'indice de polydispersité. Dans le cas des sucres, l'utilisation de cette technique consiste à dissoudre la cellulose ou ses dérivés (le tricarbonilate de cellulose) dans un solvant spécifique comme le THF⁹ (phase mobile) puis de les séparer par le passage au travers d'une colonne remplie de billes

⁹ Tétrahydrofurane

microporeuses (phase stationnaire). En sortie de colonne les macromolécules sont quantifiées par un détecteur UV.

1.6.2.2. Viscosimétrie

La viscosimétrie détermine le degré de polymérisation moyen de la cellulose ainsi que la masse molaire moyenne en viscosité (M_v) en la dissolvant dans des solutions des complexes métalliques. La masse molaire moyenne en viscosité est calculée en utilisant la relation de Mark-Houwink-Sakurada (**équation 1**) et le degré de polymérisation à partir de la formule de l'**équation 2**. Mais cette méthode présente des limites, notamment du fait qu'elle ne donne que la masse molaire moyenne en viscosité et les résultats obtenus varient selon le solvant et la température d'analyse (Montane et al., 1998a; Pala et al., 2007).

$$[\eta] = k \cdot (M_v)^\alpha (g \cdot mol^{-1}) \quad \text{Equation 1}$$

$$DP^{0.95} = 0,75 \cdot \eta (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad \text{Equation 2}$$

Où M_v : la masse molaire moyenne viscosimétrique ($g \cdot mol^{-1}$). $[\eta]$: la viscosité intrinsèque ($cm^3 \cdot g^{-1}$). $k = 14,43 \cdot 10^{-3}$ et α ($0,5 \leq \alpha \leq 1$) sont des constantes dépendantes de la température du système polymère-solvant.

1.6.2.3. Caractérisation par DRX

La diffraction aux rayons-X est une technique puissante pour caractériser les matériaux d'origine végétale à des échelles micro et nanométrique. C'est une technique utilisée pour évaluer l'index de cristallinité (IC) de la cellulose. Parmi les trois principales méthodes de calcul de l'IC (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, RMN CP/MAS ^{13}C et DRX), la méthode de Segal (1959) est la plus utilisée. Elle utilise la technique de diffraction des rayons X et repose sur une équation déterminée empiriquement (**équation 3**) Cette équation utilise le rapport d'intensité des pics du diffractogramme (**figure 19**). l'indice de cristallinité est calculé à partir du rapport des hauteurs entre l'intensité du pic cristallin ($I_{002}-I_{AM}$) et l'intensité totale (I_{002}) après élimination du signal de fond mesuré sans cellulose (Park et al., 2010).

$$IC = \frac{I(002) - I(AM)}{I(002)} \quad \text{Equation 3}$$

Avec :

- IC : indice de cristallinité de la cellulose

- I_{002} : maximum d'intensité (Unité arbitraire) de la diffraction associée au plan 002 à l'angle $2\Theta=22,6^\circ$.
- I_{AM} : intensité de diffraction associée à la fraction amorphe de la cellulose à l'angle $2\Theta=18,5^\circ$ qui correspond à l'intensité minimale entre les pics associés aux plans $10\bar{1}$ et 002.

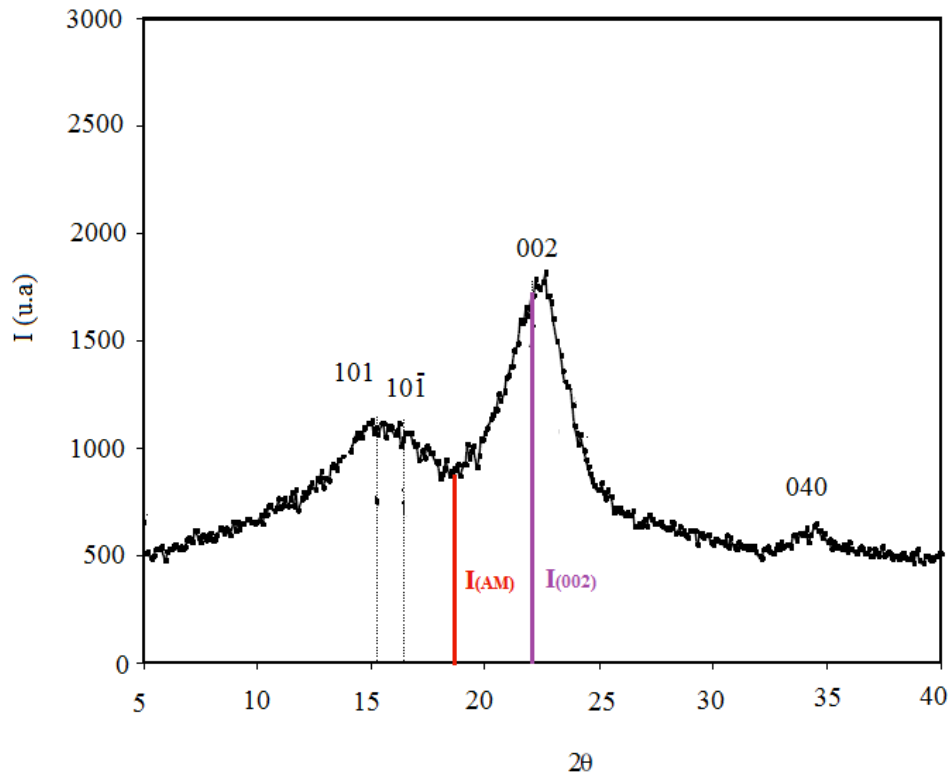


Figure 19: Diffractogramme des fibres de cellulose d'okoumé avec l'attribution des différents plans cristallins caractéristiques de la cellulose (Safou Thiama, 2005).

D'autres méthodes plus précises permettent également de calculer l'IC à partir de l'aire des pics, par déconvolution (Borysiak and Garbarczyk, 2003; Newman et al., 2013), ou encore par soustraction de la contribution de la phase amorphe dans le diffractogramme (Park et al., 2009).

1.6.2.4. Caractérisation par RMN CP/MAS ^{13}C

La RMN ^{13}C en phase solide est une technique qui permet également de calculer le taux de cristallinité de la cellulose. Elle repose sur une équation qui utilise le rapport des aires de certains pics (**équation 4**), en particulier les aires de la contribution amorphe et cristalline du carbone C4 (**figure 20**). Dans un nanocristal parfait, les carbones amorphes correspondent en fait à la surface du cristal, les autres correspondent au cœur cristallin (Heux et al., 1999; Ibbett et al., 2010; Newman, 1999).

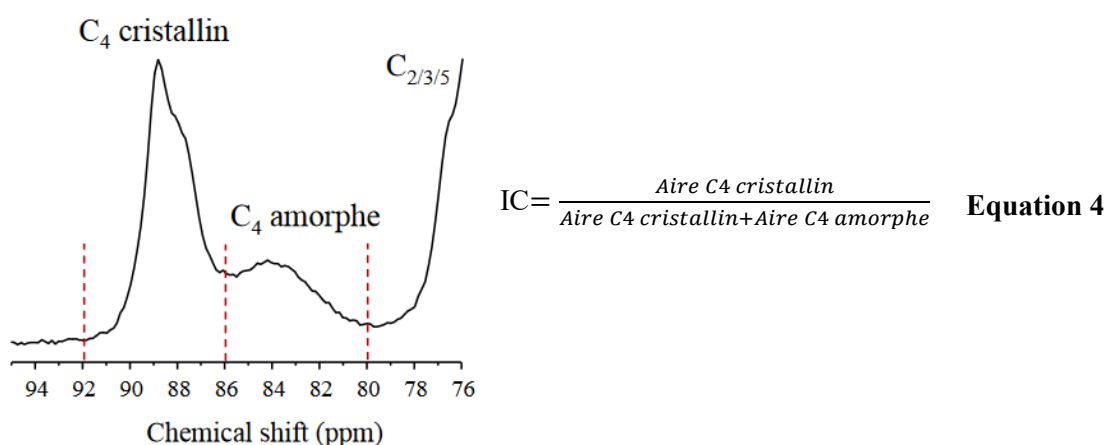


Figure 20: Spectre RMN ^{13}C CP-MAS de la cellulose. Les bornes d'intégration sont utilisées pour le calcul de l'indice de cristallinité (IC) à partir des aires du C_4

Le principe de fonctionnement de la RMN en phase solide reste proche de celui en phase liquide. La différence majeure est au niveau de la résolution des pics mesurés. En effet, dans le cas de la RMN en phase liquide, la réorientation des molécules est rapide grâce au mouvement brownien. Les interactions dépendantes de l'orientation n'ont pas d'influence sur le spectre, ce qui n'est pas le cas en phase solide. La résolution est diminuée et la séparation est difficile en raison d'un effet de superposition de spectres (milieu anisotrope). Le moyen de réduire cet effet est de travailler en rotation à l'angle magique (Magic Angle Spinning ou MAS). Par ailleurs, la faible abondance du carbone ^{13}C rend sa détection difficile. Il existe donc une manière artificielle d'amplifier son signal par polarisation croisée (Cross Polarization ou CP) avec le proton. En effet, le spin abondant du proton ^1H peut être transféré sur les spins plus rares du carbone ^{13}C . En combinant ces deux techniques, les spectres RMN ^{13}C -CP-MAS offrent une résolution relativement intéressante en phase solide.

A noter que les méthodes DRX ou par RMN ^{13}C CP-MAS, permettent également de remonter à la taille d'une cristallite élémentaire par calcul (Brinkmann et al., 2016; Ibbett et al., 2010). La méthode utilisée par RMN ^{13}C s'avère particulièrement fiable dans le cas de la cellulose I (Newman, 1999; Sebe et al., 2012) mais fonctionne également pour d'autres allomorphes comme la cellulose II (Kono et al., 2004; Sebe et al., 2012). Dans tous les cas, la mesure de l'IC est très sensible à la technique utilisée (Park et al., 2010).

1.6.3. Analyse gravimétrique de la lignine: méthode Klason

La quantification de la lignine insoluble est une méthode gravimétrique basée sur l'hydrolyse de la fraction polysaccharidique de la biomasse en milieu acide fortement concentré. Cette méthode utilise les propriétés de l'insolubilité de la lignine dans ce milieu acide qui dissout les autres constituants pariétaux (cellulose et hémicelluloses). La méthode dite des lignines de Klason (TAPPI T222-om-88) est très utilisée (Moore and Johnson, 1967) et sera présentée dans le chapitre II.

1.6.4. Spectrophotométrie : lignine soluble

Le dosage des lignines solubles est effectué par analyse spectrophotométrique en suivant la méthode TAPPI T222 om-83 (Lin and Dence, 2012) pour une longueur d'onde $\lambda=205$ nm. Cette méthode est utilisée pour détecter l'éventuelle lignine solubilisée en complément des analyses Klason.

1.6.5. Analyse structurale de la lignine par RMN

La RMN est probablement la technique d'analyse qui a permis de fournir le plus d'informations sur les structures des lignines, que ce soit pour identifier les différentes liaisons entre les monomères ou les différentes fonctions chimiques que porte le polymère. Cette dernière est importante lorsqu'une fonctionnalisation du polymère est envisagée dans le cadre de sa valorisation ultérieure.

La RMN HSQC a apporté de nombreuses précisions sur les différents types de liaisons qui unissent les unités aromatiques. Cette technologie s'est avérée particulièrement efficace pour identifier les différentes unités aromatiques composant le polymère (Del Río et al., 2012; Heikkinen et al., 2014a). Elle est par contre techniquement limitée pour quantifier ces différents motifs. En effet, ce type d'analyse requiert des ratios signal sur bruit que ne permettent pas les appareils actuels.

La RMN du proton est également utilisée seule pour l'analyse des lignines et peut permettre la quantification de groupements méthoxy présents dans le polymère (Santos Abreu and Freire, 1995). Toutefois cette méthode requiert l'acétylation préalable du matériau.

La RMN du phosphore est, quant à elle, une méthode de choix pour déterminer la quantité de fonctions alcool, phénol et acide carboxylique présentes dans les lignines. Ce type de dosage nécessite la fonctionnalisation préalable des lignines par un réactif portant un atome de phosphore, le plus souvent du 2-chloro-4,4',5'-tetraméthyl-1, 3,2-dioxaphosphalane (TMDP), et l'introduction d'un étalon interne dans le milieu pour quantifier les différentes fonctions (**figure 21**). Cet étalon possède un groupe hydroxyle libre qui réagira également avec le TMDP. Le cyclohexanol et le cholestérol ont été largement utilisés à ces fins (Alessandro Granata and Argyropoulos, 1995). Cependant, il a été démontré récemment que ces derniers pouvaient conduire à une sous-estimation de la quantité des fonctions réellement présentes. L'utilisation du N-hydroxy-5-norbornène-2,3-dicarboximide est donc préconisée (Balakshin and Capanema, 2015). En somme, cette méthode, bien que particulièrement efficace reste donc à optimiser et standardiser.

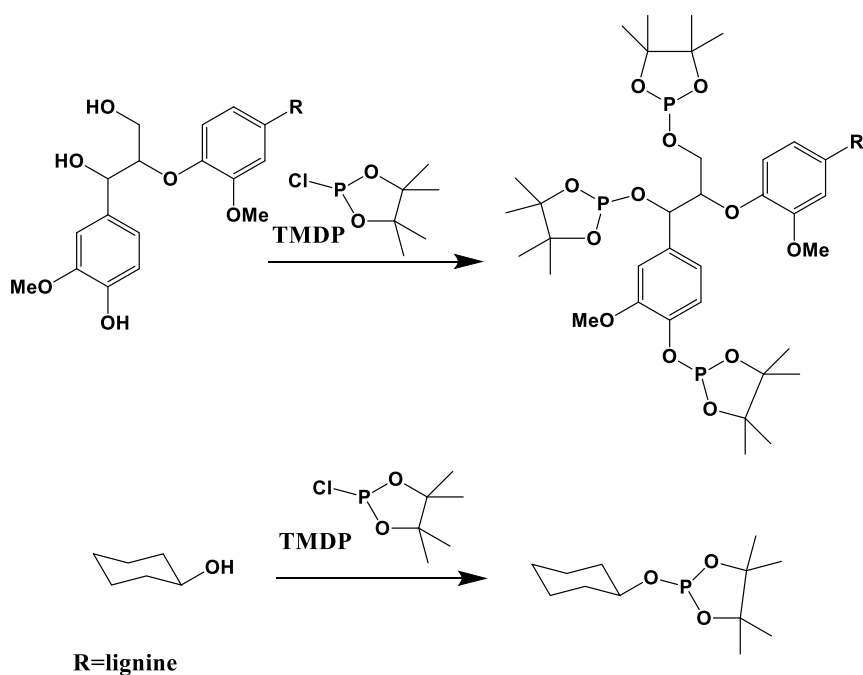


Figure 21: Réaction du TMDP sur les lignines et le cyclohexanol.

Les fonctions alcool et phénol, ainsi que les fonctions acides carboxyliques du polymère, une fois fonctionnalisées par le TMDP, présentent des déplacements chimiques différents en RMN ^{31}P permettant ainsi de les différencier les uns des autres et de les quantifier par rapport à l'étalon interne. Cette méthode permet par ailleurs d'identifier quatre types de groupements phénoliques : les unités para-hydroxyphénoliques, guaiacyle, syringyle et phénoliques condensées (**figure 22**) (Crestini and Argyropoulos, 1997; Huijgen et al., 2014; Pu et al., 2011; Yang et al., 2016). Ces dernières unités sont souvent groupées sous le terme d'unités phénoliques condensées parce qu'il est difficile de les différencier sans l'aide de la RMN 2D (Balakshin and Capanema, 2015).

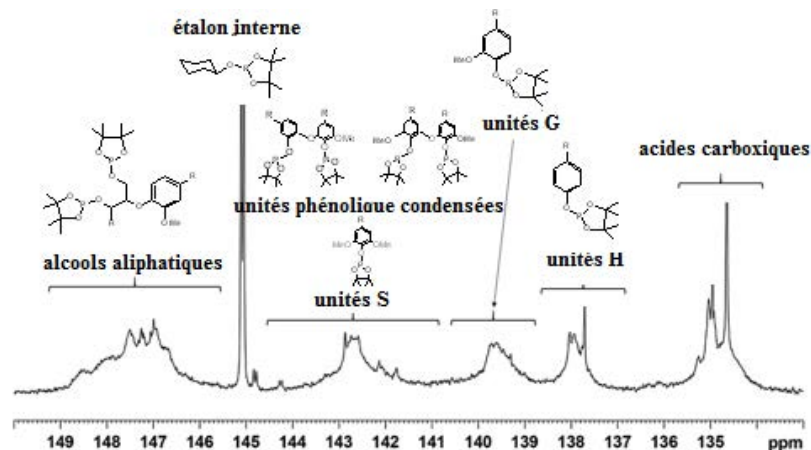


Figure 22: Localisation des différentes fonctions présentes dans les lignines après réaction avec le TMDP sur le spectre RMN ^{31}P (Yang et al., 2016).

2. Généralités sur les procédés de conversion énergétique de la biomasse lignocellulosique (BLC) : présentation des deux voies de transformation de la BLC en biocarburants

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme utilise la biomasse comme source d'énergie renouvelable. Depuis la découverte de l'utilisation du feu, la forme la plus commune d'utilisation de l'énergie de la biomasse a été la combustion directe, dans le but d'utiliser cette énergie pour le chauffage, la cuisine, ou encore la production de vapeur et donc d'électricité. Cependant, les avancées technologiques ont permis le développement de procédés de transformation de cette biomasse en énergie plus efficaces et durables, comme l'obtention par des moyens biochimiques de combustibles liquide ou gazeux, beaucoup plus pratiques notamment pour les transports.

La filière de conversion énergétique de la biomasse repose essentiellement sur deux familles de procédés de conversion : la voie biochimique et la voie thermochimique (**figure 23**).

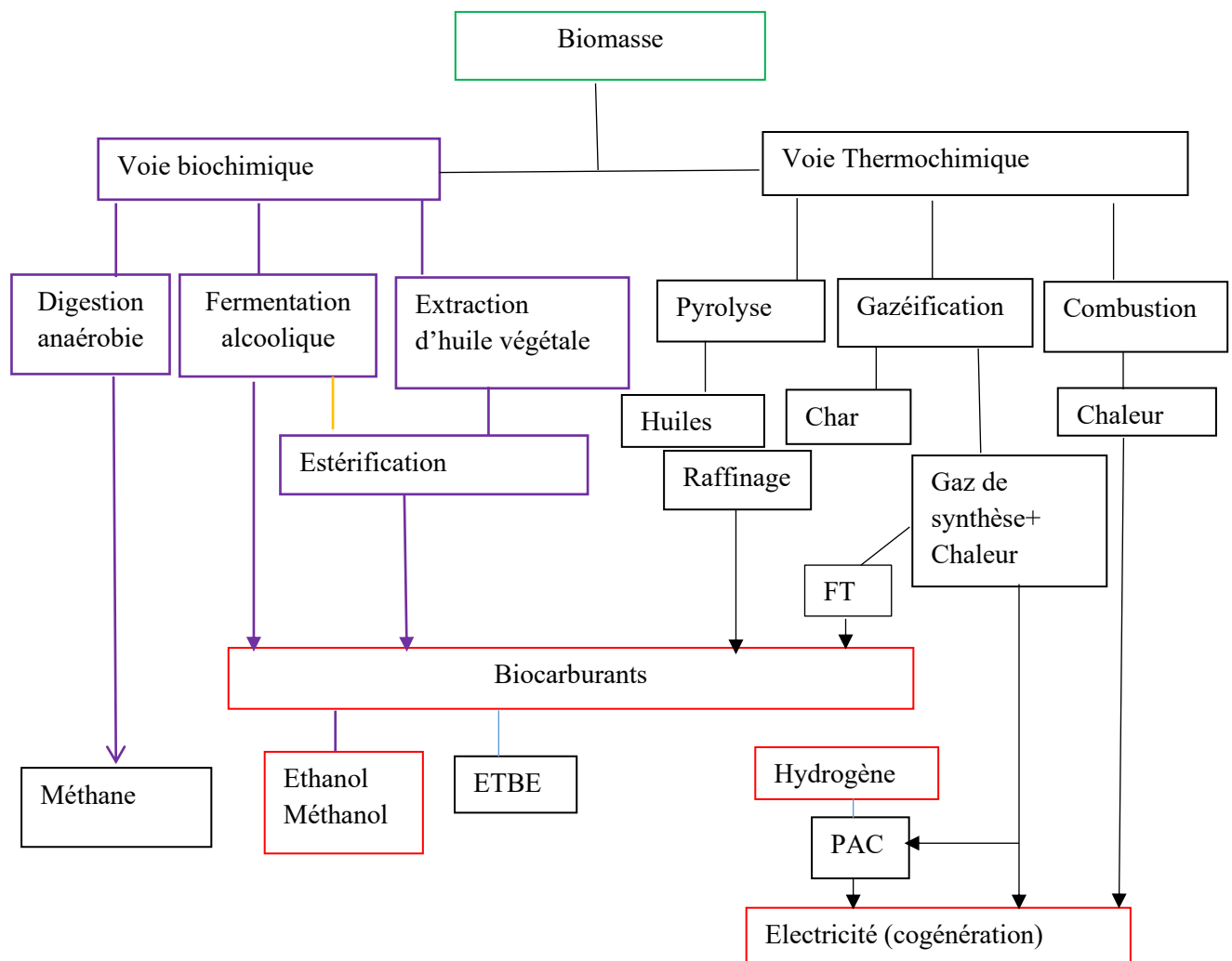


Figure 23: Différentes voies de conversion de la biomasse à des fins énergétiques (Kpogbemadou, 2011). (PAC : pile à combustible, FT : synthèse Fisher Tropsch, ETBE : éther éthyle tertiobutyle (additif de l'essence))

Les combustibles alcooliques pouvant être obtenus à partir de la biomasse sont essentiellement le méthanol, l'éthanol et le butanol. On peut donc, obtenir différents types de produit pour la génération d'énergie à partir de la biomasse. L'obtention des combustibles alcooliques est perçue comme une alternative potentielle à l'utilisation des combustibles fossiles. La voie biochimique permet de produire de l'éthanol par hydrolyse puis fermentation de la lignocellulose.

2.1. La voie thermochimique

La voie thermochimique est basée sur le craquage, l'oxydation voire la combustion des biomolécules sous l'effet de la chaleur. Elle regroupe la synthèse de combustibles à partir des biomasses et elle est effectuée soit par pyrolyse, soit par liquéfaction, soit par gazéification (Lee, 1997). Il est à noter que les méthodes thermochimiques sont plus rapides que les voies biochimiques. Elles peuvent cependant aboutir à des réactions de formation de nombreux produits secondaires instables ainsi que la formation de coke qui sera difficile à décomposer (Kpogbemabou, 2011).

2.2. La voie biochimique

Les procédés biochimiques utilisent les caractéristiques biochimiques de la biomasse et l'action métaboliques des microorganismes pour la production de combustibles liquides et gazeux. Ces procédés sont plus appropriés à la conversion de la biomasse humide que d'autres procédés, comme les procédés thermochimiques par exemple. Parmi les produits obtenus par des procédés biochimiques on peut citer les combustibles alcooliques, les biogaz ou encore les biodiesel (Sauvageon, 2012).

2.2.1. Production d'éthanol

Le bioéthanol s'obtient par fermentation de matières sucrées avec un degré d'alcool initial de 10 à 15% pouvant être concentrées plus tard par distillation, jusqu'à l'obtention du mélange azéotrope. Ensuite par un procédé de déshydratation on obtient de l'alcool pur. Le bioéthanol que l'on utilise de nos jours est principalement produit à partir de biomasse dite à glucide comme la canne à sucre, les betteraves sucrières et l'amidon de maïs.

Toutefois, l'obtention de l'éthanol plus largement à partir de la biomasse lignocellulosique (BLC) est à l'essai avec des unités à l'échelle du pilote industriel. Le processus d'obtention de l'éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique est plus complexe que son obtention à partir des biomasses à amidon (riz, maïs...) ou à saccharose (canne à sucres, betterave...), bien que cette matière ait un coût faible et que son utilisation n'entre pas en compétition avec le secteur de l'alimentation. Une meilleure altération du réseau cellulosique, une faible demande d'énergie et l'utilisation d'enzymes plus efficaces induiraient directement une baisse de ce coût. La recherche scientifique œuvre actuellement en ce sens (Ohgren et al., 2006).

La **figure 24** représente les principales étapes de conversion de la BLC en éthanol selon deux variantes : l'une principalement associée à l'obtention des sucres fermentescibles par voie enzymatique à l'aide de cellulases et l'autre par voie chimique. Dans le premier cas un prétraitement s'avère nécessaire pour faciliter les étapes ultérieures d'hydrolyse. Ces procédés peuvent être classés en deux groupes :

- Les procédés en deux étapes : on utilise d'abord une hydrolyse chimique ou enzymatique des sucres fermentescibles, ensuite on transforme ces sucres en éthanol grâce aux microorganismes, comme les levures.
- Les procédés en une étape : l'hydrolyse et la fermentation se réalisent en une seule étape.

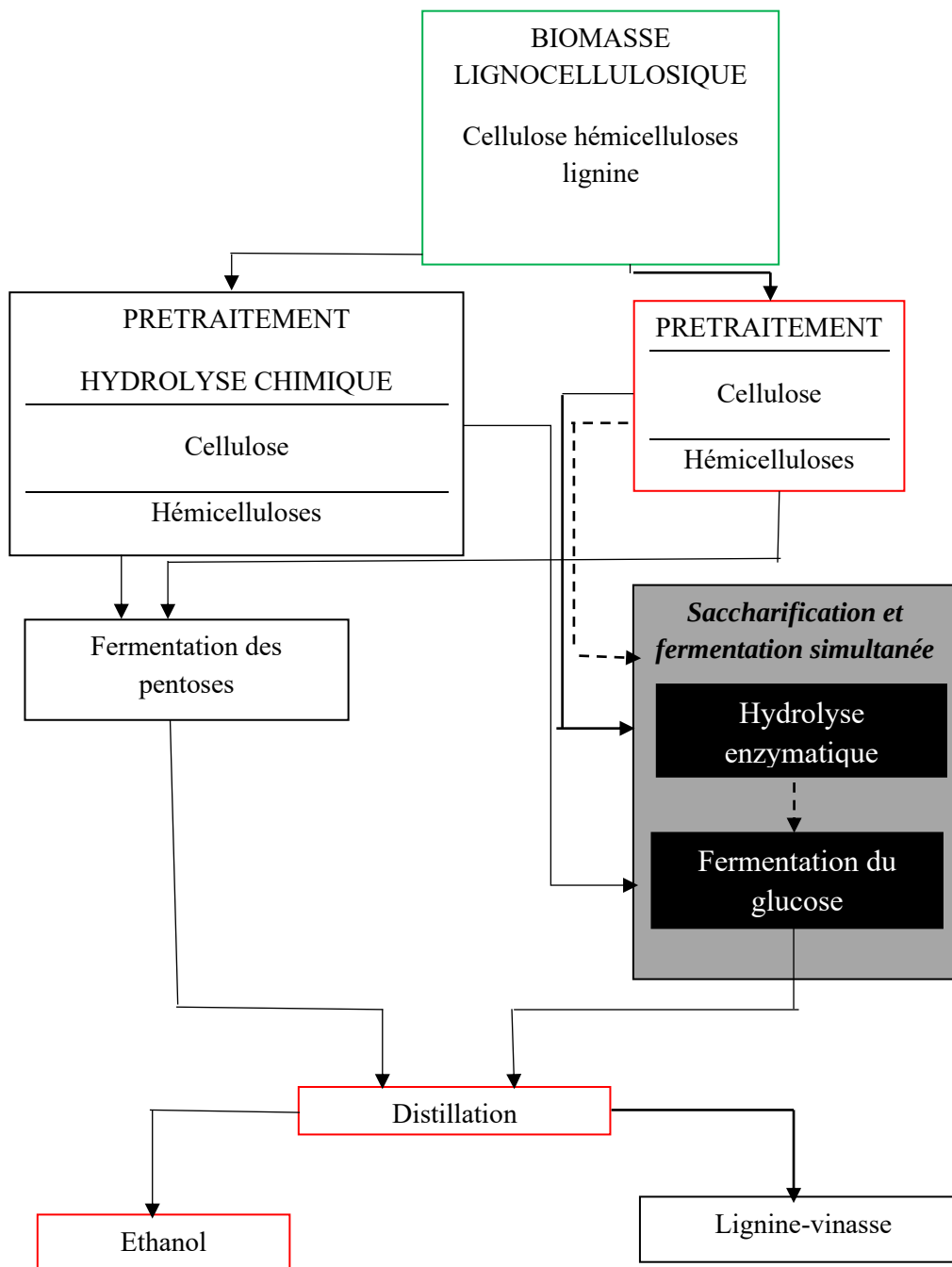


Figure 24: Types de procédés de transformation biochimique de la biomasse lignocellulosique en éthanol (Ogier et al., 1999).

Parmi les technologies qui existent pour transformer la biomasse en éthanol, celle basée sur l'hydrolyse enzymatique sont plus prometteuses, en raison des bons rendements potentiels (Wyman and Goodman, 1993). De bons résultats ont été obtenus ces dernières années bien que ces procédés d'hydrolyse enzymatique soient récents. Cependant, il existe toujours la possibilité d'apporter des innovations permettant d'optimiser le rendement, la productivité et de diminuer les coûts énergétiques (Antonopoulos and Grohmann, 1993).

Malheureusement, la structure complexe de la BLC rend l'hydrolyse enzymatique compliquée, en comparaison avec l'hydrolyse de l'amidon ou du saccharose. Pour cette raison un prétraitement est indispensable afin de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes et obtenir ainsi un bon rendement. La fabrication de ce que l'on appelle éthanol cellulosique (similaire au bioéthanol produit à partir de sucre ou d'amidon) se fait en quatre étapes, qui répondent chacune à un objectif et comportent des difficultés technico-économiques spécifiques (**tableau 5**)

Il est alors important de privilégier les prétraitements qui augmentent le rendement en sucres fermentescibles et qui ne dégradent pas les sucres (Sun and Cheng, 2002).

Tableau 5: les étapes de transformation de la biomasse lignocellulosique en éthanol. D'après Grammont (2006).

Etapes	Objectifs	Difficultés
Prétraitements	Libérer la fraction hydrolysable de la BLC.	Rompre la structure de la BLC, sans dégrader les sucres.
Hydrolyse	Transformer les hémicelluloses et la cellulose en sucres.	Obtenir le meilleur rendement sans dégrader les sucres.
Fermentation	Transformer les sucres en éthanol.	Transformer à la fois le glucose et les sucres en C ₅
Distillation	Séparer l'éthanol du moût	Traiter les coproduits.
Déshydratation		

2.2.2. Etape de prétraitement

Pour valoriser efficacement la biomasse lignocellulosique en éthanol, il faut commencer par en séparer ses constituants. Le prétraitement vise à séparer et diminuer le degré de cristallinité de la cellulose afin de la rendre plus accessible aux enzymes hydrolytiques. Le processus d'hydrolyse enzymatique consiste à rompre les polymères pour libérer des monosaccharides qui pourront ensuite être transformés en éthanol par fermentation. Pour être efficaces les prétraitements doivent répondre à certaines conditions : consommer peu d'énergie, avoir un cout financier assez faible, utiliser des réactifs facilement récupérables et s'appliquer aisément à plusieurs substrats différents.

Par action thermique et/ou chimique, la structure de la lignine est altérée, les hémicelluloses sont hydrolysées et la structure de la cellulose est modifiée. On retrouve ainsi dans la phase liquide une partie de la lignine sous forme soluble et les produits d'hydrolyse des hémicelluloses et des fragments de cellulose. Dans la phase solide se retrouvent principalement la cellulose et des résidus de lignine. L'efficacité d'un prétraitement réside dans sa capacité à augmenter l'accessibilité des fibres de cellulose aux enzymes et limiter (ou éviter) la formation des composés inhibiteurs de l'activité des enzymes et des microorganismes, issus de la dégradation des sucres et de la lignine (**tableau 6**) (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000c). Les enjeux sont donc d'extraire la cellulose de la BLC sans trop la dégrader.

Il existe plusieurs procédés de prétraitement de la BLC, présentés dans le **tableau 7** et décrits ultérieurement. Le choix du prétraitement dépend en grande partie du substrat (paille, bois) et du procédé d'hydrolyse choisi. On peut citer trois familles de procédés de prétraitement qui ont bénéficié des développements les plus prometteurs : physique, physico-chimique et chimique.

Tableau 6: Les principaux produits de dégradation des sucres (*Brahim, 2016*)

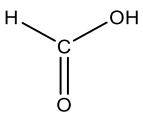
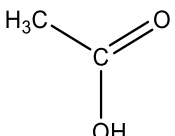
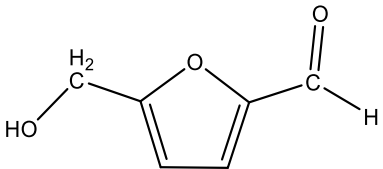
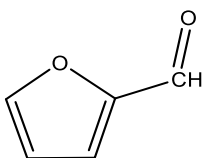
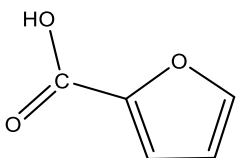
Inhibiteur	Structure	Origine
Acide formique		Dégradation des hémicelluloses et de l'hydroxyméthylfurfural
Acide acétique		Dégradation des hémicelluloses acétylés
5-hydroxyméthyl furfural		Déshydratation des hexoses
Furfural		Déshydratation des pentoses
Acide 2-furoïque		Oxydation du furfural

Tableau 7:Principaux procédés de prétraitement.

Procédés physiques	Broyage, ultra-sons, micro-onde,...
Procédés physico-chimique	Explosion à la vapeur Variantes : avec acides ou ammoniacque ou CO ₂
Procédés chimiques	Préhydrolyse à l'acide dilué ou concentré alcalines, Procédé Organosolv, Oxydation chimique ou biologique

2.2.2.1. Procédés physiques

Le prétraitement mécanique consiste en une réduction de la taille des particules de la BLC. Selon le type de biomasse, cette réduction peut être réalisée par broyage, concassage et déchiquetage (Palmowski and Müller, 2000). Comme les autres prétraitement physiques (ultra-sons ou micro-ondes), il permet le plus souvent d'améliorer la séparation des constituants du bois, soit en facilitant leur accessibilité par l'augmentation du ratio Surface/Volume (Harmsen et al., 2010) soit en favorisant leur mobilité. D'après ces auteurs, les opérations mécaniques conduiraient également à modifier la structure et la composition chimique des BLC. L'augmentation de la surface accessible, la baisse du degré de polymérisation, la destruction des fibres sont des transformations de la matière très favorables à l'augmentation de l'accessibilité des substrats polysaccharidiques aux enzymes. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'augmentation du taux d'hydrolyse de la cellulose avec la réduction de la taille des particules (Chang and Holtzapple, 2000). Par conséquent, la réduction de la taille des particules se traduit par une augmentation significative du potentiel de bioconversion.

Cependant, appliqué seul, un procédé physique voit souvent son efficacité limitée, c'est pourquoi, il se trouve généralement impliqué en association avec une autre méthode d'extraction. Le **tableau 8** répertorie quelques exemples de prétraitements physiques sur la BLC.

Tableau 8: Exemple de prétraitements physiques.

Prétraitements	Actions	Avantages	Inconvénients
Mécanique	Réduction de la taille des particules	Absence de production d'inhibiteurs	Coûts énergétique Efficacité limité
Micro-ondes	Extraction de lignine, d'hémicelluloses		
Ultra-sons	Extraction de lignines, d'hémicelluloses		

2.2.2.2. Procédés chimiques

Les procédés chimiques, l'hydrolyse en présence d'acide dilué, l'hydrolyse alcaline, l'extraction par solvant organique, l'utilisation d'oxydant ou encore plus récemment l'utilisation de solvants ioniques, sont les méthodes les plus reconnues pour leur efficacité d'extraction de la cellulose (surtout les hydrolyse acide et alcaline). Elles peuvent être utilisées comme méthodes de référence pour évaluer le potentiel d'extraction d'une matière donnée.

Tableau 9: Principaux prétraitements chimiques.

Prétraitements	Actions	Avantages	Inconvénients	Développé par
Organosolv	Solubilisation de la lignine	Peu d'impact sur l'environnement	Coûts des solvants et du recyclage	CIMV ¹⁰
Acide (acide dilué, acide concentré)	Solubilisation des hémicelluloses, conversion des hémicelluloses solubles en sucres fermentescibles	Acide dilué : Réacteurs simples.	Risque de dégradation des sucres	NREL celunol
		Rapide, conditions faciles	Corrosion des matériaux	Masada Resource Group
		Peu d'inhibiteurs	Recyclage de l'acide Procédé complexe	Arkenol
Alcalin	Augmentation de l'hydrolysabilité de la cellulose ; solubilisation des hémicelluloses et des lignines			
Liquide ionique	Dissolution sélective de la lignine et des polysaccharides			
Oxydation humide	Solubilisation des hémicelluloses, utilisation de l'oxygène ou de l'air			

¹⁰ Compagnie Industrielle de la Matière Végétale

2.2.2.2.1. Prétraitement à l'acide dilué

L'objectif principal du prétraitement acide est d'augmenter l'accessibilité des enzymes aux fractions cellulosiques en solubilisant la fraction des hémicelluloses de la biomasse. Ce prétraitement est généralement effectué dans un réacteur avec des particules de taille comprise entre 0,25 et 1 mm. Le principe de cette technique consiste à traiter le bois dans une solution avec un rapport solide/ liquide de 5 à 10%. La température est généralement comprise entre 180°C et 220°C et la pression entre 3,45 et 4,14 MPa. Ce prétraitement est comparable à l'explosion à la vapeur qui utilise un catalyseur acide. La principale différence réside dans l'absence de décompression explosive et dans le fait que lors du prétraitement acide la BLC est en suspension dans une solution acide. En raison de l'effet toxique, corrosif et de la nécessité de l'usage de matériaux coûteux et résistants, l'utilisation d'acides concentrés n'est pas intéressante. Toutefois, un risque de formation de composés inhibiteurs de fermentation existe. De ce fait, le prétraitement à l'acide dilué se montre adapté et se prête à un éventail de matière premières (bois dur, bois tendre, culture herbacées etc. (Singh et al., 2015)).

2.2.2.2.2. Prétraitement organosolv

Le principe de cette technique, venant de l'industrie papetière, consiste en l'extraction de la lignine et d'une fraction des hémicelluloses par des solvants hydro-organiques (mélange homogène eau /éthanol, acétone, méthanol éthylène glycol). A 150-200°C et avec l'ajout d'un catalyseur acide ou alcalin, la cellulose et les hémicelluloses sont hydrolysées. Lorsqu'il est utilisé comme prétraitement, il conduit à trois fractions séparées : la lignine solubilisée, une fraction aqueuse hémicellulosique et une fraction solide constituée essentiellement de cellulose et d'hémicelluloses. Lorsque des catalyseurs acides sont ajoutés, les rendements d'extraction en xylose et en lignine sont plus élevés (S. J. B. Duff and Murray, 1996; El Hage et al., 2010a). Les études ont montré que si le prétraitement est réalisé à des températures élevées l'ajout d'un acide entraîne la formation d'inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation (El Hage et al., 2010a).

2.2.2.3. Procédés thermo-physico-chimique

Les prétraitements physico-chimiques rassemblent une large gamme de technologies basées sur le principe de l'hydrolyse et de la solubilisation partielle des composés organiques à haute température. Ces traitements sont réalisés en présence d'eau liquide à haute température (150-260°C) et pression (10-50 bars), pouvant éventuellement dans une 2^{ème} étape être détendue rapidement sous forme de vapeur (Steam explosion).

Le prétraitement par explosion à la vapeur permet l'hydrolyse des hémicelluloses, et la solubilisation d'une partie de la lignine (**figure 25**) (Brownell and Saddler, 1987; Brownell et al., 1986). Les acides organiques (acide formique, acide acétique...) formés à partir des groupes acétylène présents dans le bois (hémicelluloses) catalysent l'hydrolyse des hémicelluloses (Wayman

and Lora, 1980). Les paramètres importants du prétraitement sont la température (corrélée à la pression), la durée de prétraitement (ou temps de séjour) et la taille des copeaux de bois. Au cours de ce traitement, la vapeur (180-270°C) pénètre dans les copeaux de bois et déclenche la réaction d'autohydrolyse (vapocraquage). Après un temps de séjour défini (1 à 20 min), une décompression explosive provoquée par une chute brutale de pression induit des forces de cisaillement dans la matière qui entraîne une déstructuration de la matière lignocellulosique et, selon les conditions, une modification de ses propriétés physiques. La structure de la lignine est également modifiée, ce qui facilite son extraction (Jacquet et al., 2010a).

Des variantes à l'explosion à la vapeur ont été développées pour augmenter les rendements et éviter la formation d'inhibiteurs : ajout d'acide sulfurique, d'ammoniaque ou de CO₂ (**tableau 9**) (W. R. Grous et al., 1986). La méthode la plus prometteuse est l'explosion à la vapeur en condition acide. L'acide permet une hydrolyse des hémicelluloses pour des conditions moins sévères (150-200°C, 16 bar, 2,5 minutes, 0,1N d'H₂SO₄) limitant la dégradation des sucres. Ce procédé est adapté avant une hydrolyse enzymatique (S. J. B. Duff and Murray, 1996).

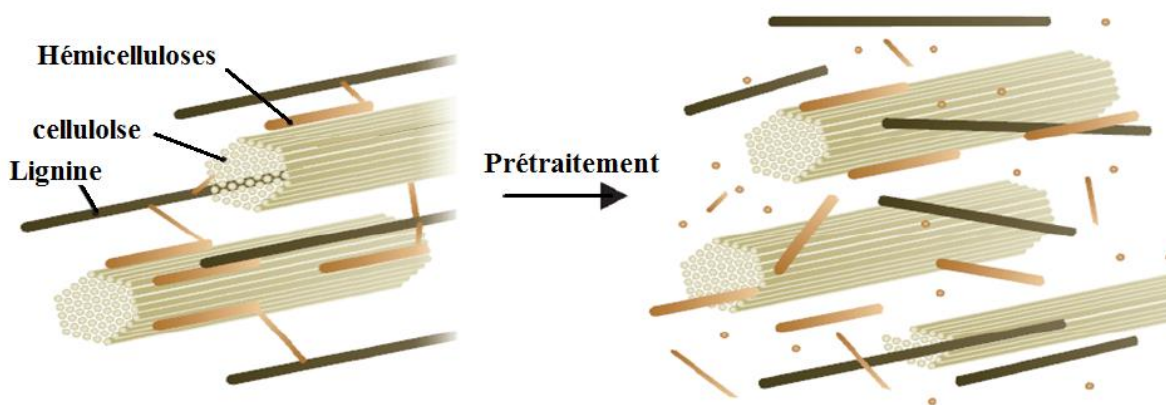


Figure 25: illustration de l'effet du prétraitement sur la BLC:

Tableau 10: Exemple de prétraitements physico-chimiques.

Prétraitements	Actions	Avantages	Inconvénients
Explosion à la vapeur	Séparation des fibres, auto-hydrolyse et solubilisation partielle des hémicelluloses (Cara et al., 2008)	• Destruction intense • Rapide • Peu d'impact sur l'environnement	• Coûts des équipements et d'énergie
Explosion à l'ammoniac (AFEX)	Séparation des fibres, décristallisation partielle de la cellulose (Kumar et al., 2009)	• Peu d'impact sur l'environnement	• Production d'inhibiteurs
Explosion au CO₂	Extraction de la lignine (Zheng et al., 2009)		

Le prétraitement est donc une étape clé dans le processus de transformation de la BLC en éthanol en facilitant l'accès de la cellulose aux enzymes.

3. Généralité sur le processus d'hydrolyse enzymatique et de fermentation de la biomasse végétale.

Introduction

La transformation de la biomasse lignocellulosique (BLC) en bioéthanol par voie biochimique est basée sur l'utilisation de cultures microbiennes ou de cocktails enzymatiques (biocatalyseurs) dans des conditions douces (pH et température) pour hydrolyser la cellulose en glucose (Ogier et al., 1999). Cette voie de transformation se fait en plusieurs étapes successives. Une première étape de prétraitement du substrat est nécessaire. L'étape d'hydrolyse est le cœur du procédé, durant laquelle la cellulose est hydrolysée en glucose par l'intermédiaire d'enzymes.

3.1. Hydrolyse enzymatique de la cellulose

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose constitue une méthode spécifique qui fait appel à des cellulases afin de convertir la cellulose contenue dans les parois des tissus végétaux en unités

glucose fermentescibles. Ces enzymes sont produites par des microorganismes dits « cellulolytiques » qui utilisent les polysaccharides comme source d'énergie. Ainsi de nombreuses solutions sont étudiées visant à optimiser les prétraitements (Wyman, 2007) et l'efficacité des enzymes (Heinzelman et al., 2009), mais aussi à réduire le coût des enzymes (Himmel et al., 2007) et à mettre au point des plantes moins récalcitrantes aux enzymes (Chen and Dixon, 2007).

Il est connu que l'hydrolyse enzymatique est l'étape qui limite le procédé global de transformation biochimique de la BLC parce qu'elle conditionne la vitesse de la conversion. C'est une réaction complexe faisant partie de la biocatalyse hétérogène dont la vitesse de conversion est fonction de la composition chimique et structurale du substrat. Elle va aussi dépendre de la composition du cocktail enzymatique et des conditions opératoires notamment la charge enzymatique et massique (R. Dekker and Wallis, 1983; S. J. Duff and Murray, 1996; Emmel et al., 2003). L'ensemble de ces paramètres agissent à différentes échelles et selon différents mécanismes et sont donc responsables du ralentissement progressif de la vitesse de conversion. Cela se traduit par une transformation partielle du substrat même sur des temps de réaction longs.

L'amélioration des rendements de la réaction d'hydrolyse enzymatique passe par une meilleure compréhension des mécanismes élémentaires mis en place pour dégrader le substrat. L'amélioration des rendements de cette réaction nécessite à une extrapolation à l'échelle d'un procédé industriel demande de connaître et maîtriser :

- L'évolution des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel
- L'effet des actions combinées des différentes activités enzymatiques
- Les effets des prétraitements sur la dynamique d'évolution des propriétés du substrat et sur sa conversion.

3.1.1. Mode d'action des cellulases

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose peut être réalisée par des enzymes hautement spécifiques, appelées cellulases. Ces enzymes sont produites par des microorganismes comme par exemple les champignons et les bactéries. *Trichoderma reesei* est la plus utilisée en raison de sa forte capacité de production d'enzymes. L'hydrolyse enzymatique de la cellulose consiste en l'adsorption de la cellulase à la surface de la cellulose, à la biodégradation de la cellulose en sucres fermentescibles et à la désorption de la cellulase.

Un substrat aussi complexe que la biomasse lignocellulosique ne peut être hydrolysé totalement par une seule enzyme. Ainsi, la dégradation enzymatique de la cellulose en glucose nécessite l'action synergique d'au moins trois grandes classes d'enzymes : (1) les endo-glucanases, (2) les exo-glucanases et cellobiohydrolases, et (3) les β -glucosidases. Ces trois enzymes sont généralement appelées cellulases ou enzymes cellulolytiques (Wyman, 1996).

Le mécanisme exact de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose n'est pas parfaitement connu, bien qu'un certain nombre de modèles ait été proposé. La théorie classique de l'action des enzymes dans la transformation de la cellulose en glucose, résumé à la **figure 26**, se déroule globalement de la façon suivante : les endo-glucanases attaquent d'abord les régions à faible cristallinité ou amorphes de la cellulose et donnent du cellobiose et des cellulo-oligosaccharides. Les exo-glucanases et les cellobiohydrolases (CBHI et CBHII) qui sont actives sur les régions cristallines de la cellulose attaquent les extrémités libres de la chaîne pour former du cellobiose et des

oligosaccharides. Les cellobiohydrolases forment presque exclusivement du cellobiose. A leur tour, les β -glucosidase, coupent le cellobiose en glucose. Cette enzyme n'est pas une cellulase, mais son action est très importante pour achever la dépolymérisation de la cellulose en glucose.

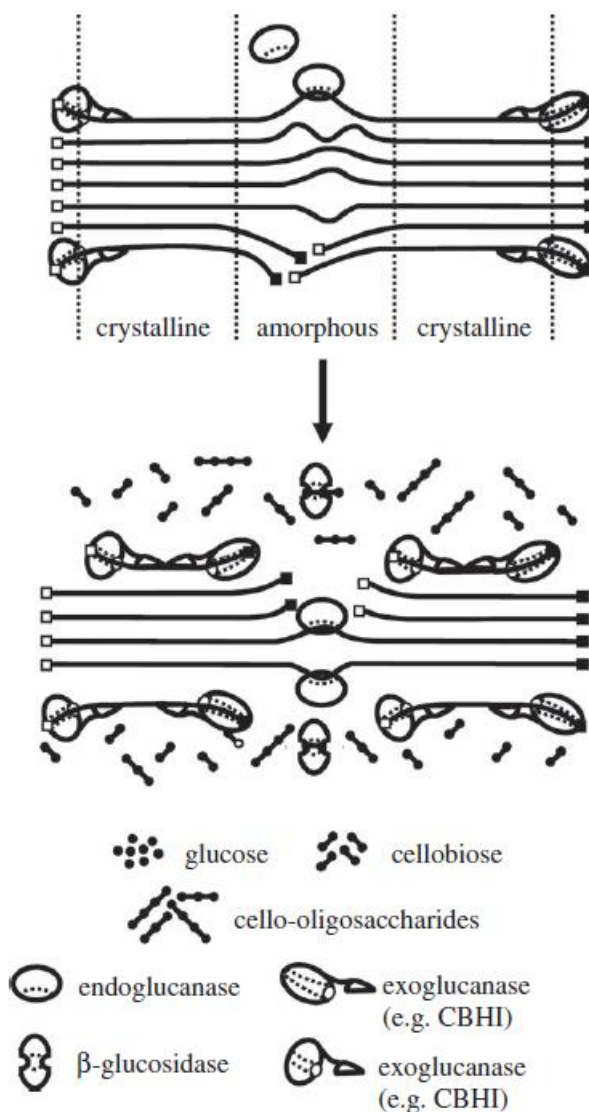


Figure 26: Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose en glucose par des enzymes cellulolytiques (van Zyl et al., 2011).

Dans le cas de la production de biocarburant de seconde génération, les souches industrielles des cellulases de *T. reesei* présentent l'avantage de posséder les trois classes d'enzymes. Bien qu'elles présentent souvent un déficit en β -glucosidase et qu'elles soient inhibées rapidement par les produits formés (glucose et cellobiose), le champignon *Trichoderma reesei* est parmi les plus efficaces en terme de potentiel de sécrétion de cellulases.

3.1.2. Technologie de l'hydrolyse enzymatique

La technologie d'hydrolyse utilisée le plus couramment est la simple mise en contact d'une suspension de substrat lignocellulosique avec la solution enzymatique, et le maintien de la température, du pH et de l'homogénéité du mélange au cours de l'opération. Une fois les conditions optimales de pH et de température déterminées, les possibilités d'optimisation sont particulièrement limitées. Réduire le coût de consommation des cellulases peut également s'obtenir par une réduction de la quantité consommée, en optimisant la technologie d'hydrolyse et/ou en cherchant à recycler les activités enzymatiques récupérables après une première opération d'hydrolyse.

Des tentatives de recyclage des activités enzymatiques récupérables en fin d'hydrolyse ont été effectuées par plusieurs équipes (Ogier et al., 1999). Les résultats sont contradictoires ; ainsi certains préconisent la récupération des activités à partir de la phase liquide obtenue par percolation de cette dernière sur un substrat frais. D'autres préconisent la récupération des activités à partir du résidu solide de l'hydrolyse, par mélange de ce résidu à une charge de substrat frais (Vallander and Eriksson, 1990). D'autre part l'évaluation économique de ce recyclage et de son coût en investissements supplémentaires n'ont pas été effectués.

3.2. Fermentation éthanolique des sucres : *Saccharomyces cerevisiae*

La fermentation du glucose en éthanol est une réaction exploitée depuis des siècles (**équation 5**). Elle peut se faire en présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. D'autres levures, bactéries ou champignon filamenteux peuvent également être utilisées telles que, *Zymomonas mobilis*, *Zymomonas anaerobia*, *Escherichia coli*, ou *Klebsiella oxytaca*. Le rendement théorique maximal est de 0,51 kg d'éthanol et 0,49 kg de dioxyde de carbone par kg de glucose et de xylose. L'équation stœchiométrique de la fermentation du glucose en éthanol s'écrit :



D'après la procédure d'analyse en laboratoire NREL LAP-008 (Dowe and McMillan, 2001; Kang et al., 2015), le rendement de la fermentation, dans le cas d'une saccharification et fermentation simultanée, peut être calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration théorique d'éthanol} = 0,51 \times f[\text{Biomasse}] \times 1,111 \quad \text{Equation 6}$$

$$\text{Rendement d'éthanol} = \frac{[\text{EtOH}]_f - [\text{EtOH}]_0}{0,51(f[\text{Biomasse}]1,111)} \times 100\% \quad \text{Equation 7}$$

Où $[\text{Biomasse}]$ est la concentration massique de la biomasse au début de la fermentation (g/L). f est la fraction de cellulose de la biomasse sèche (g/g) dans le cas d'une fermentation saccharification simultanée. 0,51 est le facteur de conversion du glucose en éthanol basée sur la biochimie stœchiométrique de la levure. $[\text{EtOH}]_f$ est la concentration d'éthanol à la fin de la fermentation (g/L). $[\text{EtOH}]_0$ est la concentration d'éthanol au début de la fermentation (g/L) qui doit être nulle. 1,111 est le facteur de conversion de la cellulose en glucose.

Les microorganismes utilisent les sucres pour leur alimentation et produisent ainsi l'alcool éthylique. Le glucose est l'un des sucres à 6 carbones les plus facilement transformés en éthanol par ces microorganismes. Par conséquent, les hydrolysats de la BLC contenant des taux élevés de glucose sont plus faciles à convertir en éthanol. L'un des microorganismes le plus efficace est la levure *S. cerevisiae* utilisée par l'ensemble des industries de fermentation alcoolique en raison de sa production élevée d'éthanol et de sa tolérance à l'éthanol et à d'autres composés inhibiteurs. Cependant, les souches sauvages de *S. cerevisiae* ne peuvent pas convertir les pentoses de la BLC (xylose, arabinose et des oligosaccharides). Ceci rend la production de bioéthanol à partir de la BLC insuffisante pour une production industrielle optimale. Une modification génétique de ces microorganismes est donc nécessaire pour fermenter les pentoses.

3.3. Présentation des principaux procédés commercialisés

Les principaux procédés de transformation de la BLC en éthanol commercialisés sont représentés au **tableau 11**

Tableau 11: Présentation des principaux procédés commercialisés de la transformation de la BLC en éthanol (*Wertz, 2012*).

Société	Iogen	Abengoa-SunOpta	Cellunol (BCI)	Arkenol	Paszner ACOS
Pays	Canada	USA-Canada	USA	USA	Canada
PROCEDES					
Pré-traitement	Explosion à la vapeur +acide dilué	Explosion à la vapeur	Mécanique		Mécanique
Hydrolyse	Enzymatique	Enzymatique	Par acide dilué en 2 étapes	Acide concentré en 2 étapes	Organosolv
fermentation	C6-C5 ensemble	C6-C5 simultanée/hydrolyse (SSF)	C6-C5 séparés par E. Coli modifié	C6-C5 ensemble par zymomonas	C6-C5 successivement
Stade d'avancement	Usine 4 Ml/an	Pilotes	Pilote	Pilote	Pilote
Projets	Usines	Usines 5Ml/an	Usines	Usines	Pilotes

En gras : les procédés pour lesquels les sociétés sont expertes ou innovantes

Chapitre II. Matériel et méthodes

1. Procédures générales

1.1. La matière première

Les échantillons utilisés dans cette étude sont l'aubier de tranchage et le cœur de déroulage d'okoumé (*Aucoumea Klaineana* Pierre, *masse volumique à l'état anhydre*= $0,484\text{g.cm}^{-3}$ et $0,429\text{g.cm}^{-3}$ respectivement). Ces coproduits de l'industrie de la fabrication de contreplaqué de la Société Equatoriale de Déroulage (SED¹¹) récoltés en 2017, proviennent de la région de Zamaligué, située au Nord-Ouest du Gabon.

Les échantillons ont été stockés à l'abri de l'humidité et des attaques fongiques tout au long de l'étude. Avant toute expérience, les échantillons débités en planches d'environ 45 cm de long sur le site (SED), ont été coupés en plaquettes de 1 à 2 cm à l'aide d'une scie à ruban (MAKITA®) pour faciliter le broyage. Ces plaquettes ont été broyées à l'aide d'un broyeur à fléaux (RETSCH SK 100) muni d'un tamis de 3 mm et tamisées à l'amplitude 70 pendant 5 min avec un tamiseur de type ENDECOTTS LTD® de manière à obtenir trois classes de granulométrie définies dans cette étude : 2 mm, 1 mm et 0,16 mm. Pour obtenir les particules plus fines (1 mm et 0,16 mm), un second broyage était nécessaire. Il a été réalisé avec un broyeur à disque (FRITSCH). Les échantillons ont été placés dans des sacs fermés hermétiquement.

1.2. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans ce travail n'ont fait l'objet d'aucune purification à l'exception du p-dioxane, qui comporte deux atomes d'oxygène voisins (group peroxy), a subi un test aux peroxydes avant d'être utilisé pour éviter des explosions lorsqu'il sera exposé à la chaleur. Par exemple lors de l'extraction au soxhlet.

¹¹ Société Equatoriale de Déroulage

Tableau 12: Liste des solvants utilisés.

Solvant/réactifs	Fournisseur	Qualités	Reference
Acétone	Honeywell	99,5%	CAS : 67-64-1
Acide acétique	Honeywell	99,8%	CAS : 64-19-7
Acide chlorhydrique	Honeywell	37%	CAS : 7647-01-0
Acide sulfurique	Honeywell	95-97%	CAS : 7664-93-9
Dichloroéthane	Sigma	99%	CAS : 107-06-2
Diéthyl éther	Biosolve		CAS : 60-29-7
Dioxane	Biosolve	99,8%	CAS : 123-91-1
Deutérochloroforme (CDCl ₃)	Sigma	99,8%	
Ethanol	Carlo erba	99,9%	CAS : 64-17-5
Ether de pétrole	Sigma	40-60°C	CAS : 64742-49-0
Méthanol	Carlo erba	99,9%	CAS : 67-56-1
n-hexane	Honeywell	95%	CAS : 110-54-3
Soude (NaOH) en pastilles	VWR Prolabo		CAS : 1310-73-2
Pyridine	Agros	99+%	CAS : 110-86-1
Tétrahydrofurane (THF)	Biosolve	99,8%	CAS : 109-99-9
Toluène	Sigma	99,3%	CAS : 108-88-3

Tableau 13: Liste des réactifs utilisés.

Réactifs	Fournisseur	Qualité	Reference
Acétyl acétonate de chrome (III)		97%	CAS : 21679-31-2
Acétate de sodium		99%	CAS : 127-09-3
Acide acétique	Honeywell	99,8%	CAS : 64-19-7
Acide chlorhydrique	Honeywell	37%	CAS : 7647-01-0
Acide sulfurique	Honeywell	95-97%	CAS : 7664-93-9
Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA)			
Chlorure de triméthylsilyle (TMSCl)			
2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP)		95%	CAS : 14812-59-0
Cyclohexanol			
Diméthylsulfoxyde-d ₆		99,9%	CAS : 2206-27-1
Soude (NaOH) en pastilles	VWR Prolabo		CAS : 1310-73-2

Tableau 14: Liste des produits purs utilisés pour l'étalonnage en HPAE-PAD.

Etalon interne	Fournisseur	Qualité
D(+)-Fucose	Agro organique	99%
L-Rhamnose	Sigma	99%
L-(+)-Arabinose	Sigma	99%
D-(+)-Galactose	Sigma-Aldrich	99%
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich	99%
D-(+)-Xylose	Sigma	99%
D-(+)-Mannose	Fluka	99%
Ac. D-Glucoronique	Sigma	98%
Ac.D-(+)-galacturonique	Fluka	97%
D(+)-Cellobiose	Roth	98%
Polystyrène	Fluka	

2. Partie expérimentale

2.1. Composition chimique du cœur et de l'aubier

Les compositions chimiques du cœur et de l'aubier d'okoumé ont été déterminées pour évaluer le potentiel chimique de ces deux types de coproduits en terme de production d'éthanol.

2.1.1. Les extractibles

Le taux d'extractibles a été déterminé en triplicat sur chaque fraction de bois (cœur ou aubier) préalablement séchés à 105°C pendant 24 heures. Une masse de 5 g de biomasse sèche a été extraite pendant 24 heures au soxhlet à l'aide de 375 mL d'un mélange toluène : méthanol : acétone dans les proportions 4 :1 :1, suivi d'une extraction à l'eau froide (soxhlet) pendant 24 h selon un protocole publié (Safou-Tchiama, 2005c). La phase liquide est évaporée et le concentra est séché à 40°C pendant 48h et quantifié.

2.1.2. Taux de cendres

Le taux de cendres du cœur et de l'aubier d'okoumé est réalisé selon la norme TAPPI T 211 CM-86 (2003).

La détermination du taux de cendres est réalisée à l'aide d'un four à moufle équipé d'un thermostat réglé à 575 ± 25 °C et programmé de la manière suivante. La biomasse est chauffée dans une première étape à 250°C pendant 2 h, puis une deuxième étape est réalisée à 500°C pendant 24 h. Pour cela, une masse anhydre de 4 g de matière est placée dans une coupelle en céramique. Après 24 h de réaction, le résidu de cendres obtenu est refroidi dans un dessiccateur puis pesé. Les minéraux représentent donc le résidu restant après oxydation lente à 575 ± 25 °C et le résultat est exprimé en pourcentage de masse (équation 8).

$$\% \text{Cendres} = \frac{\text{masse de cendres}}{\text{masse initiale}} \times 100 \quad \text{Equation 8}$$

Où m_{cendres} est la masse du solide restant ; m_{initiale} est la masse de matière sèche initiale

2.1.3. Dosage de la Lignine Klason et des sucres simples

Les échantillons d'okoumé ayant servi dans ces analyses ont préalablement été extraits au soxhlet, d'abord avec un mélange de toluène-méthanol-acétone (4V :1V :1V) suivi d'une extraction à l'eau froide.

2.1.3.1. Dosage de la lignine de Klason

L'extraction de la lignine Klason (ou lignine insoluble) a été réalisée à l'aide de la méthode normalisée TAPPI T222 om-88 (TAPPI, 2006a) qui utilise de l'acide sulfurique à 72%.

Exactement 175 mg de biomasse sèche sans extractibles, broyée et tamisée (0,16 mm), ont été pesés dans un tube à centrifuger conique de 50 mL. Puis 1,5 mL d'acide sulfurique à 72% (m/m) sont ajoutés. Ce mélange est maintenu à 30°C dans un bain-marie maintenu sous agitation mécanique pendant 1 heure, une agitation manuelle et régulière à l'aide d'une tige en verre est également assurée. Ensuite 42 mL d'eau ultrapure sont ajoutés pour atteindre une concentration en acide sulfurique de 4% massique. Le mélange est ensuite placé dans un autoclave à 121° pendant 1 heure. Après refroidissement, le mélange est filtré sous vide modéré sur filtre en fibres de verre. Le résidu solide constitué de lignine insoluble est séché à l'étuve à 105°C pendant 24 h puis est pesé après refroidissement à température ambiante dans un dessiccateur. Le filtrat riche en monosaccharides est complété à l'eau ultrapure à 100 mL, puis stocké à -5°C avant analyse en chromatographie ionique (HPAE-PAD). Le pourcentage de lignine Klason est déterminé comme suit :

$$\% \text{ lignine} = \frac{m_{\text{résidu solide}}}{m_{\text{masse initiale}}} \times 100 \quad \text{Equation 9}$$

Où : $m_{\text{résidu}}$ est la masse sèche de lignine insoluble ; et m_{initiale} est la masse de matière sèche initiale sans extractibles.

2.1.3.2. Dosage des lignines solubles

Le dosage des lignines solubles est effectué par analyse spectrophotométrique (voir paragraphe 1.6.4). Après dilution de l'échantillon, la concentration en lignine soluble [LS] est obtenue par lecture de l'absorbance en spectrométrie UV à 205 nm et déterminée à partir de **l'équation 10**. Le pourcentage en lignine soluble (%LS) dans un effluent liquide est déterminé par calcul direct (**équation 11**).

$$[LS] \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{Abs}{110(L.g^{-1}.cm^{-1}) \times 1(cm)} \times \alpha \quad \text{Equation 10}$$

$$\text{Lignine soluble (\%)} = \frac{Abs \times \alpha \times V_t(L)}{110 (L.g^{-1}.cm^{-1}) \times 1(cm) \times M_i(g)} \times 100 \quad \text{Equation 11}$$

Où : Abs : absorbance mesurée à 205 nm, α : le facteur de dilution, V_t : volume total de la phase aqueuse de départ (L); 110 : absorptivité (L/g.cm), 1 cm : longueur du trajet optique. M_i : la masse sèche initiale de la biomasse (g).

2.1.3.3. Sucres simples

Le filtrat complété à 100 mL est d'abord homogénéisé vigoureusement puis dilué et filtré à 0,45 μm avant d'être analysé par HPAEC-PAD.

Le dosage des monosaccharides et des acides uroniques est réalisé par chromatographie ionique (HPAEC-PAD), sur un équipement Dionex ICS-3000 constitué d'une pompe gradient SP, d'un passeur AS, d'un détecteur électrochimique ED fonctionnant avec une électrode d'or, une électrode de référence Ag/AgCl. L'ensemble est piloté par le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex Corp, USA).

Une colonne Carbowac PA20 (3 x 150 mm, Dionex) précédée d'une colonne de garde (3 x 30mm, Dionex) est utilisée pour séparer les constituants. La phase mobile est constituée d'un gradient d'eau, de soude à 250 mM et d'acétate de sodium à 1 M NaOAc et 20 mM NaOH. Tous les éluants sont dégazés avant et pendant utilisation. Les séparations sont réalisées à 35°C avec un débit de 0,4 mL.min⁻¹. Un volume de 25 μL de chaque échantillon est injecté. Après chaque analyse, la colonne est rincée rééquilibrée pendant 10 minutes dans les conditions initiales d'analyse.

Les monosaccharides et acides uroniques sont identifiés et dosés en réalisant un étalonnage externe. On identifie et dose le fucose (Fuc), l'arabinose (Ara), le rhamnose (Rha), le galactose (Gal), le glucose (Glc), le xylose (Xyl), le mannose (Man), l'acide galacturonique (GalUA) et l'acide glucuronique (GlcUA).

Le pourcentage de monosaccharides et d'acides uroniques est déterminé par calcul direct selon **l'équation 12**.

$$\text{Composé (\%)} = \frac{C_{m,j} \text{ du composé hydrolysé (g.L}^{-1}) \times v_i(L)}{m_0 \text{ de l'échantillon traité (g)}} \times 100 \quad \text{Equation 12}$$

Où $C_{m,j}$ la concentration massique du monosaccharide « j » (mg/L), V_i , le volume initial (0,1 L) et m_0 la masse de matière initiale de matière sèche sans extractibles (g).

2.2. Prétraitement par explosion à la vapeur

Nous avons vu précédemment (Chapitre I) que le prétraitement par explosion à la vapeur présente deux phases distinctes : le vapocraquage et la dépression explosive. La première permet la pénétration de la vapeur d'eau (150-260°C) sous pression à l'intérieur des copeaux de bois pour initier l'hydrolyse des groupements acétyles et acides uroniques présents dans les hémicelluloses. A leur tour, ces acides organiques (acide acétique et uroniques) vont catalyser l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique en augmentant l'acidité du milieu. Ceci peut dans une certaine mesure, modifier la structure de la lignine et faciliter son extraction. La seconde phase provoque la destruction mécanique du matériau par expansion brutale de l'eau condensée provoquée par la chute brutale de pression. L'effet combiné de ces deux phases permet, dans certaines conditions, d'obtenir une hydrolyse complète des hémicelluloses en mono et oligosaccharides (phase liquide) et une fraction solide déstructurée contenant de la cellulose accessible.



Figure 27: Installation pilote de l'explosion à la vapeur.

1 : générateur vapeur; 2 : mesure de pression du générateur; 3 : mesure de pression du réacteur, 4 : soupape de sécurité du générateur ; 5: vanne de mise en charge ; 6 : réacteur ; 7 : vanne

d'éclatement ; 8 : soupape de sécurité du réacteur; 9 : éclateur ; 10 : conduit d'évacuation de la vapeur ; 11 : filtre à eau ; 12 : arrêt de sécurité hors tension.

La description de la technologie du prétraitement par explosion à la vapeur (EV) montre que deux facteurs sont déterminants : la température du réacteur et le temps de séjour dans le réacteur. L'acidité du milieu joue un rôle également dans le traitement EV. Ainsi des chercheurs (R. Overend and Chornet, 1987) ont combiné le temps et la température en un seul coefficient « S_0 », appelé facteur de sévérité, qui définit les conditions du prétraitement (**équation 13**). Ce facteur va conditionner l'efficacité du traitement par explosion à la vapeur en terme de teneur en sucres dans la phase liquide et de cellulose dans la fraction solide. Les produits hydrolysés (hémicelluloses et cellulose) peuvent, dans des conditions drastiques, se dégrader et générer divers produits (furfural, HMF¹²...). Comme mentionné dans le chapitre I, des variantes du procédé EV ont été développées pour améliorer l'efficacité du traitement et éviter la formation d'inhibiteurs (acide dilué, eau).

$$S_0 = \log_{10}(R_0) \text{ avec } R_0 = t_s \times \exp^{\frac{[T-Tr]}{14,75}} \quad \text{Equation 13}$$

Où S : facteur de sévérité, T : température du traitement (°C) et Tr : température d'ébullition de l'eau à pression atmosphérique (100°C). t : temps de séjour (min.), 14,75 : facteur empirique traduisant le coefficient de température (Jacquet et al., 2010b)

2.2.1. Procédure expérimentale

Le prétraitement par explosion à la vapeur est réalisé sur un pilote de laboratoire conçu conjointement par le LERMaB et la société ADF (**figure.27**). Cent grammes d'échantillons préalablement séchés dans une étuve à 105 °C (4,1% d'humidité) sont d'abord imprégnés pendant 24 heures dans une solution d'acide sulfurique (0,25% ou 0,5% H_2SO_4 w/w) ou dans de l'eau du robinet. Pour toutes les imprégnations, le rapport biomasse/liquide (m/m) est de 1/6 (McIntosh et al., 2016a). L'excès de liquide d'imprégnation est éliminé avant l'étape d'explosion à la vapeur par filtration sous vide en utilisant des filtres en microfibre de cellulose (240 mm, Réf. : 1004240B).

¹²L'hydroxyméthylfurfural

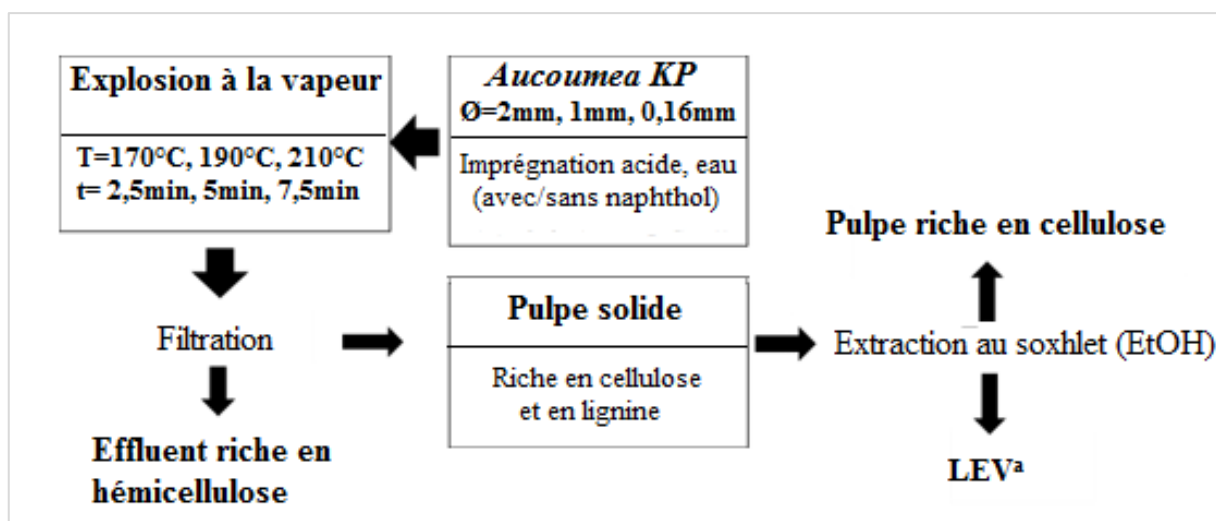


Figure 28: Schéma expérimental du procédé de traitement de la biomasse par explosion à la vapeur.

^a Lignine explosion à la vapeur

Au début de chaque expérience, le réacteur est préchauffé à une température proche de la température de fonctionnement souhaitée. Puis la biomasse imprégnée est chargée dans le réacteur et chauffée à la température de consigne par injection de vapeur (**tableau 15** et **tableau 16**). Après un temps de séjour défini, la pression dans le réacteur est soudainement relâchée, la biomasse est alors éjectée du réacteur et récupérée au niveau de l'éclateur. Le solide est séparé de la fraction liquide récupérée en sortie de l'éclateur par filtration sous vide en utilisant des filtres de cellulose (Grade 4). A la différence du prétraitement à l'eau, la fraction solide issue du prétraitement acide est lavée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Seule la fraction liquide obtenue juste après traitement est recueillie, le liquide de rinçage de l'appareil et celui issu de la neutralisation du pH n'est pas pris en compte. La fraction liquide recueillie est congelée (-20°C) pour des analyses ultérieures (composition chimique). La fraction solide, quant à elle, est d'abord séchée à l'air libre pendant 48 heures pour éliminer l'excès d'eau puis dans un four à 105°C pendant 24 heures pour des analyses (composition chimique et structure).

2.2.2. Choix du solvant d'extraction et protocole de récupération de la lignine d'explosion à la vapeur.

Avant d'entreprendre l'étude de l'influence des facteurs du prétraitement EV sur la composition chimique de la fraction solide, le solvant d'extraction est d'abord déterminé. Il s'agit de choisir, sur la base du rendement en lignine extraite, le solvant le plus efficace entre l'éthanol, le dioxane et la soude. La condition de prétraitement choisie pour cette étude est une température de 210°C, un temps de séjour de 10 min et des fibres de 1 mm de diamètre. Le détail du mode opératoire a été décrit précédemment (**figure 28**).

2.2.2.1. Extraction au dioxane

La lignine de la biomasse prétraitée (210°C-10 min) est isolée grâce à un dispositif de soxhlet. Environ 5 g de la fraction solide récupérée après traitement, préalablement séchée à l'étuve (105°C et pendant 24 h) sont placés dans une cartouche de cellulose. La lignine de cette fraction solide est ensuite extraite dans un ballon de 500 mL contenant un mélange dioxane : eau (9v : 1v). Après 24 h d'extraction, lorsque le solvant est incolore, la fraction de lignine extraite est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif en ramenant le volume de l'extrait jusqu'à 50 mL environ. La lignine ainsi concentrée est diluée avec 4 volumes d'eau permutée et précipitée par ajout goutte à goutte d'acide (H_2SO_4 à 20%) jusqu'à l'obtention d'un pH=2. La solution est ensuite centrifugée à 4000 trs/min pendant 20 min. Le solide précipité est séché à l'étuve à 40°C pendant 48h et enfin pesé (**équation 14**).

$$\% \text{Lignine extraite} = \frac{m_{\text{résidu}}}{m_i} \times 100 \quad \text{Equation 14}$$

Où : $m_{\text{résidu}}$ est la masse sèche du résidu solide ; et m_i est la masse de matière traitée sèche initiale.

2.2.2.2. Extraction à l'Ethanol

Exactement 5 g de biomasse prétraitée sèche (105°C, 24 h) sont placés dans une cartouche de cellulose. La lignine extraite lors du traitement EV est récupérée par extraction solide/liquide au soxhlet avec un mélange éthanol: eau (9v: 1v). Après 24 h de réaction, l'extrait contenu dans le ballon est concentré et dilué avec 4 volumes d'eau, comme dans le cas de l'extraction au dioxane, et précipitée par ajout goutte à goutte d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl, 6 M) jusqu'à l'obtention d'un pH 2 puis centrifugée à 4000trs/min pendant 20min. Après élimination de la phase aqueuse, la lignine est séchée à l'étuve à 40°C pendant 48 h et quantifiée. Le résultat est exprimé en pourcentage de masse sèche (**équation 14**).

2.2.2.3. Extraction à l'hydroxyde de sodium

La lignine alcaline est extraite à partir d'un protocole adapté (Bonini et al., 2005; Li et al., 2009a). Une masse de 31,25 g de biomasse explosée et séchée à 150°C pendant 24h sont traités dans 250 mL d'une solution de NaOH à 1,5% (solide/liquide, 1 :8). Dans un premier temps la cuisson est réalisée à 90°C pendant 15 min à l'aide d'un montage à reflux. L'extrait est filtré et lavé avec de l'eau permutée à l'aide d'un Büchner et d'un filtre en cellulose (12-15 μm). Ce premier filtrat est maintenu à 90°C. Le résidu solide récupéré est de nouveau traité dans 1,5% NaOH. La liqueur noire obtenue est lavée, filtrée et le filtrat obtenu est mélangé au premier.

La lignine contenue dans ce filtrat est précipitée par ajout goutte à goutte d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4 à 20%) jusqu'à l'obtention d'un pH=2 et sous agitation magnétique pendant 1h à 90°C. La solution est ensuite centrifugée puis le solide récupéré est séché 48 h à l'étuve à 40°C. Le résultat est exprimé en pourcentage de masse sèche (**équation 14**).

2.3. Plan d'expérience

L'efficacité du traitement, dont le but est de séparer la fraction hémicellulosique et éliminer la lignine pour augmenter l'accès aux fibres de cellulose, dépend du temps de séjour et de la pression de réaction qui elle est corrélée à la température. Ainsi, pour évaluer le nombre total d'essais de prétraitement à réaliser et étudier l'influence des facteurs du prétraitement, un plan d'expérience de type composé central a été réalisé à partir du logiciel JMP.11. Le domaine de variation des facteurs contrôlés (temps, température, granulométrie, concentration en H_2SO_4) est défini par deux bornes (-1, +1) et un point central (0) pour vérifier la validité du modèle. Ce qui donne un plan factoriel à 3 niveaux (-1, 0, +1). La valeur du point central, A_0 , est déterminée à partir de l'équation 15.

Les variables intervenant lors de la réaction de prétraitement sont la température et le temps, et leur combinaison appelée indice de sévérité (équation 13) sont caractéristiques d'une expérience. Deux types de plans ont été réalisés : l'un pour l'étude de l'influence de la granulométrie de la biomasse et l'autre pour l'étude de l'effet des conditions d'imprégnation. Ce qui donne un plan d'expérience de trois facteurs à trois niveaux, c'est-à-dire un factoriel complet de 3^3 expériences. Ce factoriel complet est fractionné en un plan factoriel à deux niveaux de 2^3 points expérimentaux (n_f) situé au sommet du domaine d'étude, complété par un point situé au centre du domaine d'étude (n_0) et un plan en étoile sur lequel les points n_a sont situés sur les axes à la même distance du centre du domaine d'étude. Le nombre d'essais est donc donné par la formule de l'équation. 16.

$$A_0 = \frac{A_{max} + A_{min}}{2} \quad \text{Equation 15}$$

$$n = n_f + n_0 + n_a \quad \text{Equation 16}$$

Où A_{max} : l'extrémité maximale du facteur, A_{min} : l'extrémité minimale et A_0 : le point central.

2.3.1. Influence de la granulométrie : imprégnation à l'eau

L'étude de l'influence de la granulométrie du bois (Ballesteros et al., 2002; Eklund et al., 1995; Rollin et al., 2011), de la durée (temps de séjour) de réaction et de la température du traitement sur le contenu en hémicelluloses, en cellulose et en lignine dans la biomasse traitée nous a amenée à utiliser un plan d'expérience. Des études montrent que la teneur en humidité influence la vitesse de montée en température à l'intérieur des fibres et que ce facteur dépend de la taille des fibres (Brownell et al., 1986) mais aussi que la taille des particules a un effet sur l'efficacité du prétraitement à améliorer la digestibilité enzymatique de la biomasse traitée (Ballesteros et al., 2002).

Les paramètres suivants ont été étudiés : granulométrie (0,16-1-2 mm), temps (2,5-5-7,5 min) et la température (170-190-210°C). Dans cette étude, trois essais au point central ont été effectués, menant à un plan central composé de 17 séries d'expériences au total. La matrice du plan est représentée au **tableau 15**.

Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'analyse des fractions solides récupérées après traitement. La fraction liquide recueillie a été congelée (-20°C) pour déterminer la quantité de lignine soluble. Les trois classes de granulométrie obtenues ont été traitées par l'explosion à la

vapeur. La lignine a ensuite été extraite par extraction solide/liquide au soxhlet avec un mélange éthanol-eau conformément au protocole décrit à la **figure 28**. Cette lignine extraite, appelée lignine d'explosion à la vapeur (LEV) a été quantifiée et les fibres lavées à l'éthanol ont été conservées à l'abri de la lumière et de l'air pour l'analyse ultérieure de leur composition chimique.

Tableau 15: Matrice d'expérience du traitement EV avec imprégnation à l'eau (unités codées)

Essai n°	Températures facteur1	Temps facteur2	Diamètres facteur3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
Niveau -1	170°C	2,5min	0,16mm
Niveau 0	190°C	5min	1mm
Niveau +1	210°C	7,5min	2mm

2.3.2. Influence de la catalyse acide : imprégnation à l'acide sulfurique

Dans le procédé EV, l'acidité du milieu réactionnel catalyse l'hydrolyse des hémicelluloses. L'étude du prétraitement avec imprégnation acide est ainsi réalisée pour évaluer son impact sur l'efficacité du traitement EV dans l'élimination de la lignine et des hémicelluloses indispensable à la bonne digestibilité enzymatique de la cellulose (Emmel et al., 2003; McIntosh et al., 2016b; Nguyen et al., 1998a; Ramos et al., 2000a). Il est connu que lors du prétraitement EV la température et la concentration en acide sont des facteurs qui ont un effet significatif sur les constituants de la biomasse traitée (Kataria et al., 2017a). La gamme de paramètres suivants est étudiée : H₂SO₄ (0-0,25-0,5%), temps (2,5-5-7,5min) et la température (170-190-210°C).

Un plan composé central à trois niveaux pour chaque variable a été utilisé afin d'évaluer le nombre d'expériences à réaliser pour l'étude de l'effet de la concentration en H₂SO₄, du temps de réaction et de la température utilisés. Deux essais au point central sont effectués pour une éventuelle estimation de l'erreur expérimentale utile pour l'analyse de variance. Ce qui nous a donné un plan central conduisant à 16 séries d'expériences au total. La matrice du plan est représentée au **tableau 16**.

Tableau 16: Matrice d'expérience du traitement EV avec imprégnation à l'acide sulfurique.

N°échantillons	Températures	Temps	H ₂ SO ₄
1	0	0	1
2	0	0	-1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	-1	0	0
6	0	0	0
7	0	1	0
8	1	-1	1
9	-1	-1	1
10	0	-1	0
11	1	-1	-1
12	0	0	0
13	-1	-1	-1
14	1	0	0
15	1	1	1
16	1	1	-1
Niveau -1	170°C	2,5min	0% ^a
niveau 0	190°C	5min	0,25% ^a
Niveau +1	210°C	7,5min	0,5% ^a

2.4. Utilisation de scavengers : imprégnation au Naphtol

Le prétraitement avec imprégnation au naphthol permet d'améliorer le rendement de récupération de la lignine extraite (Hage, 2010; Li et al., 2007a; Obame et al., 2019).

Le traitement a consisté à imprégner 100 g (biomasse sèche) d'okoumé dans 1 L d'éthanol contenant 4 g de naphthol (Sigma Aldrich $\geq$ concentration) (Li and Gellerstedt, 2008). L'ensemble a été homogénéisé sous agitation magnétique pendant 1 h, pour assurer une imprégnation uniforme, puis laisser à évaporation pendant 24 h à la température ambiante sous une hotte ventilée. L'échantillon est ensuite traité par explosion à la vapeur et la lignine est extraite comme schématisé à la **figure 28**.

2.5. Lignine de bois broyé (Milled wood lignin)

Les copeaux de bois ont d'abord été broyés de sorte à passer à travers un tamis de 0,05 mm de taille de mailles. Puis le bois a été traité avec mélange d'éthanol: benzène (1 : 2v/v) pendant 24 heures au soxhlet et extrait de nouveau au soxhlet pendant 24 heures avec de l'éthanol (250 mL) pour éliminer les substances extractibles. Le bois extrait a été séché sous hotte. Environ 100 g de bois extrait a été broyé dans un broyeur à boulets rotatif à température ambiante. Les échantillons broyés ont été extraits deux fois avec un mélange réactionnel où le rapport dioxane/eau était de

96/4 (v / v) et maintenus sous agitation magnétique pendant 24 heures dans l'obscurité. Le rapport solide : liquide était de 1 :10. Les extraits dioxane/eau ont été combinés, filtrés et réduits jusqu'à 100 mL de solvant à 35°C sous pression réduite. Le concentrat a été ajouté goutte à goutte à de l'eau ultrapure (400 mL) en agitant, puis l'ensemble a été lyophilisé. L'échantillon lyophilisé a été ensuite dissous dans de l'acide acétique à 90% (50 mg / mL d'acide) et précipité dans de l'eau ultrapure (1 g / 220 mL d'eau). Après centrifugation (15 min environ), les solides ont été dissous dans 10 mL de 1,2 dichloroéthane/éthanol (2: 1 v/v) et précipités dans 200 mL d'éther. Le mélange a été centrifugé et lavé avec de l'éther de pétrole puis séché à l'étuve à 40°C avant analyse en RMN.

2.6. Structure chimique de la lignine durant le prétraitement d'explosion à la vapeur

2.6.1. Purification

Les échantillons de lignine sont d'abord purifiés. Environ 250 mg de lignine sèche sont purifiées à l'aide d'un soxhlet en utilisant du n-hexane (pur ≈95%) comme solvant. Après 6h les échantillons sont séchés à l'étuve à 40°C pendant 24h.

2.6.2. Préparation des échantillons de lignine pour la RMN du phosphore ^{31}P et quantification des groupes –OH

L'application de la technique RMN ^{31}P sur la lignine a été développée par Argyropoulos et collaborateurs (A. Granata and Argyropoulos, 1995). Ainsi, les échantillons de lignine ont fait l'objet d'une dérivation selon cette méthode. A cet effet, une solution « A » d'un mélange Pyridine/ CDCl_3 (1,6 :1/v : v) est d'abord préparée. Pour cela, 8 mL de pyridine et 5 mL de CDCl_3 sont prélevés et mélangés dans une fiole de 20 mL. Puis 36 mg d'acétylacétate de chrome (III) et 40 mg de cyclohexanol sont pesés dans une fiole de 10 mL. Cette solution est complétée avec la solution « A » (Pyridine/ CDCl_3) jusqu'au trait de jauge (10 mL). Ce mélange constitue la solution « B ». La pyridine est utilisée comme base pour piéger l'acide chlorhydrique formé lors de la réaction et ainsi amener la réaction à une conversion totale. Le chloroforme sert à obtenir un signal deutéré pour l'expérience RMN ainsi qu'à éviter la précipitation du sel de pyridine-HCl. Enfin 25 mg de lignine sèche sont pesés très précisément dans une fiole de 5 mL et solubilisés avec 400 μL de la solution « A ». A ce mélange sont ajoutés 150 μL de « B ». Puis, sous une hotte, 50 μL de 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP, le réactif phosphorylant) sont ajoutés à l'aide d'une micropipette de 100 μL . Le tout est homogénéisé pendant quelques secondes. Enfin l'ensemble est aussitôt transféré dans un tube de RMN de 5 mm et analysé pendant 1h30 sur un spectrophotomètre Brüker 200 MHz. Les spectres obtenus sont traités avec le logiciel Top Spin 4.0.2. La concentration de chaque groupement fonctionnel hydroxyle (en mmol. g^{-1}) est calculée sur la base de l'hydroxyle contenu dans l'étalon interne (le cyclohexanol) avec un déplacement chimique d'environ 145 ppm. Les différentes régions d'intégrations sont rassemblées dans le **tableau 17**.

Les estimations quantitatives des divers groupes fonctionnels hydroxyles sont obtenues en effectuant le calcul décrit ci-dessous. La zone de signal du cyclohexanol dérivé avec du TMDP, qui correspond à $6,01 \cdot 10^{-4}$ g de cyclohexanol, est intégrée et calibrée à 1,0. Etant donné que cette molécule contient un groupe hydroxyle et a une masse moléculaire de 100,16 g / mol, ainsi le ratio $\frac{6,01 \times 10^{-4}}{100,16} = 5,9994 \times 10^{-6}$ correspond au nombre de moles de groupements hydroxyles présents dans le standard interne. Comme la région d'intégration de l'étalon interne a été étalonnée à 1,0 chaque unité de surface dans le spectre est égale à $5,9994 \times 10^{-6}$ moles de groupes hydroxyle.

Pour chaque spectre, cette valeur (ou facteur) est multipliée par la région d'intégration d'intérêt et divisée par la masse de l'échantillon de lignine. Par exemple, si l'échantillon de lignine pesait 25,28 mg et que l'intégration de la région était égale à 1,859, alors: $\frac{(1,859 \times 5,9994 \times 10^{-6})}{0,02528} = 4,4 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$ de groupements hydroxyles sont présents dans l'échantillon de lignine. Cette valeur a été multipliée par 1000 et est exprimée en mmol.g⁻¹ de lignine.

Tableau 17: Groupes fonctionnels et zones d'intégration utilisées pour les spectres de RMN ³¹P des lignines phosphorylées.

Groupes fonctionnels	Zone d'intégration (ppm)
OH Cyclohexanol (référence interne)	145,3-139,8
OH aliphatiques	150,0-145,3
OH syringyles+condensés	144,0-141,0
OH guaiacyle	141,0-137,0
OH p-hydroxyphényles	138,6-136,9
OH acide carboxyliques	136,2-134,0

2.6.3. RMN ¹³C et la chromatographie de cohérence magnétique hétéronucléaire (HSQC)

L'utilisation de la RMN ¹³C et de la RMN ¹H permet d'élucider la structure de la lignine. Cependant ces techniques souffrent d'un problème de chevauchement des signaux. Par conséquent la RMN 2D, notamment la HSQC, est d'une grande aide pour l'obtention des informations plus précises sur la structure de la lignine. En effet cette technique a permis de mettre en évidence et de quantifier les motifs inter-unités (β-O-4, β-β et β-5), les unités oxydées (S'et G') et la proportion de sucres résiduels. Les échantillons sont préparés en dissolvant 200 mg de lignine purifiée et non acétylée dans un tube à vis de 14 mL avec 0,4 mL de diméthylsulfoxyde-d₆ (99,8%). Le mélange est homogénéisé aux ultrasons pour une dissolution totale. A l'aide de deux pipettes Pasteur, l'ensemble est filtré et placé dans un tube à RMN. L'analyse est réalisée par l'intermédiaire d'un spectromètre Brüker Avance de 400 MHz à une température de 50°C pour réduire la viscosité. L'acquisition des spectres est faite en appliquant le programme d'impulsion Bruker standard pendant trois nuits (¹³C : 11000 scans ; HSQC : 48 scans) et un délai de 1,5 s. Les spectres obtenus sont ensuite traités par le logiciel Top spin.

2.6.4. Distribution moléculaire en masse (Mw) et en nombre (Mn)

Les masses moléculaires moyennes en masse (Mw) et en nombre (Mn) des lignines de bois explosé sont déterminées par HPLC-SEC-UV sans acétylation car elles sont extraites à l'éthanol et sont donc potentiellement solubles dans du THF. Dans un pilulier ambré, environ 1,5 mg de lignine séchée est ajouté à 1,5 mL de tétrahydrofurane (THF) non stabilisé. L'échantillon est ensuite mis sous agitation magnétique pendant 24 h pour une solubilisation complète. L'échantillon est ensuite, filtré à 0,45 µm en s'assurant qu'aucune particule n'est visible dans le filtre confirmant ainsi une solubilisation complète. Enfin l'analyse de la lignine est réalisée en utilisant un chromatographe HPLC Shimadzu Prominence, à l'aide de deux colonnes placées en série Shodex GPC KF-806L 10 µm (8.0 x 300 mm) et Phenomenex Phenogel 5 µm 100 Å (7.8 x 300 mm). Le débit de la phase mobile (éluant) constituée de THF non stabilisé est de 0,7 mL.min⁻¹. La solution filtrée est injectée (20 µL) et séparée à 35°C. Le polystyrène est utilisé comme étalonnage externe pour l'obtention des chromatogrammes. La détection est réalisée à une longueur d'onde de 280 nm (Shimadzu SPD-20A). Les masses moléculaires moyennes en masse (Mw), en nombre (Mn) ainsi que l'indice de polydispersivité sont déterminés par le logiciel LC Solution.

2.7. Caractérisation chimique et morphologique de la biomasse traitée.

Une étude morphologique de la biomasse traitée est effectuée pour évaluer l'impact du traitement EV sur la composition chimique de la biomasse d'une part et sur la structure de la cellulose et de la lignine d'autre part.

2.7.1. Dosage des sucres simples et de la lignine résiduelle

Après traitement EV et extraction de la lignine au soxhlet (**figure 28**), la teneur en sucres résiduels des différentes biomasses issues de chaque traitement a été déterminée comme suit : environ 5 grammes de biomasse sèche extraite à l'éthanol ont été broyés et tamisés (0,16 mm). Le taux de lignine a été déterminé selon la méthode normalisée TAPPI décrite précédemment (paragraphe 2.1.3.1). Les sucres résiduels ont ensuite été caractérisés par Chromatographie ionique (HPAEC-PAD).

2.7.2. Caractérisation de la cellulose par SEC

Une étude de la distribution de la masse moléculaire par chromatographie d'exclusion de taille est effectuée pour déterminer le degré de polymérisation (DP) des échantillons de la cellulose issus des différentes conditions de traitement EV (voir chapitre I, paragraphe 1.6.2.1).

2.7.2.1. Extraction de l'holocellulose par la méthode aux chlorites de sodium

Avant d'étudier le DP de la cellulose, l'extraction de l'holocellulose de la biomasse traitée est réalisée par adaptation de la méthode TAPPI T 203 OM-88. Pour cela, 2 g de biomasse traitée séchée pendant 24 h sont extraits pendant 24 h avec un mélange éthanol : toluène (50 : 50) et laissés à sécher à l'étuve (24 h). Ensuite dans un ballon bicol de 250 mL muni d'un barreau aimanté 1,5 g de cette biomasse extraite sont mélangés avec 125 mL d'eau permutée auxquels sont ajoutés 1 g de chlorite de sodium (NaClO_2) et 1 mL d'acide acétique glacial. L'ensemble est porté à reflux pendant 2 h à 70 °C sous agitation continue. Le chlorite de sodium et l'acide acétique glacial sont ajoutés chaque deux heures jusqu'à l'obtention de fibres de bois blanches indiquant une délignification totale. L'holocellulose obtenue est ensuite récupérée par filtration sous vide puis lavée plusieurs fois à l'eau permutée avant d'être séchée dans une étuve de 40°C pendant 24 h.

2.7.2.2. Obtention de la cellulose

La cellulose est obtenue à partir de l'holocellulose en effectuant une hydrolyse acide des hémicelluloses. A cet effet, 1 g d'holocellulose et 40 mL d'acide chlorhydrique (2,5 M) sont mélangés dans un ballon de 100 mL sous agitation magnétique. L'ensemble est porté à reflux et maintenu à 100°C pendant 4 h dans un bain d'huile et laissé sous agitation continue. A la fin de la réaction, le contenu du ballon est filtré sous vide à l'aide d'un filtre puis lavé abondamment à l'eau permutée. Enfin, la cellulose est séchée dans une étuve à 40°C pendant 24 h.

2.7.2.3. Tricarbonilation de la cellulose et analyse

Les échantillons de cellulose à analyser par SEC sont dérivatisés avec de l'isocyanate de phényle. La procédure est la suivante. Dans un ballon de 50 mL, 30 mg de cellulose sont mélangés avec 8 mL de pyridine et 1 mL d'isocyanate de phényle. Le ballon est scellé soigneusement par un bouchon en téflon puis plongé dans un bain d'huile réglé à une température de 65°C. Le mélange est maintenu à cette température sous agitation pendant 2 à 3 jours jusqu'à une dissolution complète de la cellulose. Une fois la cellulose dissoute, le mélange est refroidi et 2 mL de méthanol sont ajoutés pour éliminer l'excès d'isocyanate de phényle. Par la suite, la totalité de la solution de cellulose est versée dans un bécher contenant 200 mL d'un mélange eau/méthanol (3 / 7) afin de faire précipiter la cellulose tricarbanilée. Ce précipité cellulosique, reparti dans des flacons de 50 mL, subit plusieurs étapes de lavage et de purification par centrifugation à 8000 trs/min (pendant 2,5 min), à savoir trois fois avec le mélange eau/méthanol, puis deux fois à l'eau permutée.

Après élimination d'une partie de l'eau de lavage, la cellulose tricarbanilée est lyophilisée. A l'issue de la lyophilisation, 15 mg de tricarbanilate de cellulose sont solubilisés dans 3 mL de THF jusqu'à dissolution complète. Cette solution est filtrée (0,45 μ m) et récupérée dans un flacon en verre de 1,5 mL puis analysée par SEC pour déterminer le degré de polymérisation de la cellulose par HPLC-SEC-UV. Le THF est utilisé comme éluant avec un débit de 0,7 mL/min à 35°C et la boucle d'injection est de 20 μ L. La détection est réalisée à une longueur d'onde de 236 nm. Le polystyrène est utilisé comme étalon externe avec 5 points de calibration.

2.7.3. Caractérisation de la cellulose par diffraction aux rayons X

L'analyse par diffraction aux rayons X a été réalisée à l'Institut Jean Lamour (Nancy). Le diffractomètre utilisé (modèle Supernova de Oxford diffraction) est équipé d'une anode de cuivre (λ K α 1=1,54056 nm, λ =K α 2=1,544339 nm). La tension appliquée est de 40 V, le goniomètre est de type PW3050/60 et la diffraction est de type XPERT-PRO. Les échantillons, sous forme de sciures sont étalés de manière uniforme sur un verre de quartz et portés sur le support d'acquisition. Les diffractogrammes ont été obtenus par accumulation des intensités $I(2\theta)$ de $2\theta=5^\circ$ à $2\theta=40^\circ$ à température ambiante. Pour chaque échantillon, l'intensité résultante entre $22,4^\circ \leq 2\theta \leq 22,6^\circ$ correspond à l'intensité de la raie de diffraction du plan cristallographique 002 (I_{002}) de la cellulose I_β . L'intensité entre $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ correspond à celle de la phase amorphe (I_{am}). Le calcul de l'index de cristallinité utilise ces intensités (voir chapitre II).

2.8. Analyse de la phase liquide issue du traitement EV

2.8.1. Teneur en sucres

Pour quantifier les sucres générés au cours du prétraitement, une hydrolyse acide a été effectuée pour convertir les oligomères en monomères. L'analyse de la composition a été effectuée en triplicat (Alvira., 2016).

Ainsi, après prétraitement par explosion à la vapeur, la phase liquide récupérée est homogénéisée vigoureusement, puis 0,5 mL de liquide ainsi que 349 μ L d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés à 9 mL d'eau ultrapure dans un tube à centrifuger (15 mL). Le tout est ensuite autoclaver à 121°C pendant 1 h. Le volume de solution récupérée est ensuite ajusté exactement à 10 mL. Après homogénéisation au vortex les solutions sont diluées 25 fois puis filtrées (0,45 μ m) pour être analysées par HPAE-PAD.

2.8.2. Teneur en produits de dégradation : acide acétique, acide formique, acide lévulinique, furfural et HMF

Une analyse des produits de dégradation des hexoses (HMF) et des pentoses (furfural, acide acétique,...) est réalisée. A cet effet, la fraction liquide récupérée après prétraitement par explosion

à la vapeur est centrifugée pour séparer les petites particules solides qu'elle contient à 3000 trs/min. pendant 15 min. La phase liquide récupérée est homogénéisée, un échantillon est ensuite prélevé puis filtré (0,45 µm) et enfin analysés par HPLC-UV. La séparation est effectuée sur une colonne Agilent HiPlex H⁺ (Phenomenex) à une température de 60°C avec l'acide sulfurique 5 mM. Le débit d'éluant est de 0,7 mL.min⁻¹. La détection est réalisée par spectrophotométrie UV à 210 et 280 nm. Un étalonnage externe avec 5 points de calibration est réalisé. La masse de chaque produit est définie comme suit (**équation 17**).

$$\text{Masse du Composé (\%)} = \frac{Cs(g.L^{-1}) \times Vt(L)}{Mi(g)} \times 100$$

Où Cs : concentration du composé (g.L⁻¹), Vt : volume total de la phase liquide (L), Mi : masse de matière sèche de départ (g).

2.8.3. Taux de lignine soluble

Le dosage des lignines solubles présentes dans la phase liquide récupérée après prétraitement par explosion à la vapeur est effectué par analyse spectrophotométrique en suivant la méthode UM-250 (TAPPI 1985b) décrite par Lin et Dence (1992) pour une longueur d'onde λ=205 nm et en utilisant une cuve en quartz de trajet optique 1cm. Le taux de lignine est déterminé à partir de l'**équation 18**.

$$\text{Lignine soluble(\%)} = \frac{Abs \times \alpha \times V_t(L)}{110 (L.g^{-1}.cm^{-1}) \times 1 (cm) \times M_i(g)} \times 100 \quad \text{Equation 18}$$

Où : Abs : absorbance mesurée à 205 nm, α : le facteur de dilution, V_t: volume total de la phase aqueuse de départ (L); 110 : absorptivité à (L/g.cm). 1 cm: longueur du trajet optique. M_i : la masse sèche initiale de la biomasse (g).

2.9. Hydrolyse enzymatique de la biomasse traitée :

Comme mentionné dans le chapitre I, l'étape d'hydrolyse enzymatique suit la phase de prétraitement, en l'occurrence le traitement EV. Elle est réalisée sur la biomasse traitée afin d'étudier l'influence du traitement EV sur l'accessibilité de la cellulose aux enzymes. (S. J. Duff and Murray, 1996; McIntosh et al., 2016a; R. Overend and Chornet, 1987)

Les expériences d'hydrolyse sont réalisées sur de la biomasse traitée par prétraitement EV et lavée avec un mélange éthanol-eau comme décrit à la **figure 28**.

Dans un erlenmeyer à vis muni d'un bouchon, 2 g de pâte cellulosique broyée (0,16 mm) sont ajoutés à 100 mL de solution tampon d'acétate de sodium 50 mM (pH de 4,8).

Les concentrations en substrat et en enzymes sont respectivement de 2% (m/v) et de 45 IFPU¹³.g⁻¹ de substrat. Le mélange est incubé à 50°C dans un incubateur rotatif (**figure 29**) à 170 rpm pendant 30 min (étape de pré-incubation). Un premier prélèvement est effectué juste avant l'ajout de l'enzyme qui représente le temps t_0 (point initial). Après la pré-incubation, l'hydrolyse est initiée par l'ajout de 1,14 mL de cellulase de *Trichoderma reesei* (≥ 700 unités/g - référence C2730 Sigma Aldrich). Ce cocktail liquide contient les activités cellulolytiques EG, CBH et BGL (Monot, 2015). Une activité enzymatique équivaut à la production d'une μmol de sucres réducteurs par minute dans des conditions de température et de pH contrôlés. Mais pour des raisons de standardisation, l'IUPAC¹⁴ donne l'ensemble des activités enzymatique en FPU.

L'hydrolysats a été échantillonné périodiquement sur une durée de 72 heures afin de suivre la cinétique de conversion de la cellulose en glucose. Lors des 12 premières heures un prélèvement est réalisé après 3 h puis toutes les 12 h. Les échantillons prélevés sont trempés dans l'eau bouillante pendant 10 min pour cesser l'activité des enzymes, puis centrifugés pendant 15 min (4000 trs/min). Les phases liquides récupérées sont conservées à -20°C pour une quantification par HPAEC-PAD des sucres notamment le glucose libéré par les enzymes.

La quantité de glucose des hydrolysats et la digestibilité enzymatique sont calculées à partir de l'équation 19 et l'équation 20.

$$\text{Glucose (\%)} = \frac{C_m \text{ du glucose total hydrolysé } (\frac{g}{L}) \times v_i (L)}{m_0 \text{ de l'échantillon traité (g)}} \times 100 \quad \text{Equation 19}$$

Où C_m la concentration massique du glucose, v_i , le volume initial et m_0 la masse de départ

$$\text{Digestibilité (\%)} = \frac{\text{Glucose totale hydrolysé (\%)}}{\text{Glucose total dans l'échantillon traité (\%)}} \times 100 \quad \text{Equation 20}$$



Figure 29: Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences d'hydrolyse enzymatique.

¹³ Filter Paper Unit

¹⁴ International Union of Pure and Applied Chemistry

2.10. La fermentation des sucres hydrolysés

La fermentation alcoolique est la transformation biologique des sucres du bois en éthanol et dioxyde de carbone sous l'action de levures. Dans cette étude la fermentation est réalisée avec une souche commerciale de levure *saccharomyces cerevisiae* (CHY1011). Chaque expérience a été réalisée en double. La fermentation commence par une étape de culture de la levure (24 h avant). A cet effet une quantité suffisante de levure est produite à l'aide d'un milieu YPD¹⁵ (YPD Broth Sigma Aldrich, France). L'hydrolysate lignocellulosique filtré (0,2 µm) au cours de l'étape d'hydrolyse enzymatique a été autoclavé à 110°C pendant 30 min. Pour cela 900 mL ont été utilisés et le reste a servi pour diluer la levure à une Densité Optique de 600 nm. La levure a ensuite été injectée dans le bioréacteur (Pro-Lab, CBIO2, Global process Concept SAS, France) pour amorcer la fermentation (**figure 30**).

Les expériences de fermentation ont été effectuées dans des conditions anaérobies, à 30°C, avec un pH 5 et le milieu agité à 400 trs/min. Les échantillons ont été recueillis toutes les 30 minutes, centrifugés à 12000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été dilué puis filtré pour quantifier le glucose restant et l'éthanol formé par HPLC/RID avec une colonne REZEX RHM-Monosaccharide H+ (300X7.8 mm, 8µm) et un détecteur d'indice de réfraction (RID). La phase mobile était de l'eau ultra pure avec un débit de 1 mL/min à 85°C. L'étalonnage est réalisé avec le glucose. La réaction a pris fin à l'arrêt de l'activité de la levure c'est-à-dire lorsqu'il n'y avait plus de formation d'éthanol (après 2 h environ).

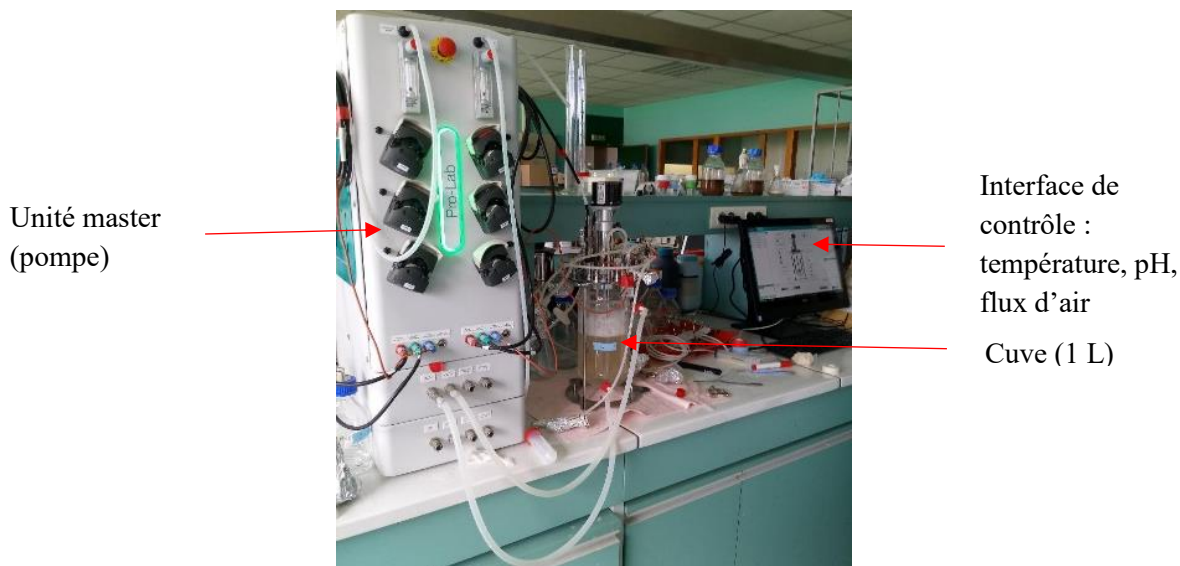


Figure 30: Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences de fermentation.

¹⁵ Yeast extract Peptone Dextrose

Chapitre III. Caractérisation du bois d'okoumé

Introduction

Depuis une vingtaine d'années le développement de voies de valorisation du végétale selon l'approche de la bioraffinerie s'est beaucoup développé. Ce développement est lié à la recherche des sources d'énergie renouvelables pour trouver une alternative aux carburants de transport dérivés du pétrole. Pour cela le bioéthanol a été reconnu comme une alternative potentielle. En effet, l'éthanol est utilisé dans les moteurs à combustion interne depuis 1897 (Rothman et al., 1983). Après son déclin dans les années 1930 en raison de son faible coût (Akpan et al., 2005), la production mondiale de bioéthanol a atteint 51,1 milliards de litres en 2006 et sa part dans la production mondiale de biocarburant s'élève actuellement à 94%. Ce bioéthanol provient essentiellement de la canne à sucre (60%) et d'autres cultures (par exemple le maïs, la betterave, le blé). La biomasse lignocellulosique, comme le bois, les cultures énergétiques (panic raide) et les résidus agricoles (gaine de maïs, épi de maïs, paille de blé, bagasse, coque de riz, coque d'arachide etc.) (Yaman, 2004), est une matière attrayant en raison de son abondance. Cependant la communauté scientifique s'est quasi-exclusivement intéressée à des biomasses produites dans des pays tempérés. En revanche très peu d'études se réfèrent à la valorisation des biomasses tropicales. Le but de ce travail est donc d'évaluer la potentialité du bois d'okoumé pour la production d'éthanol cellulosique par voie biotechnologique.

Le bois utilisé dans cette étude provient de la Société Equatoriale de Déroulage (SED). Il a été obtenu à partir d'un rondin issu de l'étape d'éboutage de la chaîne de transformation des grumes d'okoumé en placage et en contreplaqués.

Avant d'entreprendre l'étude des facteurs qui pourraient impacter l'étape de prétraitement en vue d'une meilleure hydrolyse enzymatique de la cellulose extraite puis de la fermentation, il était indispensable d'évaluer au préalable le potentiel chimique respectif de ces matières premières.

1. Composition chimique du bois d'okoumé

Les compositions de l'aubier et du cœur de déroulage d'okoumé ont été établies selon les procédures décrites au chapitre I et chapitre II, et sont données dans le **tableau 18**.

Les polysaccharides pariétaux sont caractérisés après une étape d'hydrolyse acide par quantification des monosaccharides par chromatographie ionique (Chapitre II). On constate que l'aubier et le cœur présentent des taux de glucose relativement différents avec une teneur nettement supérieure dans le cœur. L'analyse de la variance a confirmé une différence entre les écarts de teneur massique moyens à $p \leq 0,05$ (**annexe 1**) et nous permet de conclure que le cœur de déroulage est plus riche en glucose que l'aubier.

Une variation radiale similaire, bien que non significative, est observée dans l'okoumé (Minkué, 2000) et dans le *tessmania africana* (un feuillus tropical) (Mbagou, 2017). Le premier auteur trouve des teneurs en cellulose de 49,4% dans l'aubier et de 50,4% dans le cœur. Le second trouve 47,1% et 48,7% respectivement pour l'aubier et le duramen dans la partie du bois situé à 25 m du sol. Cependant, d'autres indiquent que le bois juvénile, correspondant au cœur de déroulage, contient moins de cellulose que le bois mature (aubier et duramen) (Rowell, 2012).

A notre connaissance, aucun travail n'avait été réalisé sur le cœur de déroulage de l'okoumé, la plupart des travaux traitant du duramen et de l'aubier. Les seuls travaux réalisés sur l'aubier d'okoumé ont été effectués par Minkué (2000). Ces travaux relatent un taux de cellulose de 53,4%. Cette différence peut s'expliquer par la méthode utilisée. L'auteur indique que la cellulose a été obtenue par la méthode de Kurschner et Hoffer et précise que celle-ci renferme encore une proportion de lignine. Le taux de glucose du cœur de déroulage est assez proche des taux de cellulose du duramen de l'okoumé publiés par Lal (1989) et Savard (1960), respectivement de 47,8 et de 47,9%.

Nous notons tout de même que la teneur en glucose du cœur de déroulage (45,8%) est supérieure à celle trouvée dans la plupart de feuillus des régions tropicales, notamment dans le Bilinga (42,1%), l'Izombé (35,2%) et le Limba (41,7%) (Gérard et al., 1998). Ce résultat est donc encourageant dans le cadre d'une valorisation de cette ressource en bioéthanol.

Concernant les hémicelluloses, le xylose et le mannose sont les monomères majoritaires dont les valeurs s'élèvent respectivement de 13,1% et 2,5% dans le cas de l'aubier, de 12,2% et de 3,3% pour le cœur de déroulage. Les proportions de xylose sont sensiblement identiques à celles trouvées dans la littérature. Ainsi Savard (1954), Minkué (2000), Safou (2005) trouvent des taux de pentosanes (xylose et arabinose) de 15% environ. Le taux identique en hémicelluloses, 17,1% pour le cœur et 18,2% pour l'aubier, ne correspond pas à ce que l'on trouve dans les feuillus des régions tempérées (Rowell, 2012) où le bois juvénile est plus riche en hémicelluloses que le bois adulte. Les teneurs en polysaccharides des deux coproduits sont quasiment identiques, 58,0% pour l'aubier et 62,8% pour le cœur. Mais celles-ci restent inférieures à celles publiées dans la littérature (Medzegue, 2007; Safou-Tchiama, 2005b), probablement en raison de la méthode d'extraction, comme évoqué ci-dessus.

Tableau 18: Composition chimique de l'aubier de tranchage et du cœur de déroulage d'okoumé.

	Aubier (%)	Cœur (%)
Extractibles (toluène:méthanol: acétone)	3,0±0,3	3,0±0,1
Lignine Klason	28,6±0,1	27,4±0,1
Lignine soluble	2,0±0,0	1,5±0,0
Taux de cendre (500°C)	0,4±0,1	0,9±0,1
Sucres : répartition		
Glucose	39,8±0,3	45,8±0,7
Xylose.	13,1±0,4	12,2±0,2
Mannose	2,5±0,1	3,3±0,1
galactose	0,9±0,0	0,6±0,0
Arabinose	0,7±0,0	0,1±0,0
Rhamnose	0,3±0,1	0,3±0,0
Acide galacturonique	0,6±0,0	0,5±0,0
Acide glucuronique	0,1±0,0	0,1±0,0
Polysaccharides	58,0±0,9	62,8±1,0
Bilan	92,0±1,3	95,6±1,3

Les taux de lignine de chaque coproduit sont donnés dans le **tableau 18** ; ils montrent que l'aubier et le cœur de déroulage ont des proportions en lignine similaires, de 28,6% et 27,4 respectivement. Ces valeurs sont identiques à celles rapportées par Minkué dans l'aubier (28,3%)

mais sensiblement inférieures à celles obtenues dans nos précédant travaux (Ngwa et al., 2015) où les teneurs en lignine s'élèvent respectivement à 29,4% pour l'aubier et 29,9% pour le cœur. D'autres travaux sur le duramen de l'okoumé indiquent des teneurs qui varient entre 30% et 31%, notamment ceux de Savard en 1960 (31,5%), Brunk et al en 1990 (30,0%) et Médzégué en 2007 (30,4%).

Il est important de rappeler que la teneur en lignine entre le cœur et l'aubier est identique comme rapporté dans d'autres travaux sur l'okoumé (Ngwa et al., 2015). Aussi, contrairement aux observations faites pour les feuillus des régions tempérées où le bois juvénile a plus de lignine que le bois mature (Rowell, 2012), le cœur d'okoumé est aussi riche en lignine que l'aubier.

Dans l'ensemble, l'aubier et le cœur de déroulage contiennent une même proportion en constituants chimiques, excepté le glucose dont les teneurs sont significativement plus élevées dans le cœur de déroulage (**annexe 1**). Aussi, la variabilité radiale de la composition chimique observée dans le bois des feuillus des régions tempérées ne semble pas valable chez les feuillus des régions tropicales, probablement en raison de la stabilité du climat qui y règne. Il existerait donc une homogénéité radiale dans la composition chimique de l'okoumé. Pour la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'aubier d'okoumé en raison de sa grande disponibilité, soit 62% dans la part des grumes transformées dans les unités de scierie (chapitre I).

2. Caractérisation de la lignine de bois d'okoumé

La lignine de bois broyé (ou Milled Wood Lignine, MWL) a été extraite de l'aubier d'okoumé non traité (Chapitre II, paragraphe 2.3.4). Il est connu que la MWL est moins modifiée que les lignines isolées par des méthodes physico-chimiques et peut être par conséquent considérée comme représentative de la lignine native. A cet effet, la RMN ¹³C et la RMN 2D ont été utilisées pour élucider la structure de la lignine native d'okoumé.

Le spectre de la RMN ¹³C quantitatif de la MWL est présenté à la **figure 31**. Sur la base des documents antérieurs, les principaux pics caractéristiques de la lignine de feuillus ont été rapportés et attribués dans le **tableau 19**. D'après les attributions des pics, on retrouve les mêmes groupes de signaux caractéristiques sur l'ensemble du spectre.

- OMe à 56,5 ppm
- Chaines latérales entre 60,7 et 86,5 ppm
- Aromatiques entre 102 et 152,7 ppm

Ces spectres sont donc conformes au spectre de la lignine des feuillus (Nimz et al., 1981) et en particulier à ceux des feuillus tropicaux (Safou-Tchiam, 2005d).

Cependant, on note quelques différences entre la MWL d'okoumé caractérisée dans cette étude et la MWL d'okoumé acétylée caractérisée dans la littérature (Safou-Tchiam, 2005c). En effet, le spectre de la MWL d'okoumé obtenu dans cette étude présente une bonne distribution des pics caractéristiques et une intensité forte des liaisons α -O-4 et β -O-4 (8-9). On note également moins de carbones aliphatiques et de fonctions acide carboxylique aliphatique. Ces deux observations traduisent une scission moins importante des liaisons α -O-4 et β -O-4 lors de la phase d'extraction de la lignine. Il est à noter l'absence de signaux caractéristiques des sucres (100-103 ppm).

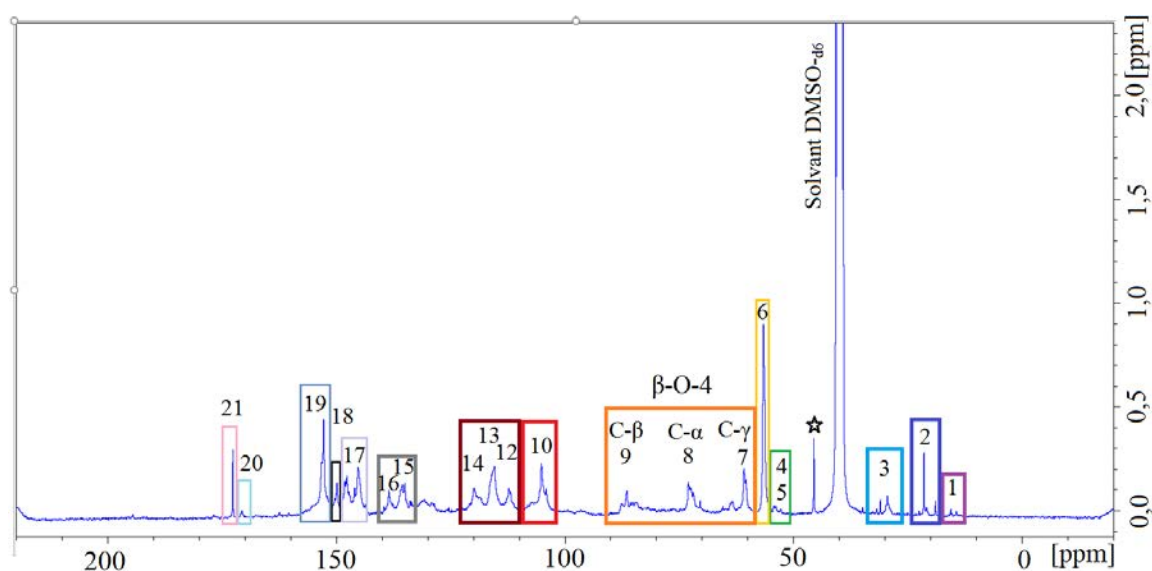


Figure 31: Spectre RMN ^{13}C quantitatif de la lignine de la MWL.

(☆) Ce signal n'a pas été identifié

Tableau 19: Attributions des bandes RMN ^{13}C des lignines non acétylés du bois d'okoumé.

Pic	Déplacements chimiques	Attributions
1	14,3	CH_3 groupes acétyles
2	20,8	COCH_3
3	29,4	Carbones aliphatiques
4	53,9	C_β des résinols
5	54,4	C_β des phénylcoumaranes
6	56,5	OCH_3
7	60,7	C_γ des unités β -O-4
8	72,7	C_α des unités β -O-4
9	86,5	C_β des unités β -O-4
10	105,0	C-2/C-6 des unités S
11	107,2	C-2/C-6 des unités S oxydé en C_α
12	112,2	C-2 des unités G
13	115,9	C-5 des unités G
14	119,7	C-6 des unités G
15	135,3	C-4 d'unités G non étherifiées
16	138,5	C-3 d'unités G non étherifiées
17	148,5	C-3/C-5 d'unité S non étherifiées
18	149,8	C-3 d'unités G étherifiées
19	152,7	C-3/C-5 d'unités S étherifiées
20	167,2	C=O des acétyles aromatique
21	170,6	COOH aliphatiques

La RMN HSQC est une technique d'analyse puissante permettant d'obtenir les caractéristiques structurales détaillées des liaisons inter-unités de la lignine. Le spectre HSQC de la MWL d'okoumé est présenté à la **figure 33**.

Sur la base des documents antérieurs (Guo et al., 2017; Wang et al., 2017), les principaux pics caractéristiques de la lignine de feuillus ont été attribués et rapportés sur le **tableau 20**. Les principaux motifs inter unités sont illustrés dans la **figure 32**. La présence d'unités syringyle et guaïacyle a été confirmée respectivement par le pic à $\delta H/\delta C$ 7,45-7,14 ppm/ 102,61-108,31 ppm et $\delta H/\delta C$ à 6,49-7,32 ppm/110,05-122,64 ppm. Les liaisons β -O-4 de S et G ont été clairement détectées à $\delta H/\delta C$ 3,97-4,32 ppm/85,6-88,41 ppm et $\delta H/\delta C$ 4,30-4,55 ppm/82,62-85,54 ppm respectivement. Les corrélations à $\delta H/\delta C$ -2,96-3,22 ppm/53,37-55,29 ppm sont attribuées aux unités résinol (B). Enfin, le phénylcoumarane a été détecté à $\delta H/\delta C$ 3,41-3,68 ppm/52,60-54,63 ppm (C).

On note un fait intéressant, dans la région aromatique en plus des signaux attribués aux unités S et G, une corrélation à $\delta H / \delta C$ 7,01-7,48 ppm/105,82-108,67 ppm a été détectée et attribuée à des unités S oxydé en C α (unité S'). Cette fonction oxydée a été confirmée par la présence d'une corrélation à $\delta H / \delta C$ 5,23-5,30 ppm/83,58-84,54 ppm attribuée à C β dans les unités S oxydées en C α . Cette oxydation est certainement liée aux procédés de broyage et de purification de la MWL mis en œuvre

Dans la zone de la région aliphatique oxygénée, l'absence de signaux correspondant aux polysaccharides ($\delta C/\delta H$ 63-65ppm /3,2-3,8ppm) confirme une très faible concentration de sucres résiduels.

Tableau 20 : Attributions des signaux croisés dans les spectres RMN HSQC de la MWL du bois d'Okoumé

Déplacements δ_C/δ_H (ppm)	Attributions
54,3/3,1	C_β/H_β dans une sous-structure resinol (B)
53,8/3,5	C_β/H_β dans une sous-structure phenyl coumarane (C)
56,4/3,8	CH dans le groupe méthoxyle (OMe)
60,4/3,6	C_γ/H_γ dans la liaison β -O-4 (A)
63,5/3,8	C_γ/H_γ dans une sous-structure phenyl coumarane (C)
63,6/4,3	Acetyl γ dans la liaison β -O-4
67,7-77,7/3,0-3,62	Carbohydrates
68,9-72,7/3,7-4,3	C_γ/H_γ dans une sous-structure resinol (B)
72,7/4,9	C_α/H_α dans la liaison β -O-4 (A)
84,1/4,4	C_β/H_β dans la liaison β -O-4 des unités guaiacyles (A)
86,5/4,2	C_β/H_β dans la liaison β -O-4 des unités syringyles (A)
85,7/4,7	C_α/H_α dans une sous-structure resinol (B)
84,2/5,3	$A^{\alpha\beta}$
87,7/5,5	C_α/H_α dans une sous-structure phenyl coumarane (C)
104,9/6,8	$C_{2,6}/H_{2,6}$ dans les unités syringyles (S)
107,6/6,5	$C_{2,6}/H_{2,6}$ condensées des unités syringyles (S)
106,0-108,5/7,0-7,5	$C_{2,6}/H_{2,6}$ oxydisées des unités syringyles (S')
111,6/7,0	C_2/H_2 dans les unités guaiacyles (G)
112,9/6,8	C_2/H_2 condensées des unités guaiacyles
112,6/7,6	C_2/H_2 oxydisées des unités guaiacyles (G')
115,8/6,9	C_5/H_5 dans les unités guaiacyles (G)
119,5/6,8	C_6/H_6 dans les unités guaiacyles (G)
113,5/7,3	C_2/H_2 dans le Ferulate (FA)
119,3/7,3	C_6/H_6 dans le ferulate (FA)
115,2/6,5	C_β/H_β dans le ferulate (FA)
125,5-127,5/6,7-7,1	$C_{2,6}/H_{2,6}$ dans les unités p-hydroxyphenyl (H)
130,6/7,5	$C_{2,6}/H_{2,6}$ dans les unités p-hydroxybenzoate (p-CA _{2,6})

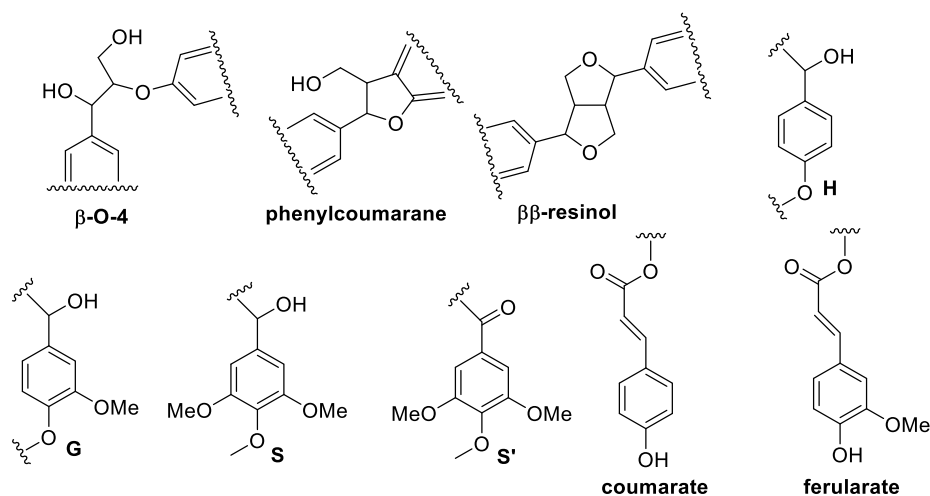


Figure 32: Structure des unités de lignine identifiées.

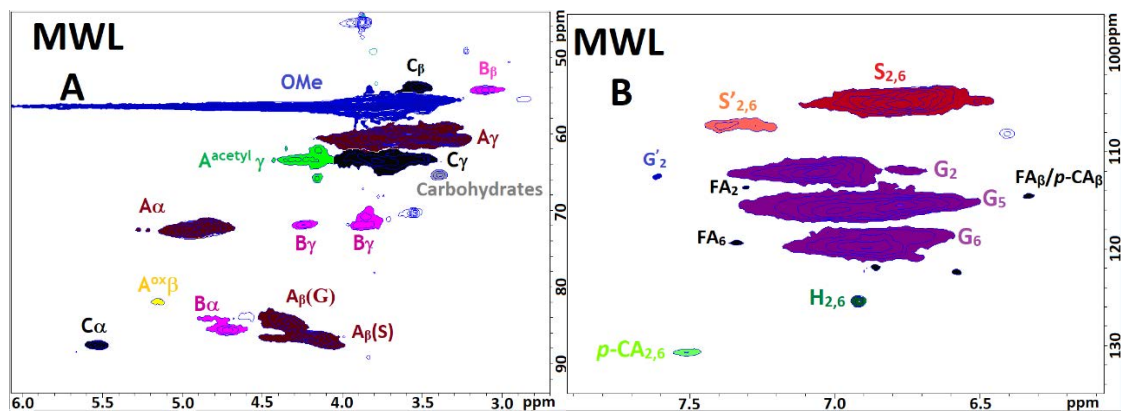


Figure 33: Spectre 2D RMN HSQC de principales sous-structures de la MWL A: chaînes latérales, B: noyaux aromatiques.

Conclusion

La caractérisation du cœur et de l'aubier d'okoumé a été réalisée afin d'évaluer leur potentiel chimique. Il en est sorti, dans un premier temps, que le cœur et l'aubier ont des compositions chimiques voisines, par contre le cœur semble plus riche en glucose.

Ensuite, il a été montré que le xylose est le sucre majoritaire des hémicelluloses, ce qui est caractéristique des feuillus. Les teneurs en lignine sont relativement élevées et celles-ci sont riches en liaisons β -O-4.

Enfin, il a été observé que le cœur de déroulage et l'aubier de tranchage sont riches en glucose (40-45%). Les coproduits de l'okoumé présentent donc un bon potentiel pour la production de bioéthanol cellulosique.

Chapitre IV. Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur

Introduction

La valorisation de la biomasse lignocellulosique (BLC) en bioéthanol par un prétraitement suivi d'un procédé thermo-mécano-biochimique a été discutée dans le chapitre I. La mise en œuvre de divers procédés de prétraitement est aujourd'hui source de progrès scientifiques et technologiques. L'ensemble de ces prétraitements repose sur la capacité à rompre la structure de la BLC sans dégrader les sucres. Parmi ces technologies, le procédé d'explosion à la vapeur est l'une des rares disponibles au stade commercial (Grammont, 2006). Il s'agit d'un procédé respectueux de l'environnement utilisant de la vapeur d'eau, facilement industrialisable, et particulièrement efficace pour rompre la récalcitrance de la BLC (Kun Wang et al., 2009a; Kun. Wang et al., 2009b).

Le prétraitement par explosion à la vapeur (EV) en présence ou non d'acide a un fort impact sur la structure des tissus lignocellulosiques occasionnant ainsi une meilleure accessibilité de la cellulose par les enzymes. Une littérature scientifique abondante décrit l'optimisation du procédé d'explosion à la vapeur appliqué à de la biomasse agricole (Dekker et Wallis, 1983; Montane et al., 1998a), à des plantes annuelles dédiées à l'énergie (Keshwani and Cheng, 2009), à du bois de feuillu (Emmel et al., 2003; McIntosh et al., 2016b; Ramos et al., 2000b) et de résineux (Nguyen et al., 1998a, 2000; Tanahashi et al., 1983a). Avec pour objectif une valorisation de l'okoumé pour la production de bioéthanol cellulosique, les différents paramètres du prétraitement par EV nécessitent une optimisation dans le but d'une valorisation globale de la ressource. Les principaux paramètres à étudier sont ceux du procédé d'EV lui-même (température et temps de séjour), les conditions d'imprégnation acide de la biomasse avant EV et enfin la granulométrie de la biomasse.

Dans les unités de bioraffinage de seconde génération, la valorisation des sucres par des procédés d'hydrolyse, de fermentation et/ou de conversion chimique semble acquise (appelée « voie biochimique »), comme indiqué dans la partie bibliographie. La lignine quant à elle est habituellement perçue comme un coproduit et assignée à des applications à faibles valeurs ajoutées notamment comme source d'énergie. En effet, dans les filières industrielles actuelles, le procédé EV ne cible pas spécifiquement la lignine. La majeure partie de cette lignine reste dans la pâte cellulosique et est récupérée à la fin du procédé de conversion de la pâte en éthanol en tant que résidu impur qui est utilisé pour la production d'énergie (Pan et al., 2010). C'est le cas des projets Futurol et Abengoa (Wertz et Bédué, 2013). Or l'émergence des initiatives de bioraffinage de seconde génération (production d'éthanol et de pâte à papier) induit des quantités de plus en plus importantes de lignine. En effet, des travaux indiquent que chaque litre d'éthanol produit co-génère un demi-kilo de lignine (Sannigrahi et al., 2010). La production d'éthanol cellulosique, dans le cas des Etats-Unis, devraient atteindre 240 milliards de litres par an après 2022 et l'industrie papetière produit à elle seule 50 millions de tonnes de lignine technique par an (Richel, 2012).

Cependant, peu de pistes de valorisation industrielle à haute valeur ajoutée sont proposées pour ces lignines issues de la bioraffinerie lignocellulosique en raison notamment de leurs structures chimiques fortement recondensées et de contaminations importantes en sels minéraux et organiques, sucres et composés volatils. De ce fait, la valorisation de la lignine nécessite une bonne compréhension et une maîtrise de l'impact des procédés d'extraction/fractionnement sur les propriétés et la structure de ces lignines techniques.

Il a été rapporté que le procédé d'EV entraîne une migration de la lignine hors de la cellule et une redéposition à la surface de la fibre. Des gouttelettes de lignine ont pu ainsi être observées par microscopie électronique à la surface de fibres (Kallavus et Gravitis, 1995). Dans l'optique d'une

production de bioéthanol de seconde génération, ce dépôt de lignine peut avoir un impact négatif sur le procédé en inhibant l'étape d'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Li et al., 2014), la lignine pouvant former un complexe stable avec les cellulases. Dans la littérature il a été montré qu'une étape de lavage du bois explosé par un solvant organique (Chen et Lui, 2007) ou une solution alcaline (Li et al., 2009, Sun et al., 2014) permettait de dissoudre et de récupérer une partie de cette lignine de surface. Cette approche qui n'a été envisagée qu'au stade laboratoire peut paraître pertinente dans le contexte de la bioraffinerie non seulement en stimulant le développement de nouvelles utilisations de la lignine mais également en produisant une pâte cellulosique pauvre en lignine, potentiellement plus réactive vis-à-vis des biocatalyseurs.

Les possibilités de valorisation globale des coproduits de l'industrie de l'okoumé au Gabon dépendent donc de l'accessibilité de la cellulose aux enzymes hydrolytiques mais également de la récupération d'une lignine valorisable pour des applications de haute valeur ajoutée. L'approche que nous proposons dans cette étude consiste en :

- Un prétraitement par explosion à la vapeur dans différentes conditions de sévérité.
- Une extraction de la pâte cellulosique obtenue permettant d'isoler une partie de la lignine de bois explosé ;
- Une hydrolyse suivie d'une fermentation du résidu cellulosique pour la production de bioéthanol.

Ces étapes seront décrites dans le chapitre suivant.

Dans ce chapitre, nous envisageons d'optimiser le prétraitement par explosion à la vapeur pour une récupération efficace des polysaccharides et de la lignine. Il s'agira plus précisément d'évaluer l'effet de la granulométrie de la biomasse, de la concentration en acide sulfurique et des paramètres de l'EV (Température et temps de séjour). Une optimisation des paramètres est en effet nécessaire pour déterminer les conditions optimales permettant d'augmenter l'accessibilité des polysaccharides tout en limitant leur dégradation. Cette étape sera précédée du choix du solvant d'extraction de la lignine de bois explosé.

1. Choix du solvant pour l'extraction de la lignine de bois explosé

Comme exposé précédemment, le procédé d'explosion à la vapeur déstructure la lignine et augmente son extractabilité. Différentes conditions pour extraire la lignine de bois explosé à la vapeur ont été préalablement décrites : des solvants aqueux alcalins tel que le NaOH (Li et al., 2009b), des solvants organiques comme l'éthanol (Hongzhang and Liying, 2007a) ou une combinaison éthanol et soude (Kun. Wang et al., 2009b). Dans cette partie nous nous sommes intéressés à développer un procédé simple, facile à développer à grande échelle et à pression atmosphérique, pour l'extraction de la lignine de bois d'okoumé explosé.

Ainsi avant de procéder à l'étude de l'impact des paramètres du prétraitement proprement dit, il a fallu choisir au préalable un solvant d'extraction afin de récupérer, le maximum de lignine extraite lors du prétraitement EV. Dans notre étude, trois solvants d'extraction ont été utilisés, à savoir une solution aqueuse de soude, d'éthanol et de dioxane. Après traitement, la matière explosée est traitée comme décrit dans le chapitre II.

Les teneurs en lignine obtenues sont consignées dans le **tableau 21**, il nous donne le taux de lignine extraite en fonction des trois solvants utilisés. Il ressort que les extractions à l'éthanol et en

milieu alcalin conduisent à des taux d'extraction en lignine supérieurs. Le choix pour la suite de l'étude s'est porté sur l'éthanol, ce solvant étant peu onéreux et facilement disponible et recyclable. Par ailleurs, l'hydroxyde de sodium utilisé lors de l'extraction de la lignine du bois explosé entraîne la formation de sels et de fait, produit une lignine impure (Li et al., 2009b). La valorisation d'une telle lignine nécessite une élimination des sels donc des coûts supplémentaires.

Tableau 21: Teneur en lignine extraite en fonction du solvant d'extraction.

conditions	Dioxane-eau ^a (%)	Ethanol ^a (%)	NaOH ^a (%)
210°,10min	2,99±0,21	3,8±0,006	3,6±0,034

^a Teneur calculée sur 100 g de matière traitée sèche

2. Optimisation du prétraitement

Le prétraitement par explosion à la vapeur a été appliqué sur de la sciure d'okoumé de différentes granulométries. Le résidu solide ainsi que les effluents liquides issus du prétraitement ont été analysés. Les paramètres du traitement ($170^{\circ}\text{C} < T < 210^{\circ}\text{C}$ et $2,5 \text{ min} < t_s < 7,5 \text{ min}$, (**tableau 15**) ont été sélectionnés en se référant à des travaux de la littérature réalisés sur du bois de feuillu (Emmel et al., 2003; McIntosh et al., 2016a; Ramos et al., 2000a).

2.1. Influence de la granulométrie

Au cours de cette phase de l'étude, nous avons étudié l'influence de la granulométrie sur l'efficacité du prétraitement dans l'extraction des polysaccharides et de la lignine. Pour cela, de la biomasse broyée a été traitée par EV après avoir été imprégnée à l'eau (**figure 28**). Trois granulométries ont été retenues : 2 mm, 1 mm et 0,16 mm. En effet celles-ci, bien que ne correspondant pas à la taille de coproduits qui font l'objet de notre étude (5 à 3 m de long), ont des tailles très proches des sciures issues de l'écorçage (~2 mm) et du sciage (~1 mm et 0,16 mm). A l'issue du traitement, la phase liquide et le résidu solide récupéré ont été caractérisés, de même que la lignine qui a pu être isolée ensuite du résidu solide (voir chapitre II). Pour comparer différentes conditions d'explosion à la vapeur, le facteur de sévérité (S_0) de chaque essai est calculé tel que suggéré dans la littérature (R. P. Overend and Chornet, 1987). Dans cette étude préliminaire, nous sommes particulièrement focalisés sur le résidu solide issu du prétraitement. Les résultats sont résumés dans le **tableau 22**. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de masse sèche de matière traitée.

Tableau 22: Teneur en lignine extraite et composition chimique du bois explosé.

Conditions					Phase solide				Phase liquide
Essais	T (°C)	T (min.)	Taille (mm)	*S ₀	LEV (%)	LK (%)	Glc. (%)	Xyl. (%)	LS (%)
E5	170	2,5	2	2,5	1,1	27,6	37,0	6,9	0,0
E4	170	7,5	2	2,9	1,4	27,5	45,7	8,6	0,1
E7	190	5	2	3,4	1,7	28,0	32,8	5,2	0,1
E12	210	2,5	2	3,6	2,6	27,8	45,5	4,4	0,1
E10	210	7,5	2	4,1	4,3	27,8	46,2	3,5	0,1
E1	170	5	1	2,8	1,5	26,6	30,3	5,5	0,1
E14	190	2,5	1	3,0	1,3	27,5	29,5	4,8	0,1
E3	190	5	1	3,4	1,9	27,5	30,7	4,2	0,1
E8	190	5	1	3,4	2,0	26,3			0,1
E13	190	5	1	3,4	2,2	27,0	29,1	4,0	0,1
E17	190	7,5	1	3,5	2,3	28,5	29,3	3,5	0,1
E16	210	5	1	3,9	4,5	26,7	32,3	3,1	0,1
E2	170	2,5	0,16	2,5	1,5	28,2	26,4	5,5	0,0
E6	170	7,5	0,16	2,9	1,3	27,8	22,8	4,3	0,0
E11	190	5	0,16	3,4	1,5	27,7	21,7	3,9	0,1
E15	210	2,5	0,16	3,6	2,3	27,9	19,9	3,2	0,1
E9	210	7,5	0,16	4,1	2,9	26,5	23,0	3,4	0,1

S₀ : Facteur de sévérité, LEV : Lignine extraite par Explosion à la Vapeur, LK : Lignine Klason, Glc : Glucose, Xyl : Xylose, LS Lignine soluble

Les teneurs de la phase solide sont calculés en pourcentage de matière traitée sèche.et la teneur en lignine soluble est calculé en pourcentage de matière sèche initiale.

2.1.1. Teneur en cellulose résiduelle

Afin d'étudier l'influence de la taille des particules de bois sur la proportion en cellulose contenue dans la biomasse traitée, le glucose, considéré comme un marqueur de la cellulose, a été quantifié après hydrolyse acide et analyse par chromatographie ionique (voir paragraphe 2.1.3.3). Les résultats de l'effet du traitement EV et de la granulométrie de la biomasse sur la teneur en glucose résiduel sont représentés sur la figure ci-dessous (**figure 34**). La teneur est calculée sur 100g de matière traitée sèche lavée à l'éthanol.

On constate que la teneur en glucose reste globalement constante malgré l'augmentation du facteur de sévérité. Cependant, cette teneur diminue avec la granulométrie, elle oscille globalement autour de 45%, 30% et 20% pour les granulométries de 2 mm, 1 mm et 0,16 mm respectivement. Cette tendance peut être expliquée par une dégradation marquée de la cellulose pour les particules les plus fines.

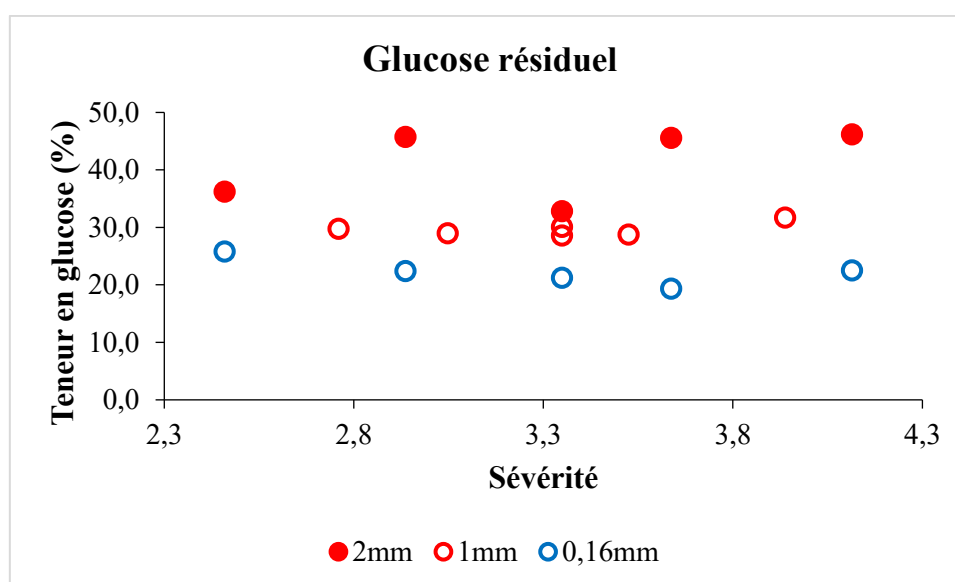


Figure 34: Influence de la taille des particules et de la sévérité du traitement EV sur la teneur en glucose de la biomasse traitée.

L'étude de l'effet des facteurs (**annexe 1**) lors du traitement EV par autohydrolyse montre que parmi les trois facteurs étudiés (**tableau 22**), la taille des particules est le facteur qui impacte le plus sur le contenu en cellulose. La surface de réponse de la **figure 35** nous permet d'observer l'influence de la granulométrie sur le contenu en cellulose du résidu solide récupéré. Cette figure montre l'effet de la granulométrie sur la teneur de cellulose dans la biomasse traitée et indique que, pour le domaine de sévérité étudié, la granulométrie de taille maximale (soit 2 mm dans la gamme étudiée) est favorable pour une récupération optimale de la cellulose. Les particules plus fines donnent des teneurs plus faibles en raison des pertes liées probablement au phénomène de dégradation de la cellulose. Ces observations sont en accord avec des travaux antérieurs menés au laboratoire qui ont montré que dans le cas d'un traitement organosolv, la réduction de la taille de la paille de miscanthus semblait accentuer la dégradation de la cellulose (El Hage 2010). Selon

Brownell et al., 1986, le transfert de chaleur à l'intérieur des fibres humides dépend de leurs tailles. La sévérité du traitement a donc un effet plus prononcé sur les particules plus fines et occasionne en occurrence une plus forte dégradation par des phénomènes bien connus d'autohydrolyse (Overend and Chornet, 1987; Schultz et al., 1983).

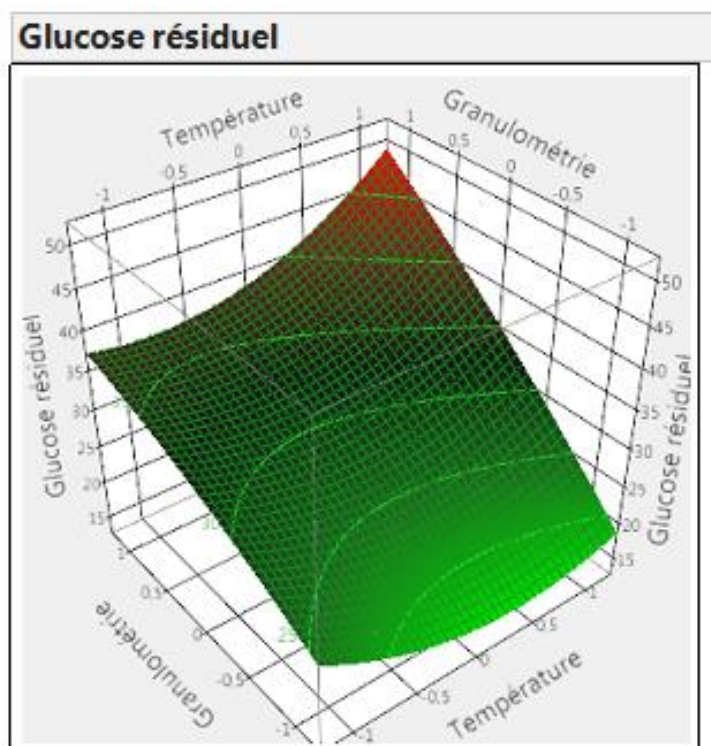


Figure 35: Surface de réponse présentant l'influence de la granulométrie et de la température sur la production de la cellulose EV.

2.1.2. Teneur en xylose résiduel

Le xylose résiduel, marqueur des hémicelluloses, est obtenu, comme dans le cas du glucose, après hydrolyse acide de la biomasse traitée par EV et quantifié après par chromatographie ionique (voir chapitre II). Les proportions en xylose résiduel des trois classes de granulométrie sont représentées dans la **figure 36**. La teneur est calculée sur 100g de matière traitée sèche lavée à l'éthanol. On remarque que la teneur en xylose diminue fortement avec la sévérité. Cette diminution est imputable à l'hydrolyse des hémicelluloses lors du prétraitement EV. (Focher et al., 1991; Hongzhang and Liying, 2007b; Lora and Wayman, 1978; Montane et al., 1998b).

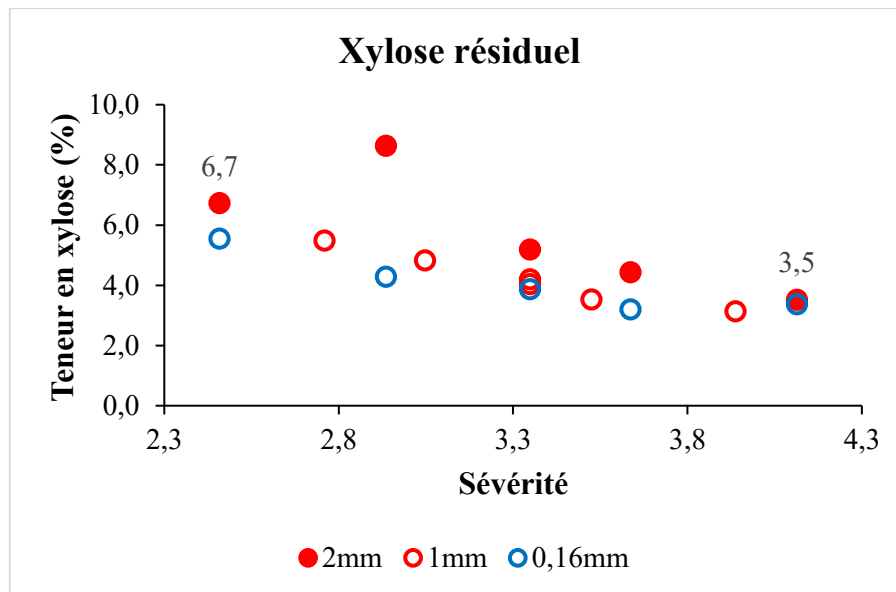


Figure 36: Influence de la granulométrie et de la sévérité du traitement EV sur la teneur en xylose de la biomasse traitée.

Pour la classe de granulométrie 2 mm, la quantité de xylose passe de 6,7 à 3,5 pour une sévérité variant entre 2,4 et 4,1. Pour la sévérité la plus élevée (4,1), le taux d'hydrolyse du xylose est de 73,3% par rapport à la teneur de départ (voir **équation 21**).

$$\%Hydrolyse = \frac{Mi(xylose) - Mf(xylose)}{Mi(xylose)} \times \quad \text{Equation 21}$$

Où Mi est la masse de xylose dans la biomasse de départ

Mf : la masse de xylose dans la biomasse traitée

Toutefois, d'après la **figure 36**, on ne note pas de différence très importante entre les trois granulométries concernant l'hydrolyse des hémicelluloses. Des études menées dans des conditions similaires (avec les mêmes granulométries) ont montré que la granulométrie de 1 mm semblait optimale pour la récupération des xylanes en phase aqueuse (Simangunsong et al., 2020).

Concernant l'effet de l'ensemble des paramètres incluant la granulométrie, l'analyse statistique des résultats (voir **annexe 1**) montre que deux paramètres apparaissent comme prépondérants : la température et dans une moindre mesure la granulométrie (voir **figure 37**).

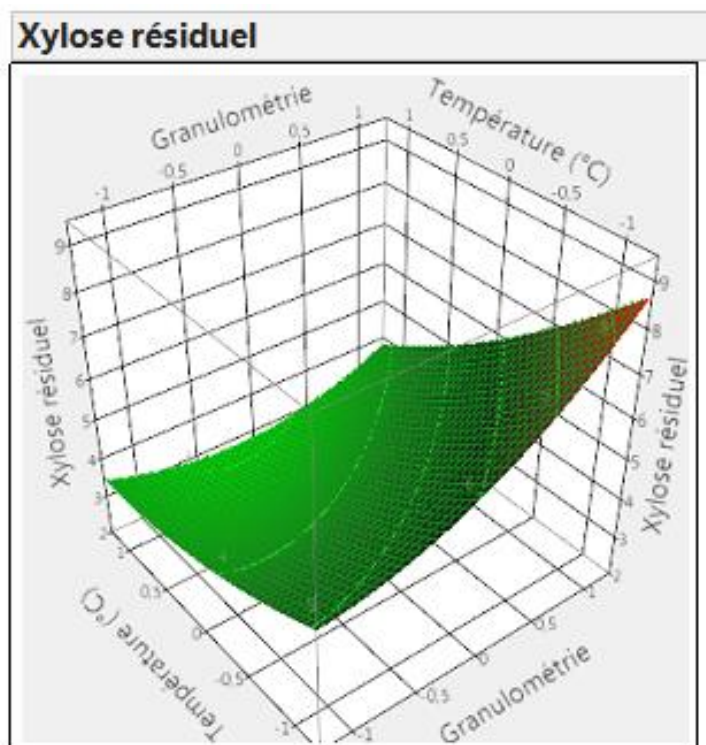


Figure 37: Surface de réponse présentant l'influence de la granulométrie et de la température sur la teneur en xylose résiduel après EV.

2.1.3. Taux de lignine extraite à l'éthanol après traitement par explosion à la vapeur (LEV)

La lignine (LEV) a été extraite à partir du bois explosé par une extraction solide/liquide avec de l'éthanol selon le protocole expérimental décrit dans le chapitre II (**figure 28**). La lignine a été quantifiée par peser. Le taux de lignine extraite est calculé sur 100 g de matière traitée sèche. Nous observons, d'après le **tableau 22** et la **figure 38**, que la teneur en lignine isolée augmente avec la sévérité des conditions. Ce résultat est en accord avec des études qui ont montré que la déstructuration par autohydrolyse de la lignine était liée à la sévérité du traitement (Hongzhang and Liying, 2007b). Une tendance similaire a également été décrite lors de la délignification du bois de tremble avec le prétraitement par explosion à la vapeur (Li et al., 2007a). Il est à noter que les taux de lignine extraite sont proches pour les trois granulométries avec des courbes qui se superposent pour des sévérités inférieures à 3,8. Afin d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats, une analyse statistique donnée dans l'**annexe 1** a été menée. Cette analyse confirme que la granulométrie n'est pas un paramètre significatif concernant l'extractibilité de la lignine contrairement à la température et au temps de séjours du prétraitement d'EV.

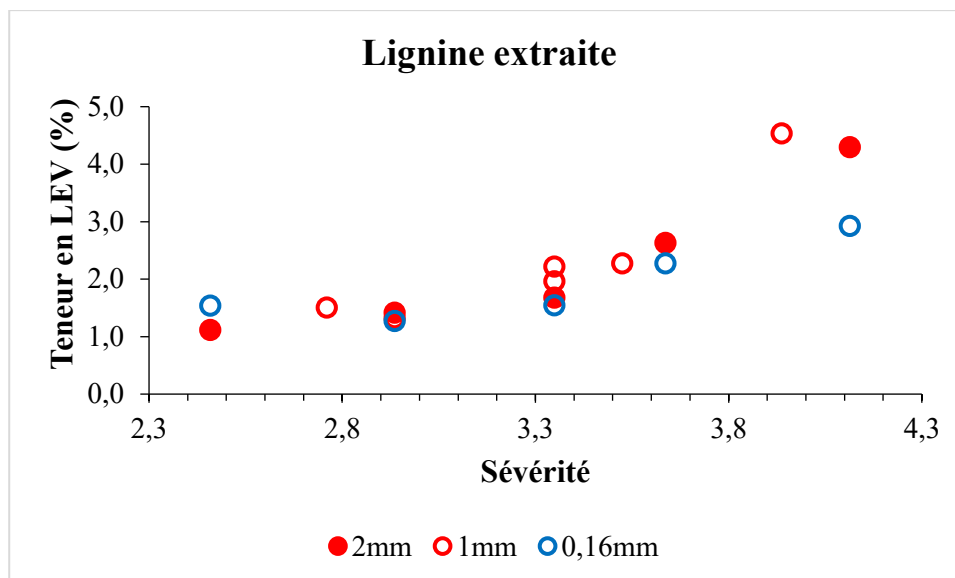


Figure 38: Influence de la taille des particules sur le taux d'extraction de la lignine par le traitement EV avec imprégnation à l'eau.

La **figure 39** met en évidence l'effet des deux facteurs prépondérants (température, temps de séjour) sur le taux d'extraction de la LEV. Nous pouvons clairement constater qu'une augmentation de la température accroît considérablement le taux d'extraction de la lignine (on passe de 1,5% à 4%) et que des temps de séjour supérieur à 6 min ne favorisent plus l'extraction de la lignine. Ce qui suppose que, pour les trois classes de granulométrie, un temps de séjour de 6 min et des températures supérieures à 210°C sont nécessaires pour augmenter le taux d'extraction de la LEV du bois d'okoumé. L'optimisation des conditions d'étude montre qu'un taux théorique de 5,6% est atteint dans les conditions suivantes : 215°C, 8,12 min et 1,7 mm (**annexe1**).

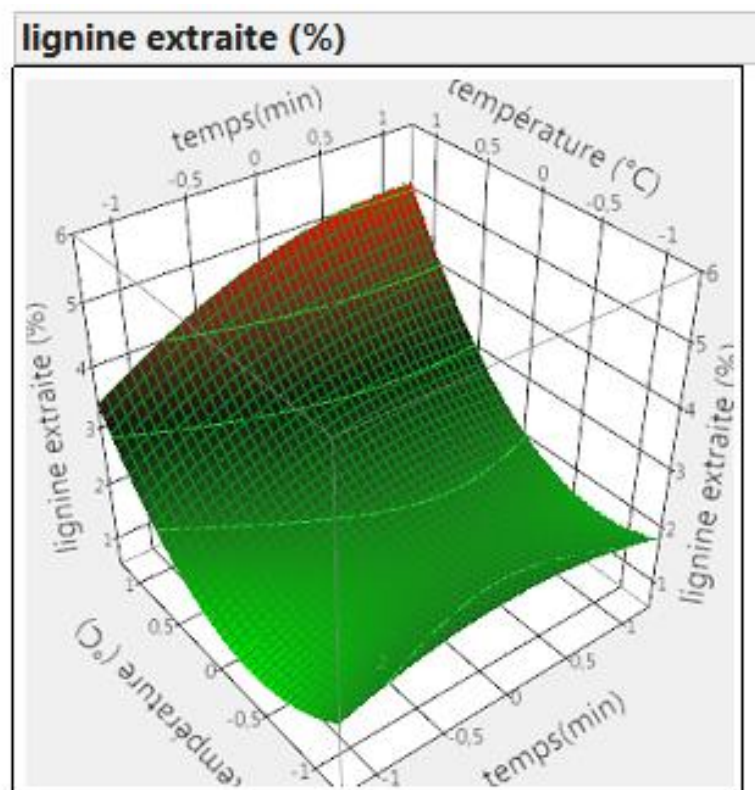


Figure 39: Surfaces de réponse présentant l'influence de la granulométrie et la température sur la production de la lignine EV

2.1.4. Lignine résiduelle

Les résultats obtenus à la suite de la caractérisation de la lignine contenue dans la biomasse traitée sont représentés dans la **figure 40**. Cette lignine résiduelle est obtenue après hydrolyse des polysaccharides avec de l'acide sulfurique à 72% selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (lignine Klason). Les teneurs sont exprimées en pourcentage de masse de la matière sèche traitée. Ces résultats montrent que quelle que soit la classe de granulométrie, la teneur en lignine résiduelle ne varie que très peu avec l'augmentation de la sévérité du traitement. Le test des effets des facteurs (**annexe 1**) confirme qu'aucun des facteurs étudiés n'a un effet significatif sur la teneur en lignine résiduelle. Les quantités de lignine soluble, récupérée dans les phases aqueuses sont également très faibles (Tableau 19). Ceci laisse à penser que la lignine n'est que relativement peu affectée au cours du traitement EV dans les conditions de l'étude. Cette observation peut s'expliquer par l'absence de catalyse acide comme nous le verrons plus loin. Cette observation a également été effectuée lors de l'explosion de certaines biomasses par autohydrolyse (sans catalyse). Comme par exemple le bois dur (Schultz et al., 1983), la paille de blé (Montane et al., 1998b), la bagasse de canne à sucre (R. F. H. Dekker and Wallis, 1983).

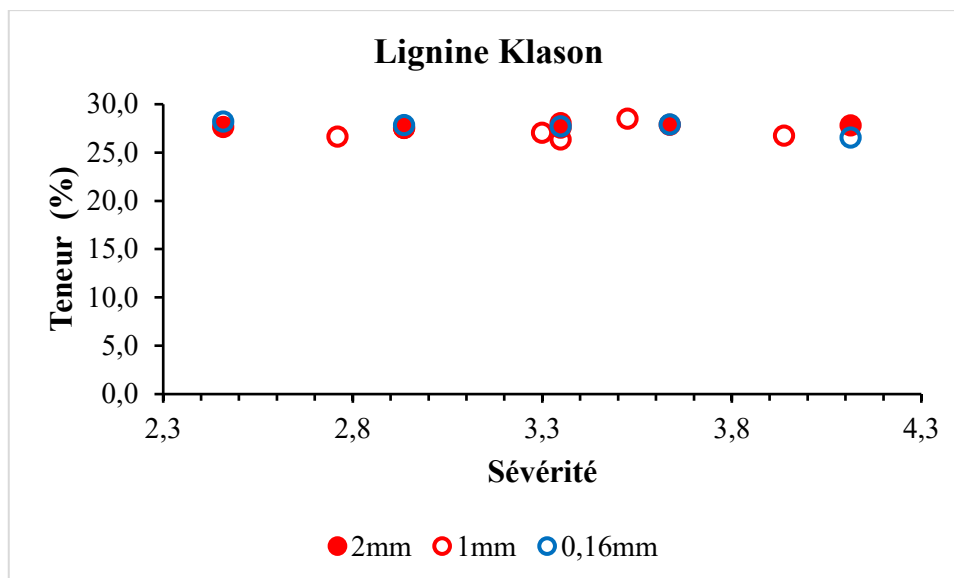


Figure 40: Influence de la granulométrie et de la sévérité du traitement sur la teneur en lignine résiduelle de la biomasse traitée.

On constate donc d'après la **figure. 40** que quelle que soit la granulométrie et les conditions utilisées, les teneurs en lignine résiduelle dans les pâtes lignocellulosiques sont comprises entre 26 % et 28 % et sont proches de celle de la biomasse de départ (27,4 %) malgré la solubilisation d'une partie de la lignine (**figure. 38**). Cette augmentation apparente de la teneur en lignine peut s'expliquer par la diminution de la concentration en hémicelluloses dans les pâtes exposées observée précédemment (Schultz et al., 1983). Des auteurs rapportent également la formation de pseudolignines issus des réactions de recondensation notamment entre la lignine et les produits de dégradation des polysaccharide (Jakobsons et al., 1995; Li et al., 2007a).

Conclusion

La granulométrie impacte peu ou de façon non significative l'extraction de la lignine et des hémicelluloses par contre le prétraitement par EV de particules d'okoumé de taille inférieure à 2mm conduit à une dégradation importante de la fraction cellulose.

Il apparait à la lumière de ces travaux que le prétraitement de l'aubier d'okoumé est optimal pour la classe de granulométrie 2 mm, taille retenue pour la suite de l'étude. Ces observations sont en accord avec des travaux antérieurs menés au laboratoire qui ont montré que dans le cas d'un traitement organosolv, la réduction de la taille de la paille de miscanthus semblait accentuer la dégradation de la cellulose (El Hage 2010).

2.2. Influence de la catalyse acide

Une imprégnation acide avant le traitement par explosion à la vapeur est généralement préconisée dans le processus de conversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol (Eklund et al., 1995; McIntosh et al., 2016b; Nguyen et al., 1998a, 2000; Ramos et al., 2000a). L'objectif de cette partie est d'étudier l'influence de la concentration en acide sulfurique lors de l'étape d'imprégnation et celle des paramètres du prétraitement EV (température, temps de séjour) sur la composition chimique du bois. De fait, les échantillons d'okoumé broyé (2 mm) ont d'abord été imprégnés à différentes concentrations comme décrit dans la partie expérimentale.

Les fractions solide et liquide récupérées après traitement par explosion à la vapeur ont été analysées (voir partie Matériels et Méthodes, paragraphes 2.5 et 2.6). Les données des compositions chimiques après hydrolyse acide des deux fractions solide et liquide en termes de monosaccharides, de lignine et de composés furaniques sont résumées dans les deux tableaux ci-dessous. Les résultats sont exprimés par rapport à la biomasse traitée (**tableau 23**). Les teneurs de la fraction solide sont données en pourcentage de masse de matière sèche traitée et ceux de la fraction liquide sont donnés en pourcentage de matière sèche initiale. Le rendement des composés chimiques est calculé en pourcentage de matière sèche initiale.

Tableau 23: Teneur en lignine isolée par le traitement EV et composition chimique de la fraction solide et liquide après prétraitement EV.

Essais	Conditions				Phase solide				Phase liquide							
	T (°C)	t (min.)	H ₂ SO ₄ (%)	S ₀	LEV	LK (%)	Glc. (%)	Xyl. (%)	Glc. (%)	Xyl. (%)	Man (%)	Galac. (%)	Fur. (%)	HMF (%)	PM (%)	Rendement (%)
E13	170	2,5	eau	2,5	1,3	27,6	37,0	6,9	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0		
E3	170	7,5	eau	2,9	1,4	27,5	45,7	8,6	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0		
E2	190	5	eau	3,4	1,7	28,0	32,8	5,2	0,1	1,4	0,3	0,0	0,0	0,0		
E11	210	2,5	eau	3,6	2,8	27,8	45,5	4,4	0,4	2,9	0,4	0,1	0,0	0,0		
E16	210	7,5	eau	4,1	4,5	27,8	46,2	3,5	0,9	4,8	0,8	0,1	0,1	0,1		
E9	170	2,5	0,5	2,5	3,2	27,1	45,9	3,1	0,1	0,8	0,2	0,1	0,0	0,0	16,2	66,0
E5	170	5	0,25	2,8	2,8	28,5	50,7	4,6	0,1	0,6	0,2	0,1	0,0	0,0	14,9	72,9
E4	170	7,5	0,5	2,9	3,5	24,5	50,2	3,1	0,2	0,9	0,2	0,1	0,1	0,0	19,2	65,6
E10	190	2,5	0,25	3,1	6,4	27,2	53	2,3	0,4	1,8	0,4	0,1	0,1	0,0	21,2	70,0
E6	190	5	0,25	3,4	6,6	27,0	50,3	2,6	0,2	0,8	0,2	0,1	0,1	0,0	22,7	66,6
E12	190	5	0,25	3,4	6,0	29,5	43,8	1,6	0,4	1,9	0,4	0,0	0,2	0,0	22,2	64,0
E1	190	5	0,5	3,4	8,2	25,6	59,2	1,1	0,3	0,6	0,2	0,0	0,2	0,1	27,1	68,2
E7	190	7,5	0,25	3,5	6,8	25,5	53,9	2,6	0,3	0,9	0,2	0,1	0,1	0,0	22,5	67,8
E8	210	2,5	0,5	3,6	14,8	21,5	53,7	1	1,2	0,5	0,2	0,1	0,5	0,3	38,2	57,3
E14	210	5	0,25	3,9	12,7	33,0	44,2	1	1,0	0,9	0,3	0,1	0,5	0,2	32,0	61,3
E15	210	7,5	0,5	4,1	14,3	32,6	44	1,4	1,7	0,8	0,2	0,1	0,9	0,5	35,6	60,7

S₀ : Facteur de sévérité, LEV : Lignine extraite par Explosion à la Vapeur, LK : Lignine Klason, Glc : Glucose, Xyl : Xylose, man : Mannose, Galac : Galactose, Fur : Furfural, HMF : Hydroxyméthylfurfural, PM : Perte de masse.

2.2.1. Perte de masse

L'évolution de la perte de masse du bois d'okoumé (voir **équation 22**) avec la sévérité du traitement d'EV en fonction des conditions d'imprégnation (0,25% et 0,5% d'acide sulfurique en masse) est donnée dans la **figure 41**. Les pertes de masse en condition d'imprégnation neutre n'ont pas été déterminées. Le taux de perte est calculé sur 100g de matière sèche initiale. Il ressort que le prétraitement extrait des constituants du bois et que cette élimination est fonction de la sévérité du traitement. Ce phénomène peut être attribué en premier lieu à l'hydrolyse et à la solubilisation des hémicelluloses comme nous le verrons plus loin. Il est décrit dans la littérature que la température, le temps de séjour et la concentration en acide impactent l'hydrolyse des hémicelluloses de façon importante (Kataria et al., 2017b). La température et la concentration en acide sont les facteurs prédominants. D'autres travaux montrent également une diminution de la masse du solide récupéré à mesure que la sévérité augmente (Eklund et al., 1995; Emmel et al., 2003; Montane et al., 1998b; Nguyen et al., 1998a; Schultz et al., 1983). Emmel et ses collaborateurs ont montré qu'entre 200°C et 210°C seuls le temps et la concentration en acide ont un effet négatif sur le taux de récupération de la fraction solide.

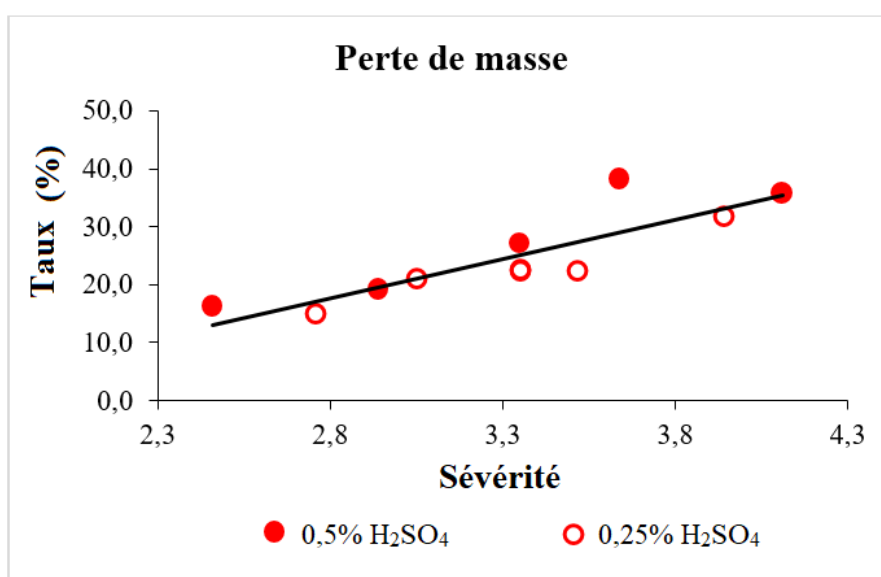


Figure 41: Influence de la sévérité et de la concentration en acide sur la perte de masse.

$$\tau_i = \frac{m_0 - m_r}{m_0} \times 100 \quad \text{Equation 22}$$

Où τ_i : la perte de masse de l'échantillon de la condition i . m_0 : la masse de matière sèche initiale. m_r : la masse de matière explosée récupérée

2.2.2. Analyse de la fraction solide

Le solide récupéré par filtration après traitement a été analysé et sa composition chimique déterminée comme décrit dans la partie matériel et méthode. Les valeurs sont exprimées par rapport à la masse sèche du solide récupéré (biomasse traitée).

2.2.2.1. Glucose résiduels

La proportion en glucose après hydrolyse totale de chaque échantillon explosé a été déterminée afin d'estimer l'efficacité du prétraitement sur la teneur en cellulose. Nous avons supposé, pour des raisons d'interprétation, que ce glucose restant, appelé glucose résiduel, provenait uniquement de la cellulose bien qu'une partie soit issue des hémicelluloses. Les résultats sont consignés dans le **tableau 20** et la **figure 42**. Les résultats obtenus précédemment après imprégnation à l'eau sont également donnés dans la **figure 42** à titre de comparaison.

Il ressort de ces analyses que la teneur en glucose résiduel maximale (59,2%) est atteinte dans les conditions suivante : **190°C, 5 min., 0,5% H₂SO₄ (S₀~3,4)**. Ces conditions sont relativement douces par rapport au domaine d'étude. En effet, on peut observer une augmentation progressive de la proportion en cellulose de 46,0% à 59,2% entre 2,5 et 3,4 de sévérité puis une diminution de celle-ci au-delà d'une sévérité de 3,4 jusqu'à 44%. Ce qui suggère que la teneur en cellulose de la biomasse traitée lors du traitement EV par catalyse acide évolue selon un modèle quadratique (second ordre). Une tendance similaire est observée par Kataria et collaborateurs (2016). Ces auteurs indiquent que les résultats seraient mieux expliqués par un modèle de 2nde ordre. Schultz et ses collaborateurs (1983), quant à eux, ont trouvé que l'analyse de la régression linéaire multiple de la teneur en cellulose en fonction du temps ne montre aucune corrélation significative.

Cependant, lors du traitement EV par imprégnation à l'eau par exemple, la teneur varie faiblement avec l'augmentation de la sévérité du traitement. Comme le montre les résultats (**tableau 23 et figure 42**), celle-ci augmente d'abord de 37,0% jusqu'à 47,5% entre 2,5 et 2,9 de sévérité, puis reste globalement constante (autour de 45,6%). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres chercheurs, où il a été montré que la teneur en cellulose lors du traitement EV par autohydrolyse varie peu avec l'augmentation de la température (Montane et al., 1998b; Schultz et al., 1983).

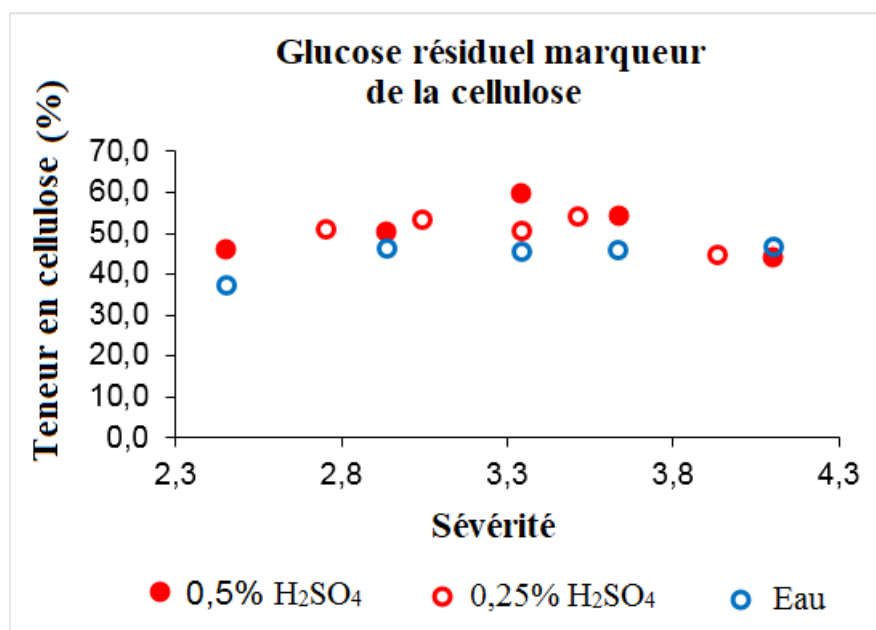


Figure 42: Teneur en glucose de la biomasse traitée en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.

Notons également que sur la base des trois conditions d'imprégnation étudiées, 0,5-0,25-0% H₂SO₄, les meilleurs taux de glucose sont observés pour les deux imprégnations acides. Dans le même intervalle de sévérité ($3,8 < S_0 < 4,1$) et à la même concentration (0,5% H₂SO₄), une diminution similaire en glucose a été observée dans d'autres travaux (de 68,2% à 63,9%) (Ramos et al., 2000a). Mais l'étude de l'influence des facteurs montre que la concentration en acide est le facteur le plus important bien que les effets des trois facteurs étudiés sur la quantité de cellulose résiduelle ne soient pas prouvés (**annexe 1**). La **figure 43** met en évidence l'effet du facteur prépondérant sur la teneur en cellulose résiduelle. Cette figure montre que la teneur en cellulose dans la biomasse traitée par EV évolue selon un modèle quadratique et cette évolution est principalement due à la concentration en acide sulfurique. Ainsi entre 0% et 0,45% H₂SO₄, la teneur en cellulose augmente fortement de 46,2 à 59,2%. Au-delà de 0,45 % H₂SO₄ (voir **annexe1**), la teneur en cellulose diminue probablement en raison de la dégradation de celle-ci. Toutefois cette diminution n'est pas significative ($p \leq 0,07$).

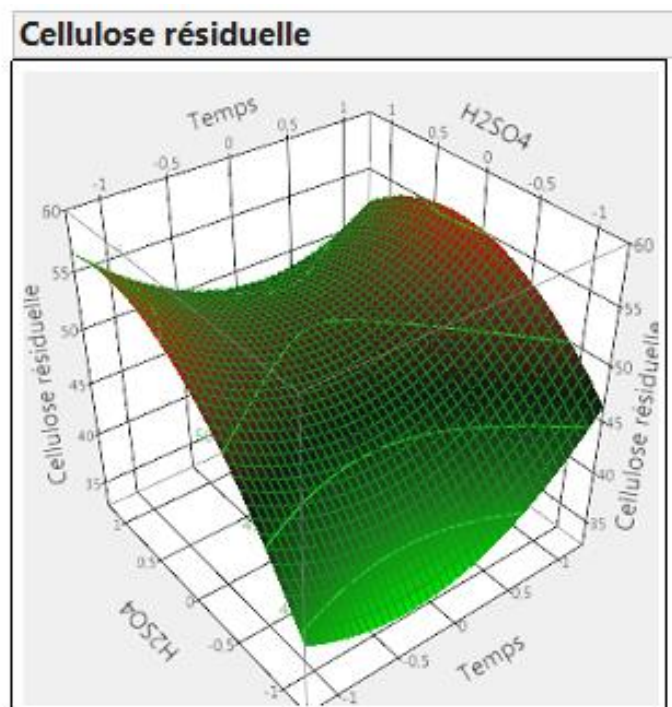


Figure 43: Surfaces de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et du temps sur la production de la cellulose EV.

2.2.2.2. Hémicelluloses résiduelles

La teneur en xylose résiduel des différents échantillons traités a été déterminé afin d'étudier l'effet du prétraitement sur la teneur en hémicelluloses résiduelles. Le xylose a donc été utilisé comme indicateur des hémicelluloses. Les résultats sont représentés sur la **figure 44**. Nous pouvons remarquer que la teneur en hémicelluloses dans la biomasse traitée diminue avec le facteur de sévérité. Ces résultats sont conformes à ceux observés dans l'étude de l'influence de la granulométrie. Comme précédemment noté, cette diminution a été attribuée à l'élimination des hémicelluloses par hydrolyse acide. En effet, il est connu que le processus EV conduit au clivage des liaisons glycosidique (Focher et al., 1991; Hongzhang and Liying, 2007a) notamment durant la phase de vapocraquage par hydrolyse ou autohydrolyse.

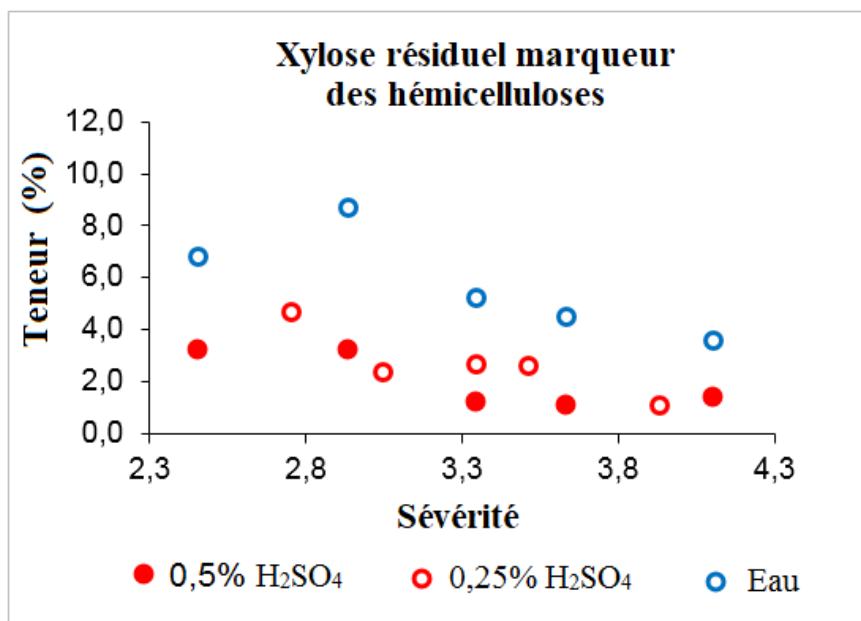


Figure 44: Teneur en xylose de la biomasse traitée en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.

On note que pour les trois conditions d'imprégnation étudiées, la quantité d'hémicelluloses restant dans l'échantillon traitée est plus faible en milieu acide. En effet, pour une même variation de sévérité (2,5 à 4,1) on passe de 6,8% à 3,6% d'hémicelluloses résiduelles dans des conditions neutres contre 3,1% à 1,4% lorsque le traitement a lieu en milieu acide. Il a été montré que les acides organiques présents dans le bois catalysent l'hydrolyse des hémicelluloses (phénomène d'autohydrolyse) et cette hydrolyse est améliorée par l'addition d'acide sulfurique pendant le prétraitement et permet d'accroître les taux d'hydrolyse et l'efficacité du procédé de l'explosion à la vapeur (Morjanoff and Gray, 1987; Schultz et al., 1983; Söderström et al., 2003). L'ajout d'un acide dans le milieu favorise donc l'hydrolyse des hémicelluloses.

Le test des effets des facteurs (**annexe 1** et la **figure 45**) montre que la concentration en acide et la température sont les deux facteurs qui ont un effet significatif sur l'hydrolyse des hémicelluloses. Ce résultat confirme l'importance de l'acide dans l'amélioration de l'hydrolyse des hémicelluloses (Li et al., 2009b; Ramos et al., 2000a) et peut expliquer les proportions plus élevées en cellulose résiduelle observée lors de la catalyse acide.

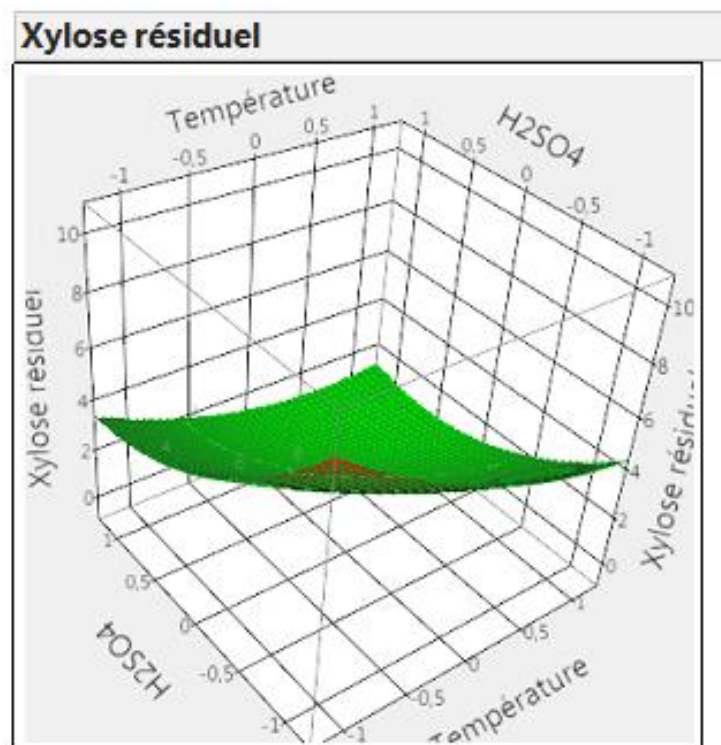


Figure 45: Surface de répondre présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur la teneur en xylose résiduel.

2.2.2.3. Lignine résiduelle

Il ressort des données du **tableau 22** que, contrairement aux résultats précédents obtenus sans catalyse acide, la teneur en lignine Klason dans la pâte cellulosique baisse avec l'augmentation de la sévérité. Ce résultat peut se justifier par une augmentation de la déstructuration de la lignine par catalyse acide et avec la sévérité du traitement conduisant à une augmentation de l'extractabilité par l'éthanol. Cette diminution est observée jusqu'à une sévérité de 3,6. A partir de 3,9, c'est-à-dire à des sévérités fortes, on observe plutôt une augmentation de celle-ci. Les mêmes tendances de délignification sont observées par Kataria et collaborateurs (2016). Ils ont en effet montré que la quantité de lignine résiduelle diminue et que la concentration en H_2SO_4 a un effet significatif sur la teneur en lignine résiduelle. L'étude de l'influence des facteurs (**annexe 1**) montre qu'aucun des trois facteurs étudiés n'a un effet significatif sur la délignification du bois d'okoumé par EV avec imprégnation acide. Des travaux sur l'*Eucalyptus viminalis* ont également montré une augmentation de la teneur en lignine Klason à des sévérités supérieures à 3,8 (Ramos et al., 2000a). Cette augmentation a été expliquée précédemment par la formation de pseudolignine.

2.2.2.4. Lignine extraite ou Lignine d'Explosion à la Vapeur (LEV).

L'effet de l'imprégnation acide sur l'efficacité du prétraitement EV sur l'extraction de la lignine a été étudié. A cet égard, la lignine extraite, appelée lignine d'explosion à la vapeur (LEV), a été

recueillie par extraction solide/liquide avec un mélange éthanol-eau et quantifiée selon le protocole expérimental décrit dans le chapitre II (**figure 28**). Les résultats sur la quantité de LEV obtenu en fonction de la concentration en acide sulfurique de la solution d'imprégnation sont consignés dans la **figure 46**. Il apparaît que la teneur en lignine extraite après EV augmente dans tous les cas avec le facteur de sévérité.

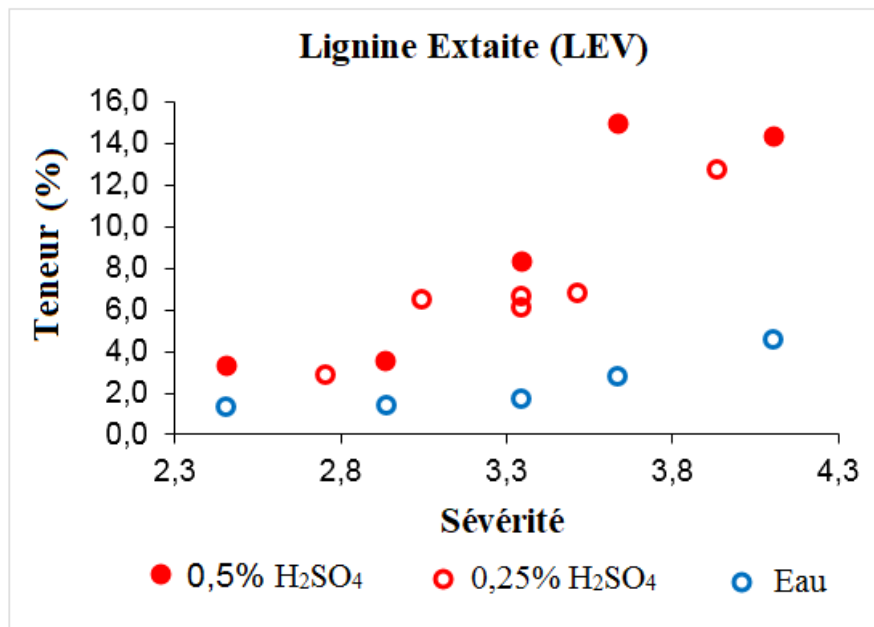


Figure 46: Influence du type d'imprégnation et de la sévérité des conditions sur la teneur en lignine extraite après traitement EV.

Il est également important de noter que la teneur en lignine est plus élevée pour le traitement EV avec imprégnation acide par rapport au traitement EV par autohydrolyse. En effet, pour une même sévérité de 4,1, les teneurs en lignine extraite pour une imprégnation à l'eau (autohydrolyse) et à 0,5% d'acide sulfurique sont respectivement de 4,5% et 14,3%. Aussi, pour une même sévérité de 3,4 par exemple, les teneurs en lignine extraite sont de 8,2%, 6,6% et 1,7% pour des imprégnations respectives à 0,5% H₂SO₄, 0,25% H₂SO₄ et à l'eau. L'ajout d'un acide favorise donc l'extraction de la LEV. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents concernant les teneurs en lignine résiduelle dans les pâtes exposées.

Le test des effets (**annexe 1**) montre que parmi les trois facteurs étudiés, la température et la concentration en acide sont les deux paramètres qui impactent significativement la quantité de lignine extraite, l'action de l'acide dans l'amélioration de l'extraction de la LEV est significative. D'après la **figure 47**, nous pouvons optimiser l'extraction jusqu'à 17% environ en augmentant surtout la température et allant légèrement au dessus de 0,5% avec un temps maintenu à 6 min.

D'après les données de la littérature, l'augmentation de l'extractabilité de la lignine avec la sévérité et la catalyse acide est due à la dépolymérisation par le clivage des liaisons aryl-éther de la lignine et des liaisons du complexe lignine-glucide catalysé par un acide (Focher et al., 1991) produisant de petits fragments de lignine avec une solubilité accrue dans l'éthanol (El Hage et al., 2010b; Heikkinen et al., 2014b).

Cependant il a été également montré qu'à forte sévérité, le phénomène inverse pouvait être observé. Ainsi Kataria et al., 2017 ont montré une augmentation des quantités de lignine extraite jusqu'à un optimum (180°C, 2,5% H₂SO₄) puis une baisse qui peut être expliquée par des phénomènes de recondensation de la lignine dans les conditions les plus sévères. Cette hypothèse est confortée par les proportions en lignine résiduelle qui demeurent aussi élevées (en condition sévère) que la teneur de départ (**tableau 23**). Contrairement au prétraitement EV avec imprégnation à l'eau, les facteurs étudiés ont eu une influence sur le contenu en lignine de la biomasse traitée mais celle-ci reste non significative (**annexe 1**). Ce phénomène a été attribué à la formation de composés ligniques ("pseudolignine") (Sannigrahi et al., 2011).

La comparaison des coefficients de corrélation linéaire du modèle de 1^{er} et de 2nd ordre le taux de récupération de la lignine en milieu acide montre que le modèle de 1^{er} ordre est adapté pour décrire le phénomène de délignification de la biomasse.

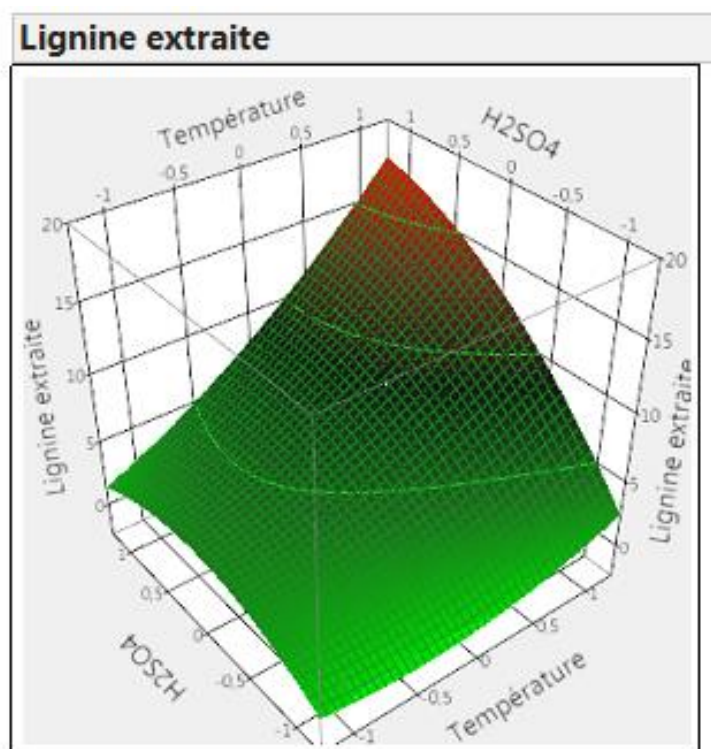


Figure 47: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration acide sulfurique et de la température sur la production de la LEV.

2.3. Analyse de la phase liquide

2.3.1. Hémicelluloses solubilisés

La phase liquide récupérée après traitement EV a été analysée en terme de sucres simples et notamment en xylose, le monosaccharide majoritaire.

Les résultats sont consignés dans la **figure 48**. Pour une imprégnation à l'eau on observe une augmentation importante en xylose solubilisé avec la sévérité, notamment pour une sévérité supérieure à 3,3. Ainsi pour la sévérité maximale de 4,1, il est possible d'isoler en phase aqueuse 4,8% de la biomasse initiale sous forme de xylose, ce qui représente 36,6% des xylanes du bois. Par contre pour les imprégnations acide (0,25% et 0,5%), des teneurs faibles sont observés, ils oscillent globalement autour de valeurs inférieures à 1%. Ces faibles taux de récupération des hémicelluloses hydrolysées sont probablement dus à des phénomènes de dégradation des hémicelluloses liés aux conditions réactionnelles utilisées, les hautes températures et le milieu acide favorisant les réactions de déshydratation des fonctions alcool des sucres. Dans des conditions comparables, à partir de bois de saule, Eklund et ses collaborateurs (1995) ont observé une production croissante de xylose jusqu'à des températures voisines de 200°C. Au delà, la teneur en xylose diminue suite à des phénomènes de dégradation des hémicelluloses. Il apparait donc que les hémicelluloses de l'okoumé sont beaucoup sensibles à l'action de l'acide et de la température (**annexe 1**). Contrairement à la lignine où ces deux facteurs sont également les plus importants, des conditions neutres (imprégnation à l'eau) et de températures élevées sont appropriées pour améliorer le taux de récupération des hémicelluloses hydrolysées pendant le prétraitement EV (**figure 49**).

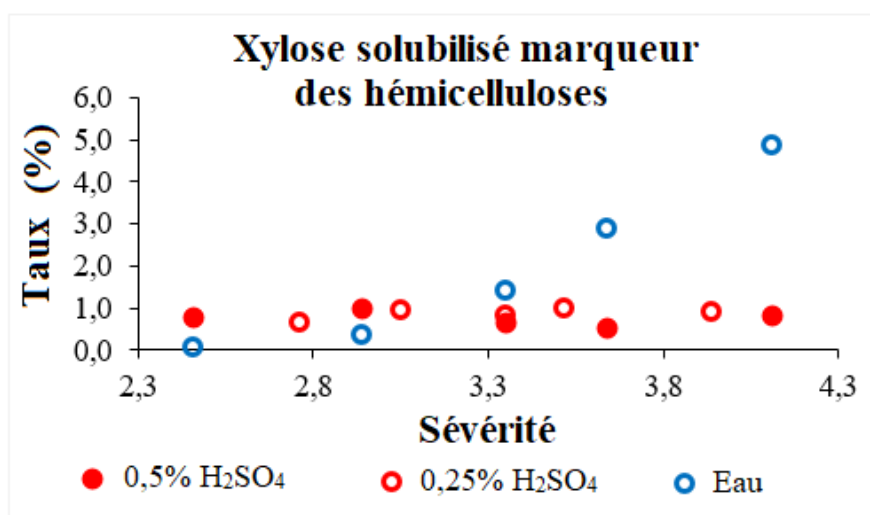


Figure 48: Taux d'hémicelluloses hydrolysées récupérées dans le liquide issu du traitement EV en fonction de la sévérité et du type d'imprégnation.

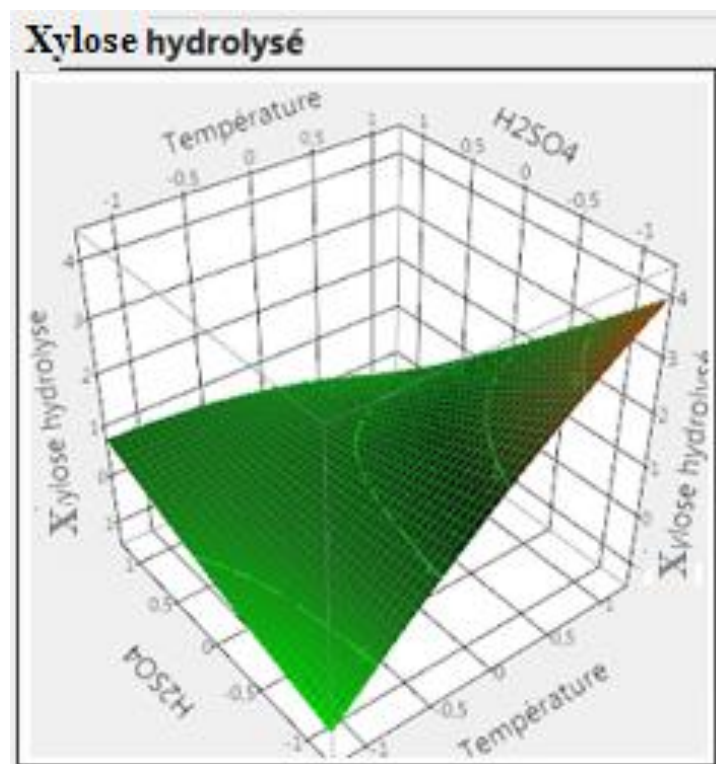


Figure 49: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur l'hydrolyse des hémicelluloses par EV.

2.3.2. Furfural et HMF formés

Les teneurs en produits de dégradation des polysaccharides formés dans la phase liquide lors du traitement EV ont été déterminées. Le furfural et l'acide acétique sont issus de la dégradation des pentoses alors que l'hydroxyméthylfurfural (HMF) provient de la dégradation des hexoses (glucose, mannose et galactose). L'acide formique quant à lui est le produit de la dégradation du furfural, du HMF et des hémicelluloses (Nocquet, 2012), l'acide lévulique étant le produit de la dégradation du HMF. D'après la littérature, le furfural et le HMF sont les principaux inhibiteurs de l'hydrolyse et de la fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000d). Par conséquent, seuls les résultats du furfural et le HMF formés sont donnés dans la **figure 50** et **figure 51**. Les autres produits de dégradation sont donnés en **annexe 2**. Les taux sont calculés sur 100g de matière sèche initiale.

On constate que pour les imprégnations en milieu neutre, le HMF et le furfural ne sont détectés dans les effluents aqueux que pour des sévérités maximales, et à des taux faibles, de l'ordre de 0,1% par rapport à la biomasse initiale. Comme attendu, pour les traitements réalisés en milieu acide, on observe une production plus importante de furfural et HMF à mesure que les conditions deviennent de plus en plus sévères. Les taux élevés de ces deux produits lors de la catalyse acide confirment les phénomènes de dégradations par déshydratation des polysaccharides en furfural et en HMF mentionnés précédemment. Ces phénomènes de dégradation des sucres justifient, en partie, les faibles taux de récupération des hémicelluloses hydrolysées (**figure 48**) et la baisse de la teneur en cellulose (**figure 42**) observés lors du traitement EV par catalyse acide et à forte sévérité.

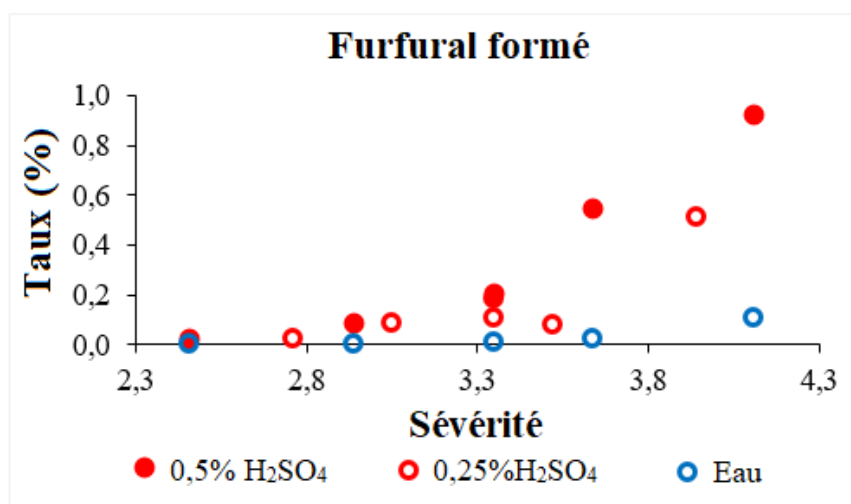


Figure 50: Taux de furfural formé en fonction de la sévérité du traitement EV et du type d'imprégnation.

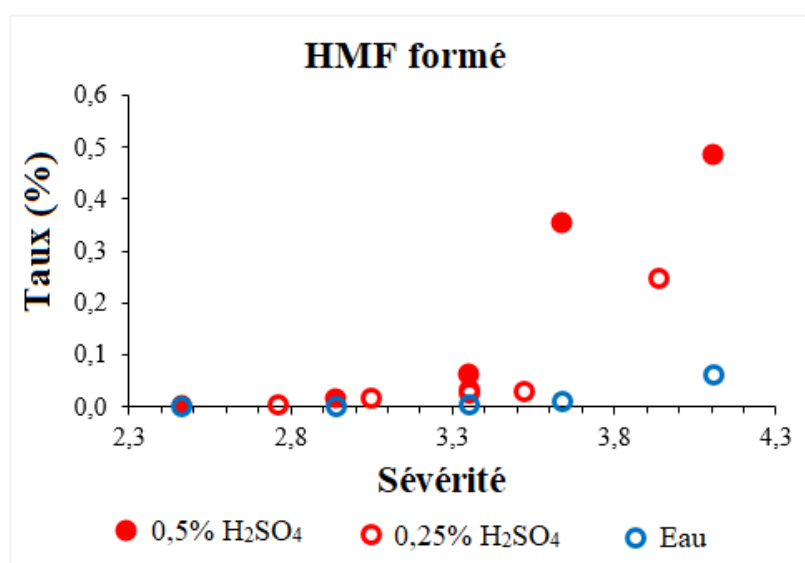


Figure 51: Taux de HMF formé en fonction de la sévérité du traitement EV et du type d'imprégnation.

Les figures ci-dessous (**figure 52** et **figure 53**) et l'étude statistique (**annexe 1**) montrent que les trois facteurs étudiés ont des effets significatifs sur la formation du furfural et du HMF. Mais la température est le facteur prépondérant, suivi de la concentration en H₂SO₄. Ce résultat est en accord avec des études antérieures (Nguyen et al., 1998a) et justifie les concentrations relativement faibles en sucres issus des hémicelluloses dans les effluents aqueux.

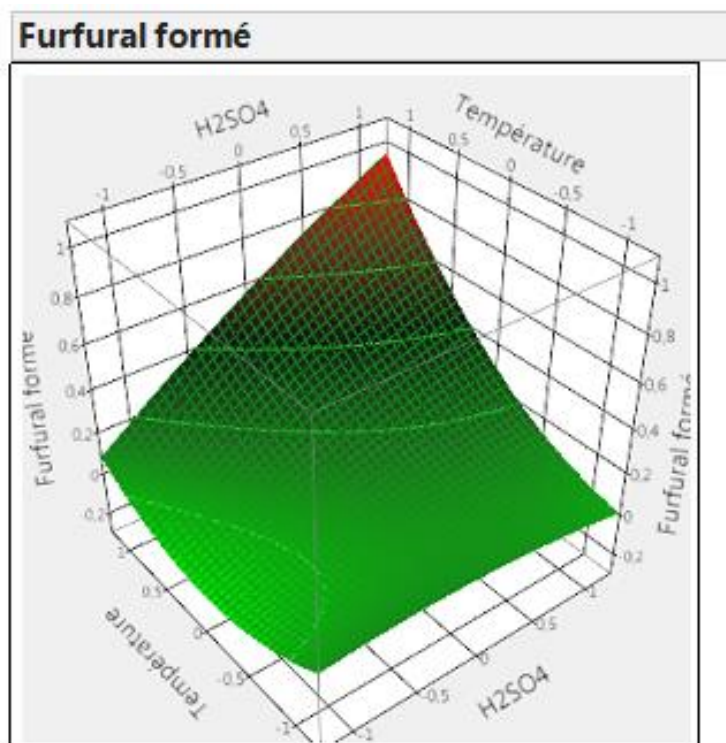


Figure 52: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température sur la formation du furfural.

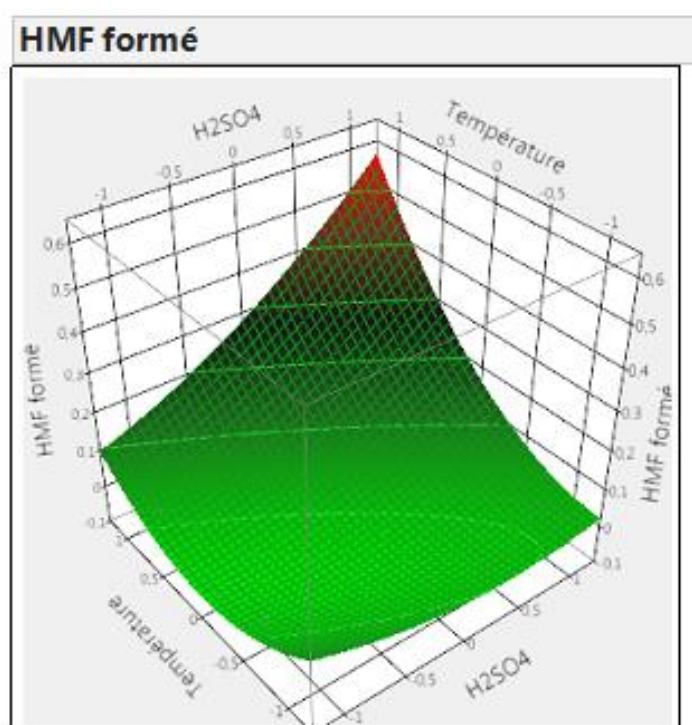


Figure 53: Surface de réponse présentant l'influence de la concentration en acide sulfurique et de la température du traitement EV sur la formation du HMF.

Conclusion

Les principaux paramètres mis en jeu dans l'optimisation du prétraitement EV de l'aubier d'okoumé ont été étudiés dans ce chapitre. Il s'est agi précisément de procéder à l'étude des effets de la granulométrie, des paramètres du prétraitement EV lui-même (température et temps de séjour) et des conditions d'imprégnation de la biomasse avant EV sur l'aubier d'okoumé.

En premier lieu, il en est sorti que les granulométries inférieures à 2 mm induisent la dégradation de la cellulose même dans des conditions de traitement EV douces.

En second lieu, l'étude de l'effet des paramètres du prétraitement EV a montré que l'augmentation de la sévérité des conditions (température, temps de séjour, concentration en acide) entraîne :

- o Une hydrolyse des xylanes récupérés en phases liquide avec dégradation pour les sévérités fortes,
- o Une récupération d'une pâte riche en cellulose, avec des teneurs en lignine et/ou pseudolignines relativement importantes surtout pour les sévérités élevées en milieu acide,
- o une extraction des LEV à l'éthanol avec des taux d'extraction relativement élevées a forte sévérités d'EV.

Cette étude a montré que l'acide améliore l'extraction des hémicelluloses et de la lignine, ce qui a eu pour conséquence de récupérer, après lavage des pâtes, une biomasse beaucoup plus riche en cellulose, ceci pouvant faciliter l'hydrolyse enzymatique et la fermentation subséquentes. Cependant ces conditions entraînent une dégradation d'une partie des hémicelluloses et de la cellulose respectivement en furfural et HMF. Il y a donc dans ce type de prétraitement une perte d'hémicelluloses en solution mais également une production de produits de dégradation potentiellement inhibiteurs d'hydrolyse et de fermentation de la fraction solide.

Chapitre V Caractérisation de la lignine et de la cellulose du bois explosé. Production d'éthanol cellulosique

Introduction

Il a été confirmé dans de nombreuses études que le prétraitement permettait d'ouvrir la biomasse lignocellulosique (BLC) en augmentant la porosité et la surface spécifique pour faciliter l'accès des enzymes cellulolytiques (W. Grous et al., 1986). L'impact de la déstructuration et de l'élimination partielle des hémicelluloses et de la lignine lors d'un prétraitement par EV sur l'accessibilité de la cellulose a été abondamment étudié (Auxenfans et al., 2017a; Eklund et al., 1995; McIntosh et al., 2016b; Ramos et al., 2000b). Concernant la cellulose, du fait de sa structure cristalline, ce polymère est relativement peu impacté lors du prétraitement. Cependant, l'impact du prétraitement sur la structure de la cellulose et ses conséquences sur sa digestibilité enzymatique n'ont pas été clairement établis dans la littérature. Plusieurs études ont montré que le prétraitement d'EV provoquait une diminution de son degré de polymérisation (DP) contribuant à une meilleure digestibilité enzymatique (Auxenfans et al., 2017a). Par contre concernant l'impact sur sa cristallinité, les données de la littérature ne font pas consensus. Certains auteurs rapportent un impact limité du traitement d'EV sur la structure cristalline de la cellulose (R. Dekker and Wallis, 1983; Kun Wang et al., 2009a), alors que d'autres montrent une augmentation de sa cristallinité pouvant s'expliquer par une hydrolyse partielle des zones amorphes et/ou une réorganisation des chaînes sous l'effet de la pression et de la température importantes du prétraitement (Tanahashi et al., 1983b). Une étude réalisée à partir de cellulose pure a conclu qu'un traitement par EV a une sévérité inférieure à 5,2 avait un impact très limité sur sa structure et sa réactivité vis-à-vis des enzymes (Jacquet et al., 2012). Au regard de la littérature, il paraît donc nécessaire d'examiner ce point pour mieux comprendre l'effet du traitement EV sur la cellulose d'okoumé et les conséquences que cela peut induire sur sa réactivité face aux enzymes dans le cadre de sa valorisation en bioéthanol.

Contrairement à la lignine organosolv qui a fait l'objet de nombreuses études (Pan et al., 2008, Sannigrahi et al., 2010, El Hage et al., 2010a, 2010b, 2009), les études scientifiques relatives à l'extraction et à l'étude de la structure et composition de la lignine EV sont moins abondantes. Actuellement, une multitude d'études (spectroscopie infrarouge, spectroscopie de masse, analyse thermogravimétrique, spectroscopie à une ou deux dimensions, etc.) s'axent à cet effet sur la détermination de la structure moléculaire de ces lignines. Des études menées sur des lignines organosolv indiquent que, pour les sévérités de traitement en milieu acide généralement utilisées dans la littérature ($1,74 \leq S_0 \leq 2,40$), les liaisons β -O-4 de la lignine sont relativement peu affectées (El Hage, 2010; Meshgini and Sarkanen, 1989).

Il a été démontré par plusieurs auteurs que l'EV produit une lignine de faible masse moléculaire, riche en groupes hydroxyles phénoliques et en acides carboxyliques et avec des teneurs faibles en β -O-4, en motifs esters et en groupements hydroxyles aliphatiques (Li et al., 2009b). En effet lors d'un prétraitement par EV, la lignine était fortement impactée lors du prétraitement EV avec une hydrolyse des liens aryl-éther accompagnée de réactions de recondensation et formation de liaisons C-C (Li et al., 2007a).

Le but de ce chapitre est d'étudier l'effet du prétraitement d'EV sur la structure de la lignine et la cellulose d'okoumé en vue d'optimiser les voies de valorisation des coproduits de l'industrie du bois d'okoumé dans une optique bioraffinerie. Pour cela une étude structurale des lignines extraites par SEC, par RMN ^{31}P et par RMN HSQC sera décrite. La composition et structure de la cellulose seront étudiées par SEC, et par DRX. Enfin la digestibilité enzymatique sera étudiée suivie de la fermentabilité des hydrolysats.

La **figure 54** présente le procédé de production de bioéthanol. La voie matérialisée en rouge indique la voie de valorisation de la lignine proposée dans ce travail.

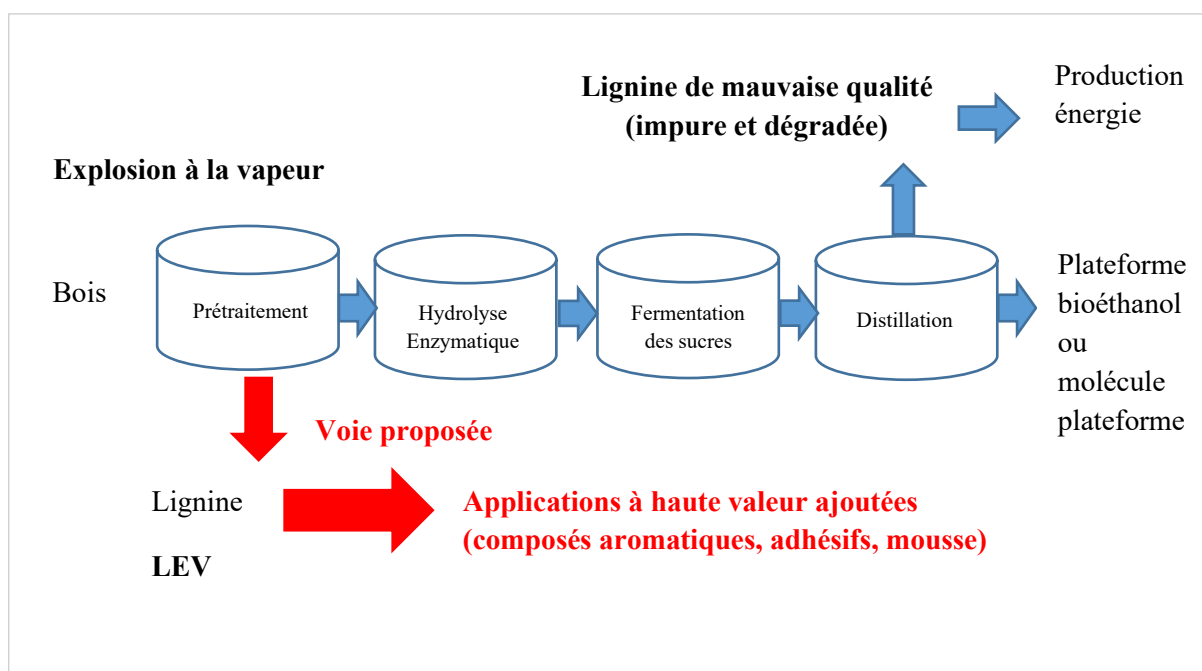


Figure 54: Procédés de production d'éthanol cellulosique.

1. Caractérisation de la lignine de bois explosé d'okoumé et étude des changements structuraux de la lignine au cours du traitement EV.

La lignine de bois explosé à la vapeur (LEV) a été extraite après EV à l'éthanol à pression atmosphérique et récupérée conformément au schéma décrit dans la partie expérimentale du chapitre II (paragraphe 2.2.1). Une méthode d'extraction de la lignine particulièrement douce (eau-éthanol en l'absence de catalyseur, température modérée) a été utilisée de façon à limiter l'impact du procédé de délignification sur la structure des lignines isolées. Comme indiqué précédemment, le facteur de sévérité et le type d'imprégnation ont été définis comme paramètres pour l'étude de l'impact du processus EV sur la structure de la lignine obtenue. Cette lignine (LEV) est comparée à la MWL précédemment décrite (Chapitre III, paragraphe 2).

1.1. Etude du changement structural par RMN HSQC

Afin d'élucider l'effet du traitement EV sur les lignines extraites, celles-ci ont été soumises à une caractérisation structurale par RMN 2D et comparée à la MWL. A titre d'exemple, les spectres des régions aromatiques et des chaînes latérales de E11 et E8, correspondant à un prétraitement EV

à 210°C-2,5min-0% H₂SO₄ (S~3,6) et 210°C-2,5min-0,5% H₂SO₄ (S~3,6) respectivement, sont donnés sur la **figure 55**. Les autres spectres sont présentés en **annexe**.

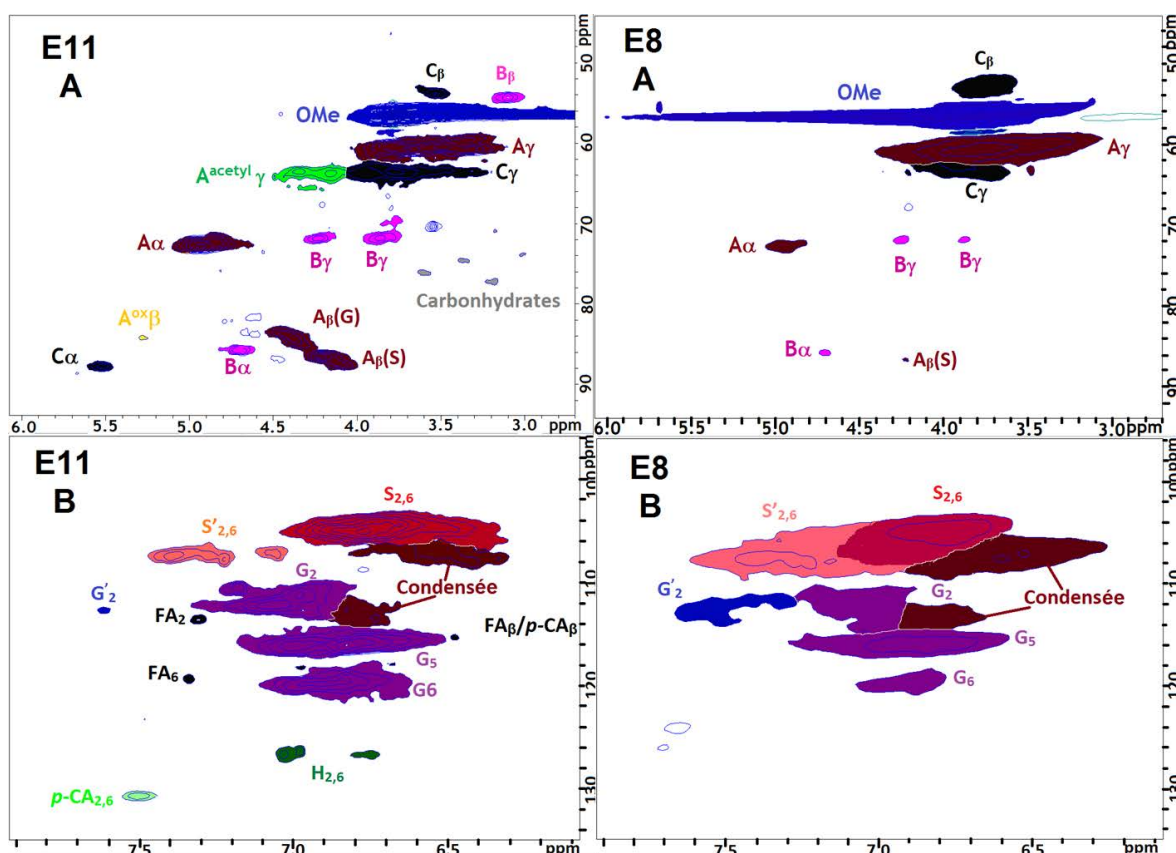


Figure 55: Spectre 2D RMN HSQC de principales sous-structures de la MWL, E11 et E8. A: chaînes latérales, B: noyaux aromatiques.

On retrouve des spectres comparables (mêmes signaux caractéristiques) à ceux du spectre de la MWL surtout à faible sévérité et lors d'une imprégnation à l'eau. Les principaux signaux présents sont les unités syringyle (S) et guaiacyl (G), les liaisons β-O-4 de S et G, les unités résinols, les unités phénylcoumaranes. On note également la présence d'unités S oxydées en C_α (unité S'). Ces lignines (LEV) ne renferment pas ou possèdent très peu de sucres.

Cependant, comparée à la MWL, la lignine EV présente des modifications qui sont visibles surtout lorsque la sévérité augmente en milieu acide. Ces modifications sont étudiées dans le paragraphe suivant.

1.2. Dépolymérisation de la lignine et mise en évidence des phénomènes de recondensation.

Une analyse HSQC semi-quantitative a été réalisée afin de quantifier l'impact du processus EV sur la structure de la LEV en utilisant la position C2 et/ou C6 des unités S et G comme standard interne. On sait que le clivage des liaisons β -O-4 est l'un des processus les plus importants régissant la dépolymérisation de la lignine. La teneur en structure β -O-4 a été estimée à partir de l'intensité du signal de $C_{\beta}H$ (bien séparé des autres signaux) en fonction de l'intensité du C_2H aromatique présente à la fois dans les unités guaiacyle et syringyle selon la méthode décrite dans la littérature (**équation 23**) (Auxenfans et al., 2017b; Li et al., 2007b).

$$\text{La teneur en } \beta\text{-O-4} = \frac{\text{intégral de } C_{\beta}H}{\Sigma \text{intégral de } C_2H} \quad \text{Equation 23}$$

Les intégrales de références sont :

- Pour le guaiacyle $C_{\beta}H$ 85,5/4,33 et C_2H 108-114/6,4-7,5
- Pour le syringyle $C_{\beta}H$ 86,0/4,20 et C_2H 102-108/6,0-7,5

La variation de la teneur en β -O-4 avec la sévérité du traitement EV en fonction du type de pré-imprégnation (acide ou eau) est donnée dans la **figure 56** et le **tableau 24**. Comme indiqué par d'autres auteurs (Li et al., 2007b; Robert et al., 1988), une forte diminution de la teneur en β -O-4 est observée à mesure que la sévérité EV croît. On observe aussi que ce clivage des liaisons β -O-4 est plus important dans les lignines extraites en milieu acide (pré-imprégnation acide). Ainsi un clivage quasi total des unités β -O-4 a été observé dans les conditions suivantes : **210°C, 2,5 min, 0,5% H_2SO_4** , soit **S~3,6** et conformément à Auxenfans et ses collaborateurs (2017), les liaisons β - β' et β -5' sont pour la plupart préservées dans la LEV.

La figure ci-dessous donne également l'évolution du rapport des unités S et G qui permet de mettre en évidence le phénomène de dépolymérisation/repolymérisation (**équation 24**). En effet, les unités guaiacyles comparées aux unités syringyles, présentent une réactivité nucléophile plus élevée et subissent facilement des réactions de repolymérisation. Ainsi, les réactions de repolymérisation ont de préférence lieu parmi les unités guaiacyles. Comme le montre la **figure 56**, une augmentation du rapport S/G a clairement été observée avec l'augmentation de la sévérité du traitement EV surtout pour les LEV issues du prétraitement à l'eau (de S/G~0,8 pour $S_0=2,5$ à S/G~1,7 pour $S=4,1$). Un rapport S/G (S/G~1,7-2,0) plus élevé a été observé pour une imprégnation à l'acide dilué, attestant d'un taux de recondensation plus important pour les LEV extraites à pH inférieur.

$$S/G = \frac{(S_{2,6} + S'_{2,6})}{G_2} \times 0,5 \quad \text{Equation 24}$$

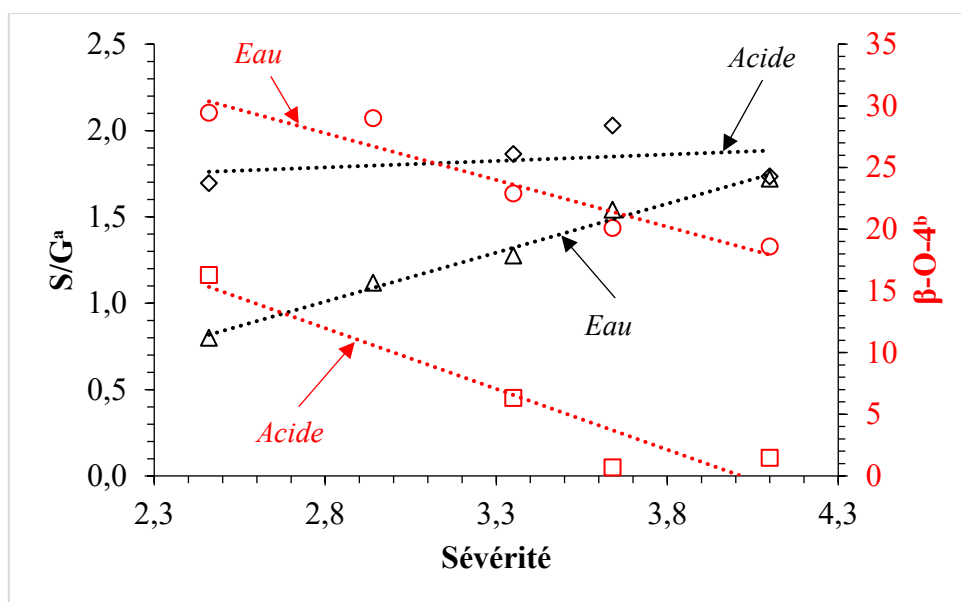


Figure 56: Effet du traitement EV sur le rapport S/G et la teneur en β -O-4

^a S/G déterminé par HSQC. ^b Teneur en β -O-4 pour 100 unités de phénylpropane. Pour l'imprégnation acide la concentration est de 0,5% H_2SO_4 .

1.3. Formation des cétones d'Hibbert lors du traitement EV

Au cours de l'hydrolyse de la lignine lors de prétraitements de type autohydrolyse, organosolv ou explosion à la vapeur, un ion carbonium en position benzylique peut être formé par une réaction catalysée par un acide. Cet ion carbonium provoque la coupure des liaisons β -O-4 soit par **voie hétérolytique** (acidolyse ou hydrolyse) et entraîne la formation des groupes cétones, appelés cétone de Hibbert (S'), résultant des réactions de déshydratation, soit par **voie homolytique** avec formation d'un radical. A cet effet, des cétones de Hibbert portant des groupes carbonyles sur la chaîne latérale ont été quantifiées grâce aux unités S' détectées par RMN HSQC. Une analyse du rapport S/S' a été effectuée afin d'évaluer l'effet du traitement EV sur la formation des cétones d'Hibbert et de mettre en évidence les mécanismes de clivage des liaisons β -O-4. Les résultats sont consignés dans le **tableau 24** et la **figure 57**.

Pour le traitement à l'eau (E13 à E16), ils montrent que dans des conditions plus ou moins douces une augmentation progressive de la sévérité du processus EV entraîne une diminution des liaisons aryl-éther accompagnée de la formation des cétones de Hibbert et une diminution de la valeur S/S'. Toutefois, la valeur S/S' semble augmenter lorsque la sévérité est plus grande. Cette dispersion (~polynomiale) des rapports S/S' en fonction de la sévérité du traitement EV (durée et température de l'étape traitement à la vapeur) peut être rationalisée par les deux mécanismes de déconstruction concomitants impliqués (**voie a et b, figure 62**).

- En accord avec des données de la littérature (Li and Gellerstedt, 2008; Tanahashi, 1990), la température élevée favorise la fragmentation homolytique selon la voie b (**figure 62**)
- Pour une température de consigne élevée, une durée plus longue est nécessaire pour chauffer (à l'aide de vapeur d'eau) le réacteur et la biomasse. Environ 2 min sont nécessaires

pour atteindre la température de 190°C, contre 37 sec pour 170°C. Le chauffage progressif du bois en présence de vapeur d'eau favorise alors la voie hydrolytique (**voie a figure 62**).

Il semble donc que, lors du traitement de l'imprégnation à l'eau, la lignine soit dégradée principalement par voie hydrolytique lorsque les conditions sont douces ($t_s < 5$ min. et $T < 190$) et qu'en conditions plus sévères ($t_s \geq 5$ min et $T \geq 190^\circ\text{C}$) la lignine soit dépolymérisée par les mécanismes homolytique et hétérolytique, la voie homolytique semblant privilégiée.

Ces observations sont conformes à celles de Tanahashi (1990) qui a suggéré que le mécanisme de dépolymérisation de LEV pourrait être fonction de la technologie de l'installation EV utilisée.

- Si le traitement à la vapeur est effectué par un chauffage lent du réacteur, des réactions mixtes d'hydrolyse et d'homolyse peuvent être impliquées ;
- Si la vapeur est introduite directement à haute pression dans le réacteur, la lignine est dégradée à haute température principalement de manière préférentielle par un processus homolytique.

En conditions acide à 0,5% H_2SO_4 (E9 à E15), on remarque que dans des conditions douces une augmentation progressive de la sévérité du processus EV occasionne une diminution accrue des liaisons aryl-éther accompagnée cette fois de la formation des cétones de Hibbert et une diminution du rapport S/S' beaucoup plus importante que celle observée lors du prétraitement à l'eau. Notons tout même qu'en condition plus sévère, la valeur S/S' tend à augmenter. Les valeurs de S/S' inférieures observées de E9 à E8 ($S/S' = 6,2$ à $2,7$) sont conformes à un clivage hydrolytique des liaisons $\beta\text{-O-4}$ caractérisée par un acide produisant des cétones de Hibbert.

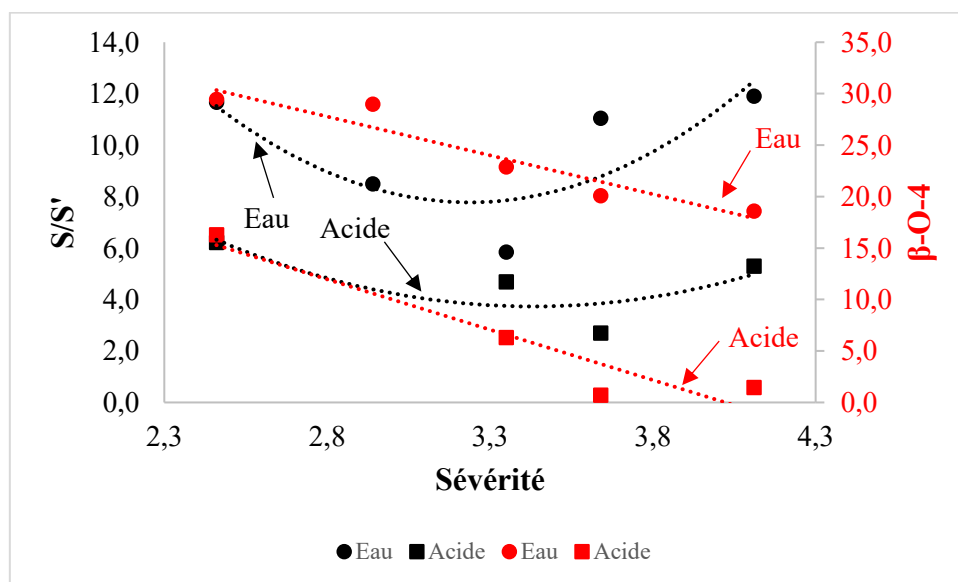


Figure 57: Effet du traitement EV sur le rapport S/S' et la teneur en $\beta\text{-O-4}$

1.4. Etude du changement structural par RMN ^{31}P

La RMN ^{31}P de lignine phosphorylée constitue une méthode de choix pour la caractérisation et la quantification des motifs hydroxyles. Dans notre étude, les fractions de lignine ont été analysées après dérivatisation avec le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,2,3-dioxaphospholane en présence de cyclohexanol en tant qu'étalon interne (Alessandro Granata et Argyropoulos, 1995).

1.4.1. Pré imprégnation à l'eau

Les concentrations en mmol.g^{-1} des groupes OH aliphatiques et phénoliques ont été calculées à partir de la surface des pics intégrés et sont résumés dans le **tableau 24**. Il ressort d'après la **figure 58**, qu'après une imprégnation à l'eau (E13 à E16), l'augmentation de la sévérité du traitement EV s'accompagne d'une augmentation des concentrations en groupements OH aliphatiques et phénoliques. Cette observation peut être rationalisée par une hydrolyse des liaisons $\beta\text{-O-4}$ préalablement observée par RMN HSQC.

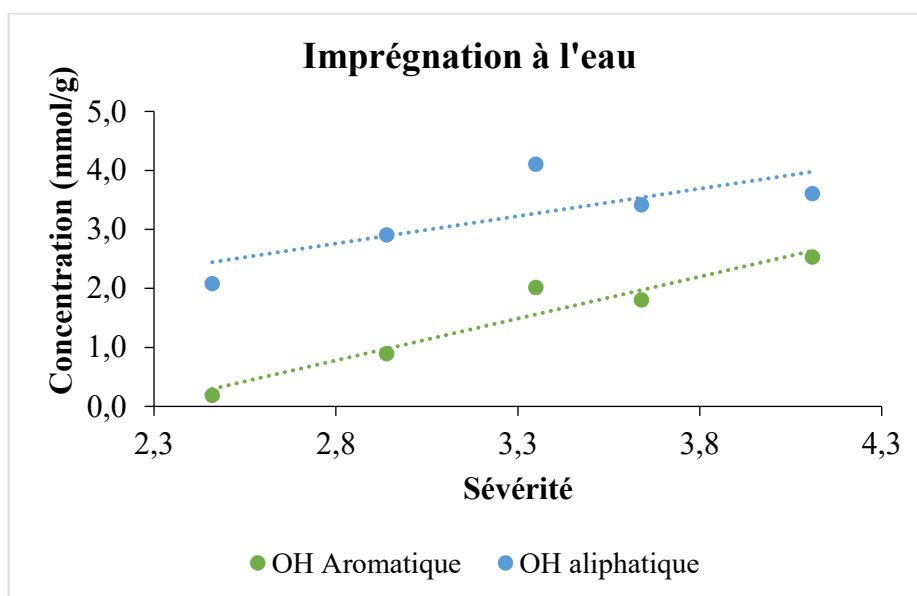


Figure 58: Influence du prétraitement EV avec imprégnation à l'eau sur la teneur en groupement OH de la lignine

1.4.2. Pré imprégnation à l'acide sulfurique dilué

Les résultats de l'impact du traitement et de la concentration en acide sur la teneur en OH aliphatiques et aromatiques sont donnés à la **figure 59** et **figure 60**, respectivement pour une imprégnation de 0,25% et 0,5% H_2SO_4 .

En milieu acide à 0,25% H_2SO_4 (E5 à E14), on remarque que la concentration en OH aromatiques de la lignine augmente nettement avec la sévérité des conditions (température et temps de séjour) pour atteindre des teneurs nettement plus élevées que celles relevées lors du traitement en milieu neutre. Cette observation est en accord avec le clivage accru des liens aryl-éther lié aux effets combinés de la sévérité du traitement EV et de l'acide (**figure 57**), l'hydrolyse des liens aryl éther produisant des motifs phénoliques et alcools. Par contre on observe que la teneur en OH aliphatique quant à elle reste constante malgré l'augmentation de la sévérité pour une imprégnation à 0,25%, et même chute en milieu plus acide (0,5%) (**figure 59**). Sur la base des travaux antérieurs, cette observation peut s'expliquer par des réactions de déshydratation des fonctions alcools des chaînes latérales catalysées par des acides (El Hage et al., 2010b)

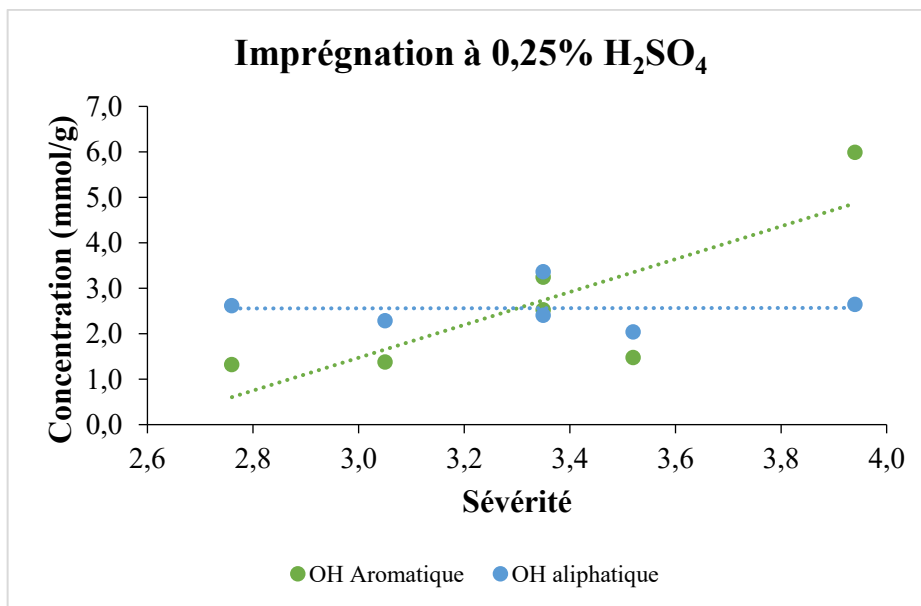


Figure 59: Influence du traitement EV avec imprégnation à 0,25% H_2SO_4 sur la teneur en groupement OH de la lignine

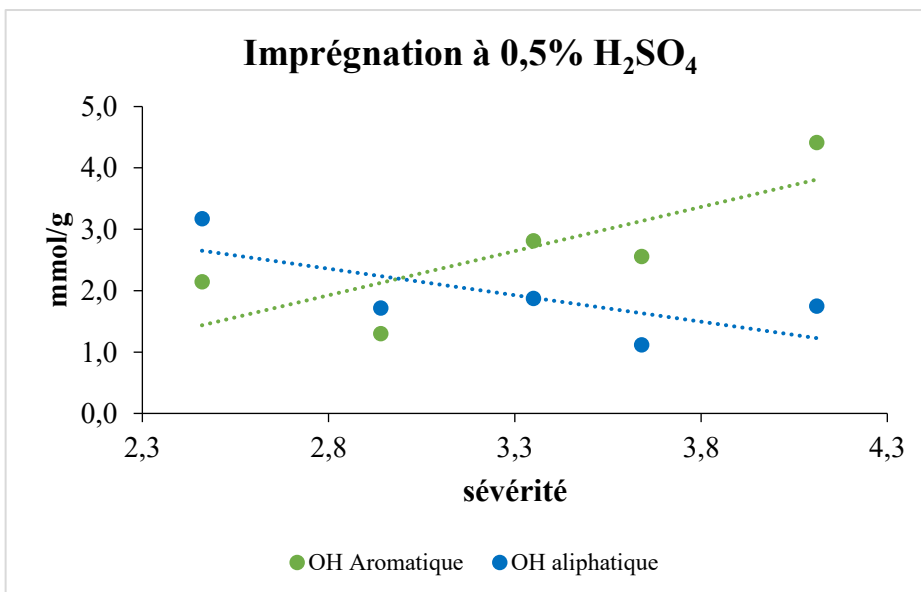


Figure 60: Influence du prétraitement EV avec imprégnation à 0,5% H_2SO_4 sur la teneur en groupement OH de la lignine.

1.5. Traitement au naphtol

Comme évoqué précédemment, il est connu que la déconstruction hydrolytique de la lignine passe par la formation d'un cation carbonium intermédiaire en position α sur la chaîne latérale. Afin de mieux appréhender les mécanismes de scission des liens aryl-éther, une étude de l'effet du traitement par le naphtol a été effectuée comme décrit dans le chapitre II. En effet, il a été décrit dans la littérature que les petites molécules aromatiques riches en électrons (donc sensibles aux attaques électrophiles) comme le naphtol ont la capacité à se lier de façon covalente à la lignine en piégeant le carbocation en position α intermédiaire. Ceci a pour effet de limiter les phénomènes de recondensation, d'augmenter les taux de délignification tout en produisant des fragments de lignine modifiée de plus faibles masses molaires (Li et al., 2007b; Li and Gellerstedt, 2008; Pielhop et al., 2017)

Pour cette étude les deux essais E2 et E11 (**tableau 24**) ont été reproduits dans les mêmes conditions mais en présence de naphtol (E'2 et E'11 respectivement). Les résultats sur le taux de lignine extraite et les caractéristiques des lignines isolées par RMN HSQC sont consignés dans le **tableau 24**. Les spectres sont présentés dans l'**annexe 3**. En présence de naphtol on constate une augmentation significative des teneurs en lignine extraite après explosion à la vapeur (1,7% en l'absence et 3,8% en présence de naphtol pour E2 et E'2, 2,8% en l'absence et 9,3% en présence de naphtol pour E11 et E'11). Ces résultats sont en accord avec les études antérieures et confirment une nette augmentation de l'extractibilité de la lignine en présence du piègeur de carbocation (Li et al., 2007b; Li and Gellerstedt, 2008). Dans notre étude et de façon plus originale, nous nous sommes également intéressés au rapport S/S' précédemment décrit. En effet le rapport S/S' renseigne sur la teneur en C=O en position α de la chaîne latérale (cétones de Hibbert). Il a été décrit dans la littérature que les cétones de Hibbert sont produites à partir d'un lien aryl-éther par un mécanisme hydrolytique. Les résultats donnés dans le Tableau 24 montrent une augmentation nette du rapport S/S' en présence de naphtol (E2 : S/S' = 5,9 ; E'2 : S/S' = 13,4 ; pour E11 : S/S' = 11,1, E'11 : S/S' = 16,6) (**tableau 24**). Ces résultats confirment donc le rôle de piègeur de cation du naphtol. En se liant en position α de la chaîne latérale selon la **figure 62**, le naphtol bloque ainsi la dégradation hydrolytique.

Conformément aux travaux antérieurs (Li et al., 2007b; Pielhop et al., 2017), il a été observé que l'addition d'un piègeur d'ion carbonium tel que le naphtol permet une meilleure extractibilité de la lignine au cours de l'étape de lavage à l'éthanol et que le naphtol a fortement diminué la formation de cétones de Hibbert.

Tableau 24: Conditions préalables de traitement EV pour l'étude de l'effet des conditions d'imprégnation de la biomasse.

Essais	t (min)	T°C	H ₂ SO ₄ ^a (%)	Napht (%)	S ₀ ^b	Lignine (%)	°β-O-4	S/S'	OH ^d Aliph	OH ^d Phenol
							30,2	13,3	3,0	2,1
E13	2,5	170	0,0	non	2,5	1,3	30,7	11,7	2,1	0,2
E3	7,5	170	0,0	non	2,9	1,4	29,0	8,5	2,9	0,9
E2	5,0	190	0,0	non	3,4	1,7	22,9	5,9	4,1	2,0
E11	2,5	210	0,0	non	3,6	2,8	20,1	11,1	3,4	1,8
E16	7,5	210	0,0	non	4,1	4,5	18,6	11,9	3,6	2,5
E5	5	170	0,25	non	2,8	2,8	ni	ni	2,6	1,3
E10	2,5	190	0,25	non	3,1	6,4	ni	ni	2,3	1,4
E12	5	190	0,25	non	3,4	6,0	ni	ni	2,4	2,5
E6	5	190	0,25	non	3,4	6,6	ni	ni	3,4	3,2
E7	7,5	190	0,25	non	3,5	6,8	ni	ni	2,0	1,5
E14	5	210	0,25	non	3,9	12,7	ni	ni	2,6	6,0
E9	2,5	170	0,5	non	2,5	3,2	16,3	6,2	3,2	2,1
E4	7,5	170	0,5	non	2,9	3,5	ni	ni	1,7	1,3
E1	5,0	190	0,5	non	3,4	8,2	6,3	4,7	1,9	2,8
E8	2,5	210	0,5	non	3,6	14,8	0,7	2,7	1,1	2,6
E15	7,5	210	0,5	non	4,1	14,3	1,5	5,3	1,8	4,4
E'2	5,0	190	0,0	oui	3,4	3,8	19,8	13,4	3,2	2,4
E'11	2,5	210	0,0	oui	3,6	9,3	16,8	16,6	3,0	2,3

^a % en poids, sur la base du poids du bois sec. ^b $S_0 = \log(t \times e^{\frac{T-100}{14,75}})$. ^c Quantité de structures β-O-4 pour 100 unités phénylpropane déterminée par RMN HSQC. ^dDistributions des groupes fonctionnels OH (mmol. g⁻¹) de la lignine de l'explosion à la vapeur (LEV) déterminée par RMN ³¹P. ^fChromatographie par Exclusion Stérique de la lignine, détection UV à 280nm. ni : non identifié.

1.6. Répartition du poids moléculaire

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) de la MWL et de la LEV a été réalisée pour déterminer dans quelle mesure les conditions de traitement affectaient la taille des fragments de lignine et le phénomène de dépolymérisation/repolymérisation de la lignine extraite lors du procédé par EV. Pour l'imprégnation à l'eau et à l'acide dilué, on peut constater à partir de la **figure 61 A** et **figure 61 B**, respectivement, une augmentation de la taille des fragments de la lignine récupérée avec l'augmentation de la sévérité du traitement EV. En effet une diminution des temps de rétention observé par SEC, traduit une augmentation des masses molaires des fragments.

Dans le cas de l'imprégnation à l'eau (**figure 61 A**), on constate que pour une sévérité allant de 2,5 à 3,4 correspondant respectivement à E13, E3 et E2 (**tableau 24**), les fragments de lignine récupérée sont plus petits que celle de la MWL. Ce résultat associé aux études de RMN préalables montre que dans les conditions douces des fragments de lignine sont récupérés sous une forme non altérée avec des teneurs élevées en β-aryl éther et de faible teneur en cétone de Hibbert (S') comme le montrent les résultats précédents (**tableau 24 et figure 57**).

Pour une sévérité supérieure ou égale à 3,6 (210°C, 2,5 min.) les fragments de lignine récupérés ont de masses molaires supérieures. Par contre pour le traitement précédé d'une imprégnation à l'acide dilué, toutes les lignines, y compris celles récupérées dans des conditions relativement douces, ont des masses molaires supérieures à celle de la MWL. D'après l'**annexe 1**, la concentration en acide et la température sont les facteurs qui impactent significativement la taille des fragments de lignine mais l'acide reste le facteur prépondérant. On remarque ainsi qu'entre 0% et 0,4% d'acide, la taille des fragments augmente considérablement. L'observation sur l'augmentation de la taille des fragments de lignine récupérés avec la sévérité du traitement EV peut paraître en contradiction avec les conclusions précédentes concernant le clivage des liaisons aryl-éther. Toutefois cela peut s'expliquer par des réactions de recondensation de la lignine en compétition, qui conduisent à de nouvelles liaisons C-C. Ces résultats concordent avec ceux de la **figure 56** (ratios S/G).

Plusieurs auteurs ont observé ces réactions de repolymérisation dans différents procédés de prétraitement hydrolytiques, notamment l'autohydrolyse, le procédé organosolv et l'EV. Dans notre étude et comparé aux articles précédents (Li et al., 2007a; Li and Gellerstedt, 2008; Tanahashi, 1990), ces réactions de repolymérisation se sont révélées efficaces et relativement importantes, y compris à des sévérités faibles. Nos résultats sont conformes aux travaux de la littérature sur l'autohydrolyse de la MWL du tremble (*Populus tremula L*) (Li et al., 2007b). Ces auteurs ont observé une diminution du poids moléculaire de la lignine après autohydrolyse lorsque celle-ci était réalisée en conditions très douces, mais pour un facteur de sévérité supérieur à 1,3, la repolymérisation de la lignine commence à devenir importante. En revanche, Martin-Sampero et al. (2011) n'ont pas observé de recondensation significative de la lignine au cours du traitement EV de copeaux d'Eucalyptus réalisé à une sévérité comprise entre 3,1 et 3,6. Dans des travaux antérieurs du LERMAB, l'impact de la sévérité sur le poids moléculaire de la lignine récupérée à partir du traitement éthanol-organosolv a été étudié à partir de *Miscanthus x giganteus* (T=170-190°C, 60 min. en présence d'acide sulfurique) (El Hage et al., 2010b). Il a été observé une nette diminution de la masse molaire en poids à partir des faibles sévérités. Compte tenu de ces observations, nous pouvons conclure que l'augmentation des masses molaires observées dans notre étude résulte essentiellement de la recondensation due au processus de couplage radicalaire (**voie b**, **figure 62**).

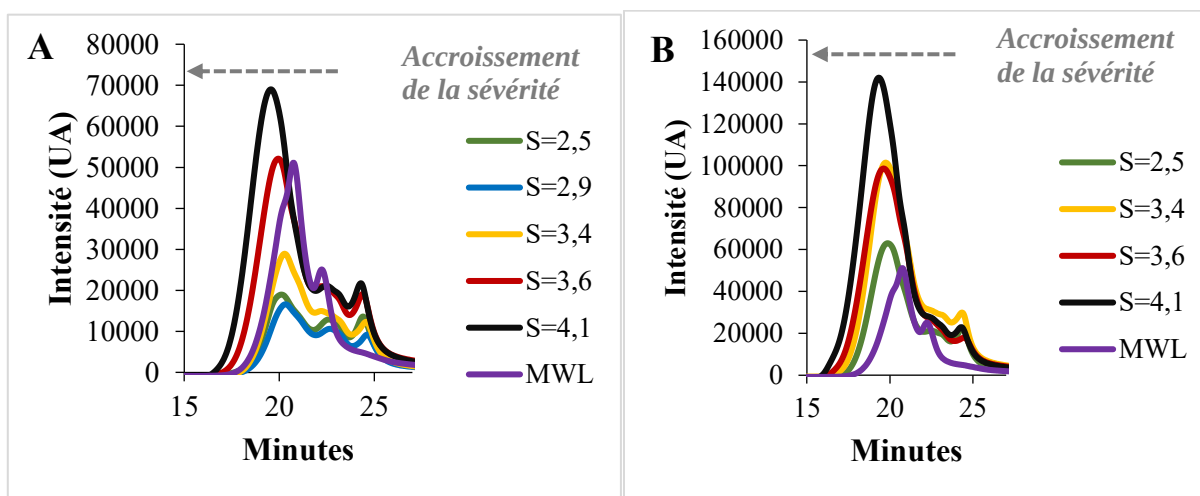


Figure 61: Chromatographie d'exclusion stérique de la LEV: A imprégnation à l'eau, B: imprégnation à l'acide sulfurique dilué.

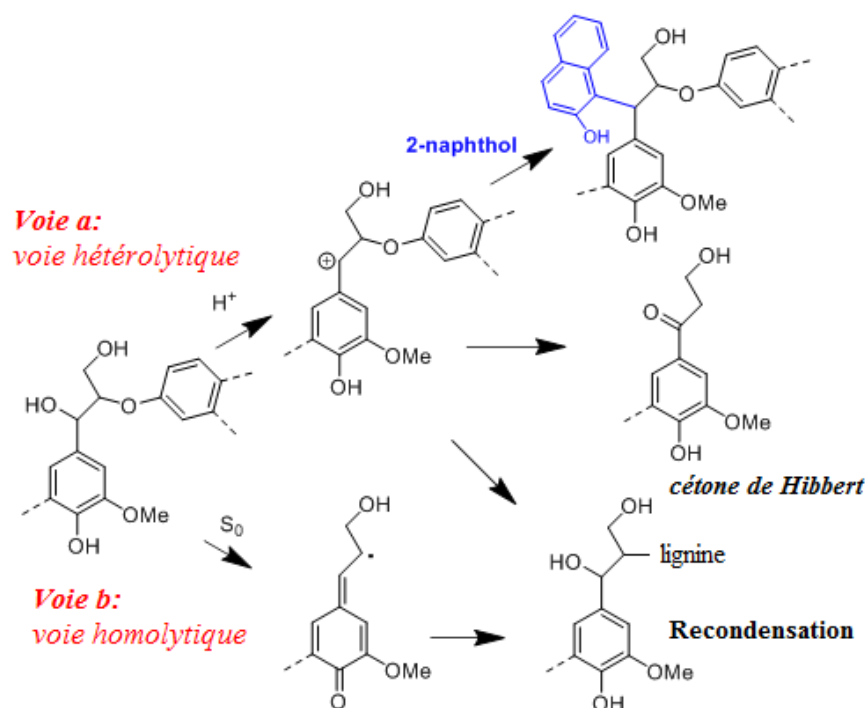


Figure 62: Mécanisme de clivage des liaisons β -aryle éther.

Conclusion

L'étude de la lignine issue du traitement par explosion à la vapeur par RMN ^{31}P , RMN HSQC et SEC nous a permis d'évaluer l'impact du traitement EV sur la structure de la lignine. La caractérisation de la lignine par RMN ^{31}P a permis de montrer que le traitement EV entraîne une augmentation (forte en milieu acide) de la teneur en groupements OH aromatiques de la lignine due à sa dépolymérisation associée à une diminution de la teneur en liaisons β -O-4. Il a également été observé une diminution des groupements OH aliphatiques en conditions acides liée probablement à des phénomènes de recondensation/déshydratation au niveau de la chaîne latérale.

Enfin nous avons montré à l'aide de la RMN HSQC que la lignine est clivée au cours du traitement EV par deux voies concomitantes à savoir des mécanismes homolytiques et hétérolytiques. La fragmentation homolytique est la voie principale et favorise la recondensation par couplage radicalaire, même à faible sévérité de réaction. Dans le même temps l'étape de traitement à la vapeur et/ou l'imprégnation acide favorise la voie hydrolytique. Nous avons montré dans cette étude que le rapport S/S'pouvait être considéré comme un marqueur du mécanisme d'acidolyse.

2. Caractérisation de la cellulose et hydrolyse enzymatique

Nous nous sommes ensuite intéressés dans cette partie à l'étude de l'impact du traitement EV sur l'accessibilité de la cellulose par les cellulases de *T. Reesei*. Par la suite nous avons étudié la fermentescibilité du glucose hydrolysé à l'aide de levures *Saccharomyces cerevisiae*. Pour cela les biomasses issues des prétraitements EV ont été soumises à une hydrolyse enzymatique puis à une fermentation comme décrit dans la partie expérimentale (chapitre II).

2.1. La cellulose de bois explosé

2.1.1. Degré de polymérisation

La cellulose de chaque biomasse traitée par EV a été isolée après une étape de délignification aux chlorites suivie d'une hydrolyse des hémicelluloses résiduelles (méthode présentée au chapitre II).

Les valeurs des distributions de masses molaires et les degrés de polymérisation (DP) ont été estimées par chromatographie d'exclusion stérique après dérivatisation de la cellulose à l'aide de phénylisocyanate. Il est à souligner que les valeurs de DP obtenues par cette méthode sont relatives et ne sont exploitables que si l'on considère des séries d'expériences réalisées dans les mêmes conditions pour mettre en lumière des tendances. Le DP est déterminé à partir du rapport de la masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) et la masse molaire de l'anhydroglucose

Les résultats de l'impact du facteur de sévérité et de la concentration en acide sulfurique sur les DP de la cellulose obtenue après traitement EV sont représentés à la **figure 65**. Lors du prétraitement d'EV avec imprégnation à l'eau, on constate que le DP de la cellulose ne varie pas de façon significative avec la sévérité du traitement ($DP \approx 120-150$). Ce résultat est conforme à certaines études antérieures qui ont montré que dans des conditions d'autohydrolyse le DP de la cellulose était peu impacté (Vignon et al., 1996). Toutefois certains travaux montrent que l'autohydrolyse du bois par traitement EV entraîne une dépolymérisation modérée de la cellulose (Wallis and Wearne, 1992). Ces auteurs trouvent des valeurs de DP de 184 à 111 pour une sévérité de 3,6 et 4,2 respectivement.

Par contre, après imprégnation acide on constate que l'augmentation de la sévérité des conditions de traitement EV entraîne une diminution importante du DP de la cellulose (**figure. 65**).

Pour une imprégnation à 0,5% H_2SO_4 , le DP de la cellulose du bois explosé diminue de 147 pour une sévérité de 2,5 à 48 pour une sévérité de 4,1 et de 152 pour une sévérité de 2,8 à 72 pour une sévérité de 3,9 pour une imprégnation à 0,25% H_2SO_4 . Une tendance de dépolymérisation similaire est indiquée dans la littérature, ces travaux montrant une dépolymérisation de la cellulose avec l'augmentation de la sévérité du traitement EV par catalyse acide. On peut citer les travaux sur la paille de blé où des degrés moyens de polymérisation de la cellulose- α diminuent de 829 à 243 entre 3,4 et 4,1 de sévérité (Montane et al., 1998b), sur les tiges de Lespedeza avec une diminution du DP de 393 à 240 entre 19,6 bars et 24,5 bars (K. Wang et al., 2009a) et de 385 à 207 entre 4 et 10 min pour une pression de 22,1 bars (Kun Wang et al., 2009b), sur la chènevotte de

chanvre avec une diminution de 1200 à 250 motifs (Vignon et al., 1996), sur le peuplier tremble avec une diminution du degré de polymérisation moyen en poids de 810 à 40 unités environ entre 3,2 et 3,9 de sévérité (Josefsson et al., 2002) .

On constate donc clairement à travers cette étude que l'EV avec catalyse acide impacte non seulement les hémicelluloses et la lignine comme nous l'avons souligné précédemment mais également la cellulose en produisant des fragments de polymère de plus faibles tailles. Ceci s'explique par la réaction d'hydrolyse par catalyse acide de la liaison β -glycosidique.

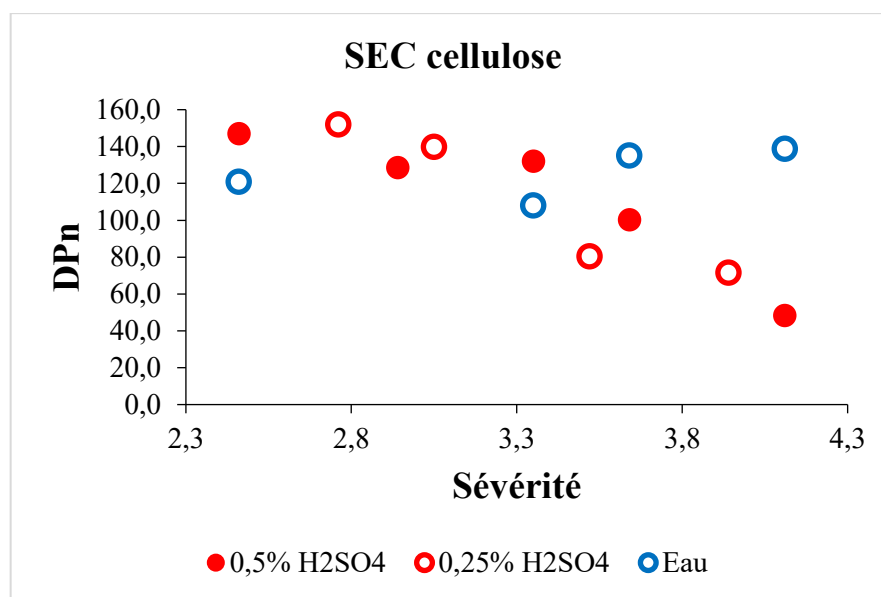


Figure 63: Influence du traitement EV sur la taille des fragments de la cellulose.

2.1.2. Cristallinité

La cellulose de chaque lot prétraité par EV a été caractérisée par diffraction des rayons X aux grands angles. L'index de cristallinité (IC) a été déterminé à partir d'un calcul empirique utilisant les intensités de diffraction de la structure cristalline (I_{002} , $2\theta=22,5^\circ$) et de la région amorphe (I_{am} , $2\theta=18,5^\circ$) (Segal et al., 1959).

La **figure 66** donne la variation de la cristallinité de la cellulose en fonction du traitement EV et de la concentration en acide de la solution de pré-imprégnation. Les résultats montrent, pour les trois types d'imprégnation, que l'index de cristallinité relatif augmente progressivement et de façon significative avec le facteur de sévérité. En effet, on note une augmentation de IC de 74,8% à 81,0% pour une sévérité variant de 2,5 à 4,1 pour le traitement à 0,5% H₂SO₄. Pour le traitement à 0,25% H₂SO₄, il augmente également de 6,2 points lorsque la sévérité varie de 3,4 à 3,9. Dans le cas du traitement à l'eau, le degré de cristallinité augmente également de 9,1 points entre 2,5 et 4,1. Ceci est en accord avec des travaux de la littérature et montre clairement que le traitement EV a entraîné une augmentation significative de l'indice de cristallinité (Fernandez-Bolanos et al., 1999a). Ces résultats concordent avec les travaux réalisés sur le bois de *Betula platiphilla* et *Larix leptolepsis* (Tanahashi, 1990; Tanahashi et al., 1983b), les noix et les peaux d'olive (Fernandez-

Bolanos et al., 1999b) mais également avec d'autres méthodes de prétraitement (Mittal et al., 2011).

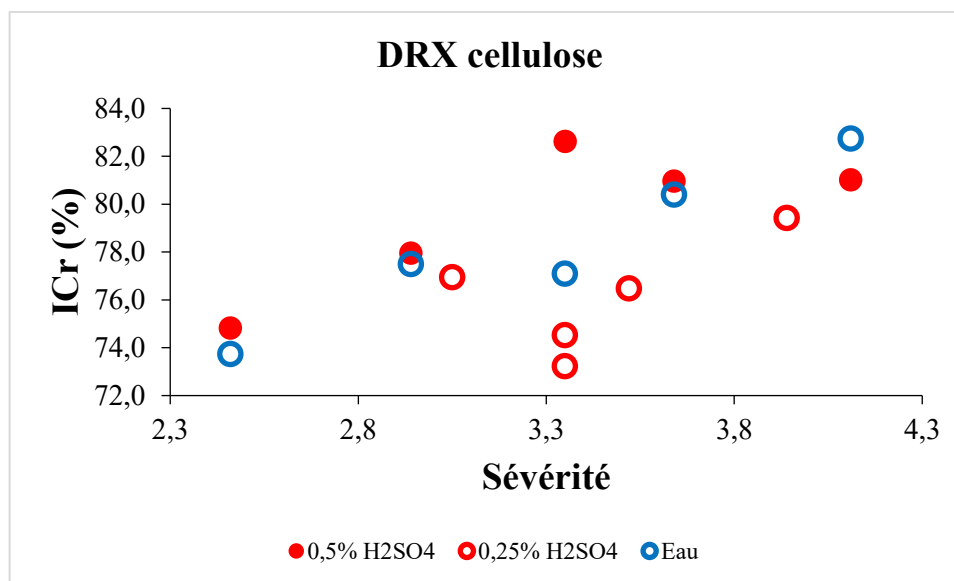


Figure 64: Influence du traitement EV sur la cristallinité de la cellulose.

Il a été souligné précédemment l'importance de l'impact du pH d'imprégnation avant le prétraitement par EV sur le complexe lignocellulosique de l'okoumé. Cette étude a confirmé que le pH acide favorise l'hydrolyse des liaisons β -O-4 de la lignine et les liaisons glycosidiques des polysaccharides entraînant une dégradation forte des hémicelluloses et une diminution importante du DP de la cellulose. Par contre, concernant la cristallinité de la cellulose, le pH d'imprégnation semble n'avoir que peu ou pas d'impact sur la cristallinité de la cellulose. Cette observation tendant à montrer que la variation de la cristallinité de la cellulose est indépendante de la concentration en acide de la solution d'imprégnation est en accord avec d'autres travaux (Fernandez-Bolanos et al., 1999b). Il semble apparaître que les facteurs clés qui impactent sur la cristallinité de la cellulose sont les paramètres opératoires du traitement par EV à savoir la température et le temps de séjour, indépendamment du pH du milieu. Cette observation peut facilement être expliquée avec une augmentation de la cristallinité liée à l'hydrolyse des zones amorphes de la cellulose, décrite dans plusieurs publications. Selon cette hypothèse, une augmentation plus marquée de la cristallinité aurait été observée après imprégnation acide. Par contre les résultats obtenus dans notre étude sont en accord avec des travaux antérieurs ayant montré une recristallisation de la cellulose amorphe et paracristalline dans les conditions de pression et de température de l'étape d'étuvage de l'EV (K. Wang et al., 2009b). Wang et ses collaborateurs (2009) ont montré une augmentation graduelle de la cristallinité de la cellulose de tige de lespedeza (ICr de 74% à 87%) dans des conditions d'EV par augmentation des conditions de pression et de température (de 15 à 25 bars). Une augmentation similaire a été observée sur la cellulose de noyaux d'olive par Fernandez Belanos et ses collaborateurs (1999).

2.2. Hydrolyse enzymatique de la biomasse traitée

L'hydrolyse enzymatique des pâtes cellulosiques isolées après explosion à la vapeur et délignification a été étudiée au cours de cette étude en utilisant un cocktail enzymatique commercial contenant un mélange de cellulases et de β -glucosidases (*T. Reesei*). Le protocole utilisé est une méthode décrite dans la littérature (R. F. H. Dekker and Wallis, 1983; Emmel et al., 2003; McIntosh et al., 2016b; Nguyen et al., 1998b; Ramos et al., 2000a). Le but de cette étude est d'analyser l'effet des paramètres du procédé de prétraitement par EV sur la conversion de la cellulose en glucose.

Les pâtes cellulosiques isolées après EV ont été lavées à l'eau et à l'éthanol comme schématisé dans la **figure 28**, puis hydrolysées par les enzymes pendant 72 h (Chapitre II). Les hydrolysats ont été analysés ponctuellement au cours du temps par chromatographie ionique. La teneur en glucose et le taux de conversion de la cellulose en glucose (digestibilité) ont été déterminés selon **équation 17** et **équation 18** (chapitre II). Le rendement est calculé sur 100g de glucose (marqueur de la cellulose) contenu dans la matière traitée.

Les **figures 65**, **figure 66** et **figure 67**, mettent en évidence la quantité de glucose libéré par *T. Reesei* en fonction du temps d'incubation (en heures) et de la sévérité du traitement dans le cas d'une pré-imprégnation à l'eau (**figure 65**), à l'acide sulfurique 0,25% (**figure 66**) et à l'acide sulfurique 0,5% (**figure 67**).

Quelle que soit la sévérité des conditions du prétraitement et d'imprégnation, on observe une augmentation progressive de la concentration en glucose avant d'atteindre une digestibilité optimale de la cellulose pour un temps d'incubation d'environ 45 heures. Il apparaît clairement que la conversion cellulose-glucose est faible pour les basses sévérités (≈ 20 -30%) et varie de façon importante en fonction de la sévérité du prétraitement par EV pour atteindre des conversions optimales de 65 à 85% selon le type d'imprégnation. Cette observation confirme l'efficacité du traitement par EV pour augmenter la digestibilité enzymatique de la cellulose.

Concernant l'imprégnation en milieu neutre (**figure. 65**), une conversion maximale de la cellulose en glucose d'environ 66% a été obtenue pour l'essai E2 réalisé dans les conditions suivantes : 190°C, 5 min, soit pour une sévérité de 3,4. Il apparaît que les essais réalisés à des sévérités supérieures ($S_0 = 3,6$ et $S_0 = 4,1$) conduisent à des rendements de conversion inférieurs.

Par contre pour les conditions par imprégnation acide (**figure. 66** et **figure 67**), on observe une augmentation régulière de la digestibilité de la cellulose avec la sévérité du traitement d'EV. Pour ces deux imprégnations, la cellulose la plus réactive vis-à-vis des enzymes est celle produite à la sévérité maximale étudiée. Après 45 h d'incubation enzymatique, des rendements proches de 83% et 70% ont été obtenus respectivement pour des imprégnations à 0,25% et à 0,5% d'acide sulfurique.

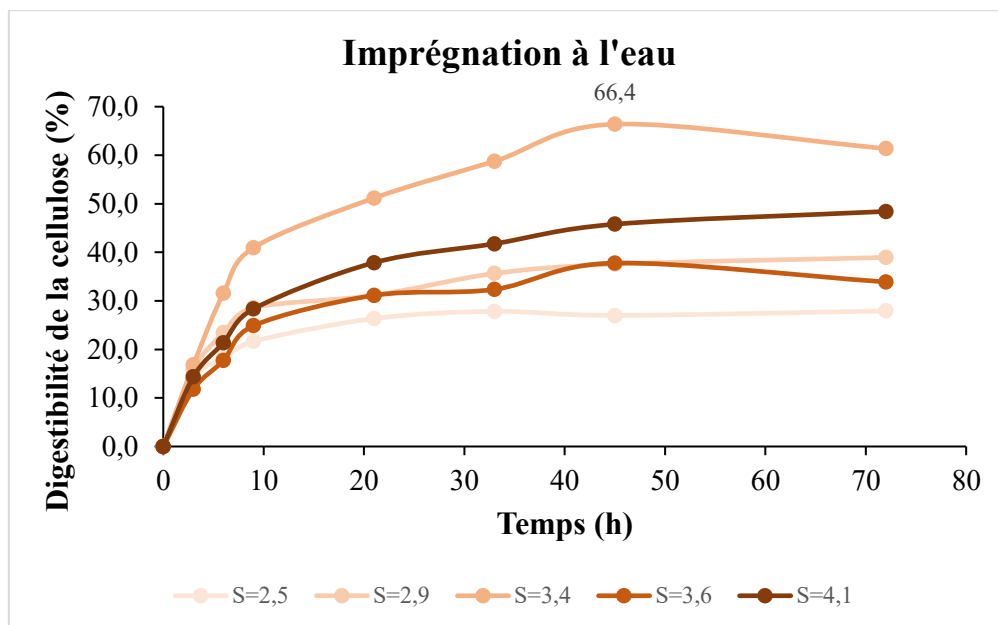


Figure 65: Influence de la sévérité du traitement EV avec imprégnation à l'eau sur la digestibilité de la cellulose par *T. Reesei*.

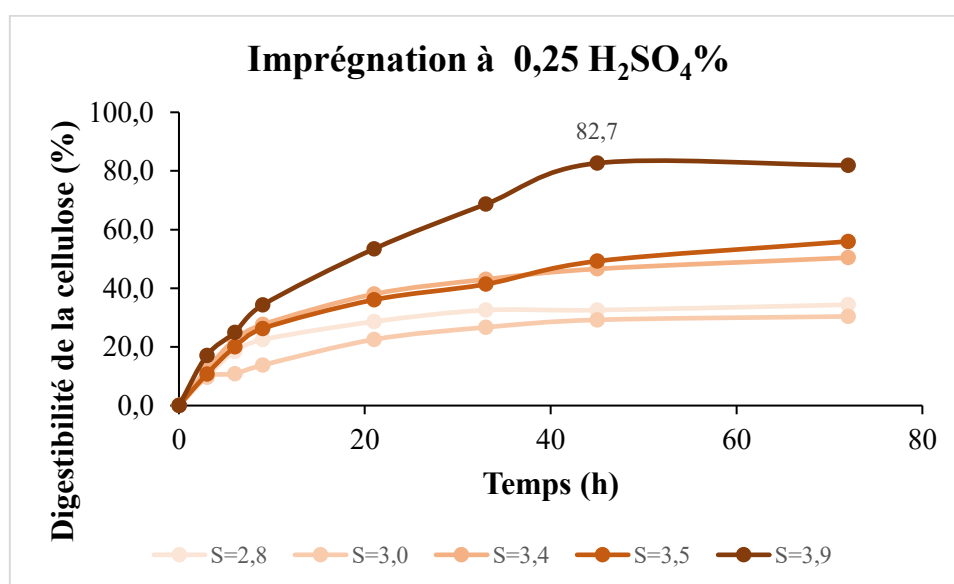


Figure 66: Influence de la sévérité du traitement EV à 0,25% H₂SO₄ sur la digestibilité de la cellulose.

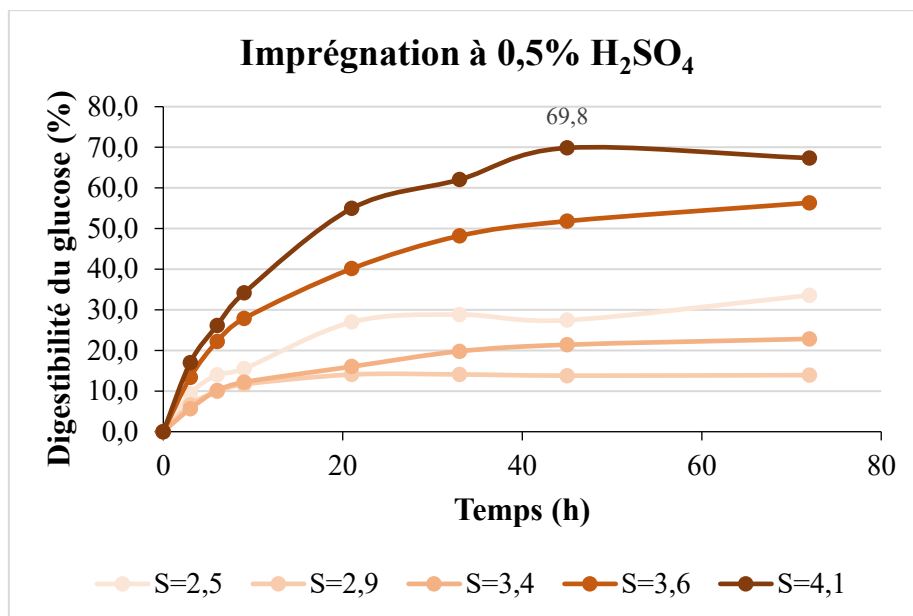


Figure 67: Influence de la sévérité du traitement EV à 0,5% H₂SO₄ sur la digestibilité de la cellulose par *T. Reesei*.

2.3. Discussion

L'explosion à la vapeur est un prétraitement permettant, à partir de biomasses lignocellulosiques, d'augmenter considérablement l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes dans le but de produire du glucose. Un très grand nombre d'exemples peuvent être cités, à partir de ressources variées telles que du bois de feuillu (Emmel et al., 2003; McIntosh et al., 2016b; Ramos et al., 2000a), de résineux ou encore de résidus agricoles (Nguyen et al., 1998b). Le procédé par EV permet en effet de réduire la récalcitrance de la cellulose aux enzymes et de la BLC en général.

Cependant, même si l'augmentation de la digestibilité de la cellulose après EV est unanimement reconnue, les explications données dans la littérature concernant cette réactivité sont toujours sujettes à discussion et les résultats obtenus au cours de ce travail permettent d'alimenter cette discussion. L'augmentation de l'accessibilité de la cellulose aux enzymes avec la sévérité du prétraitement pour les conditions avec imprégnations acide peut être justifiée par les effets de l'EV relevés au cours de ce travail :

- La diminution des teneurs en hémicelluloses avec l'augmentation de la sévérité par des phénomènes d'hydrolyse, entraînant une augmentation de la porosité et une meilleure accessibilité de la cellulose. Comme observé précédemment, les conditions de fortes sévérité et en milieu acide entraînent une hydrolyse quasi-totale des xylanes (xylanes résiduels < 2%).
- L'étude de la lignine d'explosion à la vapeur par des techniques chromatographiques et spectroscopiques nous a permis d'évaluer l'impact du traitement EV sur la structure de la lignine. Une hausse des groupements OH aromatiques de la lignine accompagnée d'une chute importante de la teneur en liens β -O-4 due à sa dépolymérisation ont été observées. Cette dépolymérisation, qui est d'autant plus marquée en milieu acide et lorsque la sévérité est importante, conduit à la formation de fragments de faibles masses molaires redéposés à la

surface des fibres, facilement extractibles lors de l'étape de lavage à l'éthanol. Ainsi, les conditions acides sévères conduisent à une déstructuration importante de la lignine et à la production après lavage, d'un résidu cellulosique relativement pauvre en lignine.

- Concernant la cellulose, le procédé réalisé en milieu acide impacte de façon importante son degré de polymérisation qui chute de $DP \approx 150$ pour $S_0 = 2,4$ à $DP \approx 50$ pour $S_0 = 4,2$. Par contre nos résultats sur l'okoumé semblent montrer qu'en l'absence de catalyse acide, un DP quasi constant est observé quelle que soit la sévérité du traitement.

Cette dégradation de la chaîne de cellulose par hydrolyse acide des liens glycosidiques et avec production de fragments cellulosiques de DP fortement diminués, a été observée après EV par différents auteurs (Diop et al., 2015). Une chute du DP de la cellulose avec le temps de séjour et la température a également été observée pour le prétraitement par acide dilué (Foston and Ragauskas, 2010) sur le peuplier et du millet (*Panicum virgatum*) rend la cellulose plus accessible aux enzymes et notamment aux exoglucanases.

Comme mentionné plus haut, ces conditions génèrent également des produits de dégradation de sucres dérivés du furane (furfural et HMF) et des acides carboxyliques. Jusqu'à 1% de furfural et 0,5% de HMF (calculé par rapport à la masse de bois initial) ont été détectés dans les effluents liquides du traitement. Ces produits de dégradation présentent un effet inhibiteur bien connu. Il semble apparaître au travers des résultats d'hydrolyse enzymatique que, dans notre étude, l'effet inhibiteur n'intervient pas. En effet on observe pour les imprégnations acides une augmentation régulière de la digestibilité de la cellulose avec la sévérité, et ce malgré l'augmentation importante des concentrations d'inhibiteurs observée dans les **figure 50** et **figure 51**. Ce résultat s'explique par le procédé retenu dans notre approche qui engage des étapes d'extraction et de lavage de la pâte à l'éthanol puis à l'eau. Ces étapes ont donc un double avantage de solubiliser une lignine peu dégradée utilisable pour des applications ultérieures et de laver le résidu cellulosique (afin d'éliminer à la fois une partie de la lignine redéposée sur les fibres et les inhibiteurs) de le rendre plus digeste pour les procédés biotechnologiques.

Ainsi, ces différents effets combinés produisent un résidu cellulosique présentant une réactivité d'autant plus forte à l'hydrolyse enzymatique que la sévérité du traitement d'EV est importante en milieu acide. Cependant, il apparaît au vu des résultats expérimentaux obtenus que ces conclusions sont à modérer. En effet, il a été remarqué que la conversion cellulose-glucose maximale n'a pas été observée pour l'imprégnation à 0,5% mais pour l'imprégnation dans des conditions moins acides (0,25%).

Une explication à cette observation pourrait venir de la structure des lignines résiduelles. Il a été montré que le pH d'imprégnation impacte le degré de repolymérisation de la lignine de bois explosé avec formation d'un réseau riche en liaison C-C (**figure 56** et **figure 62**). Cette lignine liée physiquement et chimiquement à la cellulose semble véritablement diminuer l'action des enzymes. Les travaux antérieurs ont montré que, lors des prétraitements par autohydrolyse, la présence de lignine repolymérisée rend difficile l'accès de la cellulose aux cellulases, réduisant ainsi l'efficacité de l'hydrolyse (Mussatto et al., 2008; Pielhop et al., 2015). De plus il a été discuté de la formation de pseudo-lignines dans des conditions de fortes sévérités. Ces pseudo-lignines issues de la repolymérisation de produits de dégradation du complexe lignocellulosiques sont principalement formées en milieu acide et présentent un effet inhibiteur fort vis-à-vis des cellulases (Hu et al., 2012)

Pour les essais réalisés avec imprégnation en milieu neutre, un rendement optimal en glucose ($\approx 66\%$) a été observé pour une sévérité de 2,9. Comparé aux imprégnations acides, le rendement en glucose optimal est plus faible, ce qui peut se justifier par les arguments proposés plus haut, relatifs à une déstructuration moins forte du complexe lignocellulosique. Cependant, ceux-ci n'expliquent pas la diminution des rendements en glucose pour les sévérités supérieures de 3,6 et 4,1. Cette baisse de digestibilité avec les sévérités élevées est en accord avec des travaux antérieurs concernant le prétraitement EV par autohydrolyse d'autres BLC. C'est le cas du *Populus tremuloides* (W. R. Grous et al., 1986) dont le rendement d'hydrolyse diminue lorsque le prétraitement dépasse 20 min à 31 bar (238°C). Les travaux sur la bagasse de canne à sucre ont également montré qu'au-delà de 2 min le prétraitement à 200°C et 69 bar, la digestibilité n'augmente plus (R. F. H. Dekker and Wallis, 1983). Par contre, des études sur le saule ont montré que le rendement d'hydrolyse en glucose augmente avec la température du traitement (Eklund et al., 1995). Mais dans les exemples cités ici, les auteurs justifient cette baisse de digestibilité respectivement par la diminution de la teneur en cellulose liée à la solubilisation de celle-ci pour des fortes sévérités et par l'action inhibitrice de la cellobiose sur les enzymes. Cette baisse de réactivité pour les sévérités élevées peut être justifiée par l'effet inhibiteur de la lignine résiduelle précédemment évoqué couplé à une structure de la cellulose moins affectée avec des DP élevés quelles que soient les conditions utilisées après imprégnation neutre.

Il convient également de noter au vu de nos résultats que l'augmentation de la cristallinité observée avec l'augmentation de sévérité (**figure 64**) ne semble pas entraver le rendement d'hydrolyse. La cristallinité a pourtant été identifiée dans certaines études comme un facteur négatif à la digestibilité, en limitant l'accès des enzymes hydrolytiques (Zhang et al., 2013). Par ailleurs, une étude menée sur de la cellulose pure par Jacquet et al. (2012) a permis de conclure que l'EV menée à des facteurs de sévérité inférieurs à 5,2 n'avait que peu d'effet sur l'augmentation de sa digestibilité enzymatique. Par contre ce prétraitement semble modifier certaines de ses propriétés physicochimiques comme l'augmentation de la cristallinité et de sa rétention d'eau. En accord avec nos résultats, plusieurs études menées sur des BLC ont montré que l'effet positif de l'EV sur la digestibilité enzymatique était lié en premier lieu à l'élimination des hémicelluloses, à la déstructuration de la lignine et à la diminution du DP de la cellulose mais ne semblait pas en lien avec la modification de sa cristallinité (Auxenfans et al., 2017a).

Conclusion

La caractérisation morphologique de la cellulose de bois exposé a permis de mettre en évidence l'effet du traitement EV et du type d'imprégnation sur la taille et la cristallinité de la cellulose. L'étude de la cellulose par SEC a montré que le traitement EV réduit le DP de la cellulose en milieu acide et augmente sa cristallinité.

3. Etape de fermentation

3.1. Etude de la fermentescibilité des hydrolysats

L'étape de fermentation a été réalisée pour vérifier la fermentescibilité des sucres récupérés par hydrolyse enzymatique. Il s'agit d'essais préliminaires, non optimisés utilisant *Saccharomyces cerevisiae*, une levure capable de fermenter le glucose en éthanol. Les hydrolysats issus des expériences E8, E14 et E15 correspondant aux conditions optimales de rendement en glucose après hydrolyse enzymatique ont été utilisés (voir **tableau 26**). Les concentrations en glucose consommé et en éthanol formé nous ont permis de calculer, après 2h de fermentation les rendements de production d'éthanol à partir des **équation 25** et **équation 26**. Les résultats de la fermentation sont consignés dans le **tableau 25**.

On observe une consommation rapide du glucose qui est totalement consommé après 120 mn d'incubation et la formation d'éthanol dans le milieu. Ces résultats montrent donc que les hydrolysats obtenus à partir de bois d'okoumé traité par EV sont fermentescibles par *Saccharomyces cerevisiae*. Les trois essais conduisent à une fermentation totale (≈ 100) du glucose du milieu.

Ces rendements de fermentation sont supérieurs à ceux généralement rapportés dans la littérature (60-85%) (Nguyen et al., 2000, 1998b) avec une durée de fermentation plus courte. Ainsi une étude menée par McIntosh et ses collaborateurs sur l'*Eucalyptus grandis* a donné, au bout de 48h un rendement de conversion maximal de 87%. Comme dans notre étude, ces hydrolysats ont été obtenus par la méthode d'hydrolyse et fermentation séparée et à partir d'une biomasse prétraitée dans des conditions relativement douces (170°C, 15 min et 0,75 % H₂SO₄). Les conditions sévères de leur étude (186°C, 15 min, 2,4% H₂SO₄) ayant donné des rendements de conversion plus faibles (83%). D'après ces études, la présence de substances présentant une action inhibitrice sur les levures constitue le principal obstacle à la fermentation du glucose.

On peut donc conclure que les hydrolysats produits au cours de cette étude à partir d'okoumé sont fermentescibles en utilisant une levure classique comme *Saccharomyces cerevisiae*. Il semble au vu des résultats préliminaires que l'étape de lavage des pâtes avant hydrolyse pourrait limiter les phénomènes d'inhibition par les molécules issues de la dégradation de la LC.

$$\text{Concentration théorique d'éthanol (g/L)} = 0,51 \times [\text{Glucose}] \quad \text{Equation 25}$$

$$\text{Rendement d'éthanol(\%)} = \frac{[\text{EtOH}]_f - [\text{EtOH}]_0}{\text{concentration théorique maximale d'éthanol}} \times 100 \quad \text{Equation 26}$$

Où [Glucose] est la concentration de glucose au début de la fermentation (g/L). 0,51 est le facteur de conversion du glucose en éthanol basée sur la biochimie stœchiométrique de la levure. [EtOH]_f est la concentration d'éthanol à la fin de la fermentation (g/L). [EtOH]₀ est la concentration d'éthanol au début de la fermentation (g/L) qui doit être nulle.

Tableau 25: Suivi de la fermentation.

Essais	Conditions			Concentration glucose (g.L ⁻¹)		Concentration Ethanol (g.L ⁻¹)		(¹)Rendement Ethanol (%)	(²)Rendement d'hydrolyse enzymatique (%)
	T (°C)	t (min)	H ₂ SO ₄	0 min	120min	0min	120min		
E8	210	2,5	0,5	4,3	0	0	2,3	100	56,3
E14	210	5	0,25	4,3	0	0	2,3	100	82,7
E15	210	7,5	0,5	5,7	0	0	3,2	100	69,8

(¹) Rendement massique d'éthanol formé par rapport au rendement théorique,

(²) Rendement massique d'hydrolyse enzymatique sur 100 grammes de cellulose

3.2. Bilan massique de production d'éthanol

Après l'étape de fermentation nous avons estimé la masse d'éthanol produite à partir de la biomasse d'okoumé initiale. Le **tableau 26** nous donne d'une part le rendement massique d'éthanol par rapport à la masse de matière prétraitée par EV (**équation 27**) et d'autre part le rendement massique d'éthanol par rapport à la masse initiale (**équation 28**). Comme indiqué sur le tableau 26, les rendements massiques de E8, E14 et E15 par rapport à la matière traitée sont respectivement de 14,9 kg, 18,6 kg et 14,8 kg. Il ressort que le procédé proposé dans notre étude permet d'estimer une production de 8,9 kg, 11,9 kg et 9,1 kg d'éthanol à partir de 100 kg d'aubier d'okoumé respectivement pour E8, E14 et E15. Cette différence est principalement liée au rendement en glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique comme évoqué précédemment. Il est à souligner que dans cette étude seuls les sucres issus de la cellulose ont été valorisés en éthanol. La fermentation des sucres issus des hémicelluloses (principalement le xylose) permettrait d'augmenter le rendement global en éthanol. Cependant cette approche nécessiterait des microorganismes particuliers et ce type de fermentation dépasse le cadre de cette étude. Néanmoins les rendements en éthanol obtenus sont du même ordre de grandeur que ceux décrits par McIntosh et ses collaborateurs (2016) à partir de l'*eucalyptus grandis* (11,3 kg d'éthanol anhydre sur 100 kg de masse sèche de miscanthus). Des travaux menés sur miscanthus indiquent un rendement maximal supérieur, de l'ordre de 16,9 kg sur 100 kg de matière sèche initiale. Notons que dans les deux exemples cités, l'éthanol a été produit par la méthode de saccharification et fermentation simultanée dont la concentration en matière initiale (hydrolyse enzymatique) était de 25% (masse/volume) pour une charge enzymatique de 30 FPU/g dans le cas du miscanthus et de 15% pour une charge enzymatique de 20 FPU/g pour l'*eucalyptus*.

$$m_{tr.EtOH} (\%) = \frac{A(\%) \times R_{j,j}(\%)}{100} \quad \text{Equation 27}$$

$$m_{i.EtOH}(\%) = \frac{m_{tr.EtOH} (\%) \times B(\%)}{100} \quad \text{Equation 28}$$

Où « $m_{tr.EtOH}$ » est le rendement massique d'éthanol par rapport à la masse de matière traitée (%). « A » est le rendement massique du glucose libéré par hydrolyse enzymatique pour 100 grammes de biomasse traitée (%). « $R_{j,j}$ » est le rendement de la fermentation du glucose en éthanol de l'essai j . « $m_{i.EtOH}$ » est le rendement massique d'éthanol par rapport à la masse initiale. « B » : taux massique de la biomasse traitée par le traitement EV par rapport à la masse initiale (%)

Tableau 26: Bilan massique d'éthanol produit après prétraitement EV par le procédé de saccharification et fermentation séparé.

Essais	Conditions				Glc. (%)	⁽ⁱ⁾ Taux (%)	^(j) Rendement (%)
	T (°C)	T (min.)	H ₂ SO ₄ (%)	*S			
E9	170	2,5	0,5	2,5	37,5	13,7	
E5	170	5	0,25	2,8	42,1	14,5	
E4	170	7,5	0,5	2,9	39,6	5,5	
E10	190	2,5	0,25	3,0	40,0	11,8	
E6	190	5	0,25	3,4	37,9	19,2	
E1	190	5	0,5	3,4	42,0	9,6	
E7	190	7,5	0,25	3,5	40,2	22,5	
E8	210	2,5	0,5	3,6	32,1	17,5	8,9
E14	210	5	0,25	3,9	28,4	23,4	11,9
E15	210	7,5	0,5	4,1	27,0	17,8	9,1

Glc : Teneur en glucose, marqueur de la cellulose, par rapport à la masse initiale sèche. (i) Taux de glucose libéré par hydrolyse enzymatique par rapport à la masse de matière sèche initiale. (j) Rendement massique d'éthanol produit par rapport à la masse de matière sèche initiale.

Conclusion

La caractérisation morphologique de la lignine de bois explosé a permis de mettre en évidence l'effet du traitement EV et du type d'imprégnation sur la structure de la lignine et de la cellulose. Il ressort de ce chapitre que :

- La lignine EV (LEV) est de grande pureté (pas de sucres résiduels), surtout à faible sévérité. Dans ces conditions, la lignine est peu modifiée (proche de MWL) avec des teneurs importantes en liens β-O-4. A forte sévérité, on observe une recondensation de la lignine avec création de liaison C-C

- La cellulose EV étudiée par SEC montre que celle-ci est fortement dépolymérisée en milieu acide (chute importante du DP) mais n'est pas ou peu dépolymérisée en milieu neutre. La caractérisation de la cellulose par DRX montre que sa cristallinité augmente avec la sévérité du traitement EV.
- L'étude de l'hydrolyse de la cellulose a permis d'identifier les facteurs importants dans l'amélioration de la production de glucose par les enzymes. Il s'agit de l'élimination des hémicelluloses, de la réduction du DP de la cellulose observée à fortes sévérités. Ces conditions sévères impactent néanmoins négativement sur la lignine. En effet, ces conditions induisent la recondensation de la lignine et la formation de pseudo-lignines. Il s'est avéré que la cristallinité est un paramètre non important dans l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique.

La fermentation du glucose récupéré par hydrolyse enzymatique à l'issue du prétraitement a montré que ce glucose est complètement fermentescible par la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec un rendement de conversion de glucose en éthanol d'environ 100%. Le procédé proposé a permis d'atteindre une production de 11,9 kg d'éthanol sur les 100 kg de biomasse d'okoumé.

Conclusion générale et perspectives

Le travail présenté dans ce mémoire a pour objectif d'initier un processus de valorisation des déchets des industries de transformations du bois du Gabon dans une optique bioraffinerie pour la production de l'éthanol cellulosique et de la lignine comme coproduit. L'okoumé a été choisi comme essence stratégique pour son importance industrielle actuelle.

Le premier chapitre de ce mémoire présente un résumé de l'état de l'art des connaissances actuelles concernant :

- les statistiques de production des grumes d'okoumé
- l'intérêt économique de l'okoumé
- la composition chimique de l'okoumé
- les méthodes de caractérisation physico chimique du bois
- les méthodes de caractérisation structurale de la cellulose et de la lignine
- les méthodes d'extraction de la lignine
- les méthodes de prétraitement du bois
- le mécanisme de l'hydrolyse enzymatique.

Il ressort de cette étude bibliographique d'une part que la valorisation de la biomasse lignocellulosique selon une approche bioraffinerie n'avait été que très peu étudiée à partir de biomasses africaines. D'autre part que l'okoumé est une essence stratégique en raison de la disponibilité et de son intérêt économique.

Nous avons commencé par évaluer le potentiel chimique des deux types de coproduits pour la production de bioéthanol en terme de teneur en glucose avant d'examiner l'impact de la granulométrie, de la concentration en acide et du prétraitement EV réalisé à différents degrés de sévérité sur : (1) la composition chimique du bois traité, (2) la teneur en cellulose restant dans le bois traité, (3) la teneur en lignine extraite par le traitement EV, (4) la structure de la cellulose et de la lignine extraite afin de comprendre les principaux facteurs influençant l'efficacité du prétraitement EV et les paramètres clés de la digestibilité enzymatique.

Nos résultats montrent que le cœur de déroulage est légèrement plus riche en cellulose que l'aubier. Cependant pour la suite de notre étude, notre choix s'est porté sur l'aubier pour des raisons de disponibilité. Le choix du solvant d'extraction de la lignine de bois explosé a été effectué. L'éthanol s'est avéré le solvant de choix en raison des taux d'extraction élevés, de son faible coût et la facilité d'utilisation du procédé à pression atmosphérique.

La question de l'effet de la granulométrie de la biomasse sur l'efficacité du traitement d'EV a été abordée. Nous avons constaté que la granulométrie a un effet significatif sur la teneur en cellulose du bois traité et ce facteur n'a que très peu d'effet sur le taux d'extraction de la lignine et des hémicelluloses. La granulométrie de 2 mm a donné un contenu en cellulose plus élevé car le prétraitement entraîne une perte de glucose pour les particules les plus petites. Dans tous les cas, l'augmentation de la sévérité du traitement provoque une hydrolyse des hémicelluloses accompagnée d'une extraction de la lignine.

Nous avons également examiné l'influence de la concentration en acide sulfurique dans le milieu réactionnel d'EV à différent degré de sévérité, sur la composition chimique et la structure de la cellulose et de la lignine par des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Cette étude a montré qu'une imprégnation acide du bois avant explosion améliore l'extraction des hémicelluloses et de la lignine avec pour conséquence une biomasse ayant une proportion en cellulose de plus en plus élevée jusqu'à 3,6 de sévérité correspondant à 190°C, 5 min., 0,5% H₂SO₄. Dans ces conditions la teneur en cellulose ou glucose était de 59%. A des sévérités plus élevées, nous avons observé des phénomènes de dégradation de la cellulose et des hémicelluloses respectivement en HMF et en furfural avec pour conséquence une baisse de taux de récupération de la cellulose, des hémicelluloses hydrolysées et de la matière traitée.

Concernant la caractérisation de la lignine extraite, des études spectroscopiques, notamment en RMN HSQC, montrent que le processus de délignification est lié principalement au clivage des liaisons β -O-4 mais qu'à forte sévérité des phénomènes de déshydratation/recondensation de la lignine se produisent. Ces phénomènes entraînent la formation de cétones de Hibbert et la formation de liaisons C-C, avec pour conséquence une augmentation des groupes phénoliques et de la masse moléculaire de la lignine.

Nous avons montré dans cette étude que la lignine est clivée au cours de la EV par deux voies concomitantes à savoir des mécanismes homolytiques et hétérolytiques, que la fragmentation homolytique est la voie principale et favorise la recondensation par couplage radicalaire, même à faible sévérité de réaction. Dans le même temps l'étape de traitement à la vapeur et/ou l'imprégnation acide favorise la voie hydrolytique. Le rapport S/S' pouvait être considéré comme un marqueur du mécanisme d'acidolyse.

Il a été ensuite démontré que l'okoumé prétraité par EV était hydrolysable en glucose par voie enzymatique mais que la digestibilité des pâtes cellulosiques était extrêmement variables en fonction des conditions de prétraitement utilisées. Il a été observé qu'une augmentation de sévérité et l'utilisation d'une imprégnation acide augmentait la réactivité à l'hydrolyse du fait de l'élimination des hémicelluloses, d'une partie de la lignine et la diminution du DP de la cellulose. Le procédé décrit envisageant une étape de lavage des résidus cellulosiques avant fermentation, les phénomènes d'inhibition par la production de produits de dégradation des sucres formés à sévérités élevées n'ont pas lieu. Par contre à sévérité élevées et en milieu acide, la présence de lignine résiduelle recondensée et de pseudo lignine semble présenter une action inhibitrice sur les cellulases

La question des facteurs du prétraitement et des paramètres clés qui améliorent la digestibilité enzymatique de la cellulose a également été abordée par l'étude de l'hydrolyse enzymatique des pâtes d'okoumé prétraitées. Les résultats de l'hydrolyse enzymatique montrent d'une part que l'acide améliore l'accessibilité des enzymes mais à des taux relativement faibles, de l'ordre de 0,25% H₂SO₄. D'autre part, parmi les paramètres étudiés à savoir l'IC, la DP, la teneur en lignine et la teneur en cellulose, seule la DP semble avoir un impact significatif sur la digestibilité enzymatique. La délignification n'a que peu d'impact sur la digestibilité du glucose.

Les échantillons facilement hydrolysables ont été fermentés avec *Saccharomyces cerevisiae* pendant 120 min. Notre procédé a permis de produire l'équivalent de 11,9 kg d'éthanol sur les 100 kg de biomasse d'okoumé initiale.

Ce travail devrait être poursuivi pour optimiser la production de sucres fermentescibles par l'augmentation de la concentration de matière de départ (3% et 15%) et de la charge enzymatique (45 FPU et 85 FPU) afin d'étudier son influence sur la concentration en éthanol.

Le présent travail constitue donc une étape préliminaire à la valorisation des coproduits de l'industrie forestière du Gabon comme matière première à la production d'éthanol cellulosique. De ces résultats, il a été possible de proposer une voie de valorisation de la biomasse en éthanol et de la production de la lignine comme coproduit dès l'étape de prétraitement. Ce travail ouvre donc des perspectives en matière de valorisation des coproduits de l'industrie forestière du Gabon pour la production de molécules biosourcées par une approche « bioraffinerie ».

Bibliographie

- Akpan, U.G., Kovo, A.S., Abdullahi, M., Ijah, J.J., 2005. The production of ethanol from maize cobs and groundnut shells. *AU JT* 9, 106–110.
- Almada, C.C., 2015. Étude sur la dépolymérisation catalytique de la lignine en milieu oxydant: vers la production d'aromatiques biosourcés (PhD Thesis).
- Ando, A., Tanaka, F., Murata, Y., Takagi, H., Shima, J., 2006. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 249–267.
- Antonopoulos, A.A., Grohmann, K., 1993. Recent research efforts in the area of biotechnology for fuels and chemicals. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39, 793–801.
<https://doi.org/10.1007/BF02919036>
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017a. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017b. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 10, 36.
- Balakshin, M., Capanema, E., 2015. On the Quantification of Lignin Hydroxyl Groups with P-31 and C-13 Nmr Spectroscopy. *J. Wood Chem. Technol.* 35, 220–237.
<https://doi.org/10.1080/02773813.2014.928328>
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw, in: *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer, pp. 496–508.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2002. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochem.* 38, 187–192. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00070-5)
- Bédounguindzi, W.F., Candelier, K., Engonga, P.E., Dumarçay, S., Thévenon, M.-F., Gérardin, P., 2020. Anti-termite and anti-fungal bio-sourced wood preservation ingredients from *Dacryodes edulis* (G. Don) HJ Lam resin. *Holzforschung* 1.
- Bergstrom, B.I., 2000. The biology of *Pandalus*, in: Southward, A.J., Tyler, P.A., Young, C.M., Fuiman, L.A. (Eds.), *Advances in Marine Biology*, Vol. 38. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 55–245.
- Bjorkman, A., 1957. Lignin and Lignin-Carbohydrate Complexes - Extraction from Wood Meal with Neutral Solvents. *Ind. Eng. Chem.* 49, 1395–1398. <https://doi.org/10.1021/ie50573a040>
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–546.
- Bonini, C., D'Auria, M., Ernanuele, L., Ferri, R., Pucciariello, R., Sabia, A.R., 2005. Polyurethanes and polyesters from lignin. *J. Appl. Polym. Sci.* 98, 1451–1456.
<https://doi.org/10.1002/app.22277>
- Borysiak, S., Garbarczyk, J., 2003. Applying the WAXS method to estimate the supermolecular structure of cellulose fibers after mercerization. *Fibers Text East Eur* 11, 44.
- Boussaid, A.-L., Esteghlalian, A.R., Gregg, D.J., Lee, K.H., Saddler, J.N., 2000. Steam pretreatment of Douglas-fir wood chips, in: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer, pp. 693–705.
- Brahim, M., 2016. Délignification assistée par traitements physiques et chimiques à partir de résidus de colza (PhD Thesis). Compiègne.
- Brinkmann, A., Chen, M., Couillard, M., Jakubek, Z.J., Leng, T., Johnston, L.J., 2016. Correlating cellulose nanocrystal particle size and surface area. *Langmuir* 32, 6105–6114.

- Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2009. Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 8328–8334. <https://doi.org/10.1021/ie9006672>
- Brownell, H., Saddler, J., 1987. Steam Pretreatment of Lignocellulosic Material for Enhanced Enzymatic-Hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 228–235. <https://doi.org/10.1002/bit.260290213>
- Brownell, H.H., Yu, E.K.C., Saddler, J.N., 1986. Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 792–801.
- Brunck, F., Grison, F., Maitre, H.F., 1990. *L'okoume #Aucoumea klaineana# Pierre : monographie.* CIRAD-CTFT, Nogent-sur-Marne.
- Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity, in: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.* Springer, pp. 5–37.
- Chang, V.S., Nagwani, M., Holtzapple, M.T., 1998. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 135–159. <https://doi.org/10.1007/BF02825962>
- Chen, F., Dixon, R.A., 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nat. Biotechnol.* 25, 759.
- Clair, B., 2001. Etude des propriétés mécaniques et du retrait au séchage du bois à l'échelle de la paroi cellulaire: essai de compréhension du comportement macroscopique paradoxal du bois de tension à couche gélatineuse (PhD Thesis). ENGREF (AgroParisTech).
- Condassamy, O., 2015a. Valorisation d'une lignine alcaline industrielle: vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine (PhD Thesis).
- Condassamy, O., 2015b. Valorisation d'une lignine alcaline industrielle: vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine (PhD Thesis).
- Crestini, C., Argyropoulos, D.S., 1997. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative 31P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and α -O-4 substructures. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1212–1219.
- Dekker, R., Wallis, A., 1983. Enzymic Saccharification of Sugarcane Bagasse Pretreated by Autohydrolysis Steam Explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 3027–3048. <https://doi.org/10.1002/bit.260251218>
- Dekker, R.F.H., Wallis, A.F.A., 1983. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis–steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 3027–3048.
- Del Río, J.C., Rencoret, J., Prinsen, P., Martínez, Á.T., Ralph, J., Gutiérrez, A., 2012. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5922–5935.
- Detienne, P., 1988. Apport de l'anatomie des bois à la botanique tropicale. *Bull. Société Bot. Fr. Actual. Bot.* 135, 7–17. <https://doi.org/10.1080/01811789.1988.10826897>
- Diop, C.I.K., Lavoie, J.-M., Huneault, M.A., 2015. Structural changes of *Salix miyabeana* cellulose fibres during dilute-acid steam explosion: Impact of reaction temperature and retention time. *Carbohydr. Polym.* 119, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.031>
- Doat, J., 1972. Etude papetière de l'Okoumé : essais de laboratoire, semi-industriels et industriels. *Bois For. Trop.*
- Dowe, N., McMillan, J., 2001. SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. *Natl. Renew. Energy Lab. NREL Anal. Proced.*
- Duff, S.J., Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55, 1–33.
- Duff, S.J.B., Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 55, 1–33. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00122-0)
- Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G., 1995. The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresour. Technol.* 52, 225–229.
- El Hage, R., Brosse, N., Chrusciel, L., Sanchez, C., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2009. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1632–1638. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.007>

- El Hage, R., Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2010a. Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012>
- El Hage, R., Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2010b. Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012>
- El Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., Brosse, N., 2010c. Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. *Bioresour. Technol.* 101, 9321–9329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.143>
- El Mansouri, N.E., Salvado, J., 2006. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Ind. Crops Prod.* 24, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.10.002>
- Emmel, A., Mathias, A.L., Wypych, F., Ramos, L.P., 2003. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresour. Technol.* 86, 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00165-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00165-7)
- Engozogho Anris, S.P., Bikoro Bi Athomo, A., Safou Tchiana, R., Santiago-Medina, F.J., Pizzi, A., Charrier, B., 2020. Maldi-ToF analysis and FTIR characterization of *Aucoumea klaineana* Pierre (Okoume) sapwood and heartwood condensed tannins from Gabon's natural forest. *Wood Sci. Technol.* 54, 907–928. <https://doi.org/10.1007/s00226-020-01193-2>
- Fernandez-Bolanos, J., Felizon, B., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A., 1999a. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresour. Technol.* 68, 121–132. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00134-5)
- Fernandez-Bolanos, J., Felizon, B., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A., 1999b. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresour. Technol.* 68, 121–132.
- Focher, B., Marzetti, A., Crescenzi, V., 1991. *Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications : Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications, Milan, Italy, 20-21 October 1988.* CRC Press.
- Foster, B.L., Dale, B.E., Doran-Peterson, J.B., 2001. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp, in: *Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.* Springer, pp. 269–282.
- Foston, M., Ragauskas, A.J., 2010. Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of *Populus* and switchgrass. *Biomass Bioenergy* 34, 1885–1895.
- Granata, A., Argyropoulos, D., 1995. 2-Chloro-4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-Dioxaphospholane, a Reagent for the Accurate Determination of the Uncondensed and Condensed Phenolic Moieties in Lignins. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1538–1544. <https://doi.org/10.1021/jf00054a023>
- Granata, Alessandro, Argyropoulos, D.S., 1995. 2-Chloro-4, 4, 5, 5-tetramethyl-1, 3, 2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1538–1544.
- Grous, W., Converse, A., Grethlein, H., 1986. Effect of Steam Explosion Pretreatment on Pore-Size and Enzymatic-Hydrolysis of Poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 274–280. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90021-9)
- Grous, W.R., Converse, A.O., Grethlein, H.E., 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 274–280. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90021-9)
- Guo, H., Zhang, B., Qi, Z., Li, C., Ji, J., Dai, T., Wang, A., Zhang, T., 2017. Valorization of lignin to simple phenolic compounds over tungsten carbide: Impact of lignin structure. *ChemSusChem* 10, 523–532.
- Hage, R.E., 2010. *Prétraitement du miscanthus x giganteus : vers une valorisation optimale de la biomasse lignocellulosique.*

- Harmsen, P.F.H., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R., 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Wageningen UR-Food & Biobased Research.
- Hasegawa, I., Tabata, K., Okuma, O., Mae, K., 2004. New pretreatment methods combining a hot water treatment and water/acetone extraction for thermo-chemical conversion of biomass. *Energy Fuels* 18, 755–760. <https://doi.org/10.1021/ef030148e>
- Heikkinen, H., Elder, T., Maaheimo, H., Rovio, S., Rahikainen, J., Kruus, K., Tamminen, T., 2014a. Impact of Steam Explosion on the Wheat Straw Lignin Structure Studied by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance and Density Functional Methods. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10437–10444. <https://doi.org/10.1021/jf504622j>
- Heikkinen, H., Elder, T., Maaheimo, H., Rovio, S., Rahikainen, J., Kruus, K., Tamminen, T., 2014b. Impact of steam explosion on the wheat straw lignin structure studied by solution-state nuclear magnetic resonance and density functional methods. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10437–10444.
- Heux, L., Dinand, E., Vignon, M.R., 1999. Structural aspects in ultrathin cellulose microfibrils followed by C-13 CP-MAS NMR. *Carbohydr. Polym.* 40, 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00051-X)
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *science* 315, 804–807.
- Hongzhang, C., Liying, L., 2007a. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresour. Technol.* 98, 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.029>
- Hongzhang, C., Liying, L., 2007b. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresour. Technol.* 98, 666–676. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.029>
- Hu, F., Jung, S., Ragauskas, A., 2012. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 117, 7–12.
- Hu, Z., Yeh, T.-F., Chang, H., Matsumoto, Y., Kadla, J.F., 2006. Elucidation of the structure of cellulosytic enzyme lignin. *Holzforschung* 60, 389–397. <https://doi.org/10.1515/HF.2006.061>
- Huijgen, W.J.J., Telysheva, G., Arshanitsa, A., Gosselink, R.J.A., De Wild, P.J., 2014. Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment. *Ind. Crops Prod.* 59, 85–95.
- Ibbett, R., Domvoglou, D., Wortmann, F., Schuster, K.C., 2010. Carbon-13 solid state NMR investigation and modeling of the morphological reorganization in regenerated cellulose fibres induced by controlled acid hydrolysis. *Cellulose* 17, 231–243. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9397-7>
- Jääskeläinen, A.S., Sun, Y., Argyropoulos, D.S., Tamminen, T., Hortling, B., 2003. The effect of isolation method on the chemical structure of residual lignin. *Wood Sci. Technol.* 37, 91–102.
- Jacquet, N., Vanderghem, C., Blecker, C., Paquot, M., 2010a. La steam explosion: application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique.
- Jacquet, N., Vanderghem, C., Blecker, C., Paquot, M., 2010b. La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique.
- Jacquet, N., Vanderghem, C., Danthine, S., Quievy, N., Blecker, C., Devaux, J., Paquot, M., 2012. Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers. *Bioresour. Technol.* 121, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.073>
- Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P., Sundquist, J., 1995. Characterization of Alkali-Soluble Fraction of Steam Exploded Birch Wood. *Holzforschung* 49, 51–59. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1995.49.1.51>
- Josefsson, T., Lennholm, H., Gellerstedt, G., 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung* 56, 289–297. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.047>
- Jourez, B., 2010. Anatomie et identification des bois.
- Kallavus, U., Gravitis, J., 1995. A Comparative Investigation of the Ultrastructure of Steam Exploded Wood with Light, Scanning and Transmission Electron-Microscopy. *Holzforschung* 49, 182–188. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1995.49.2.182>

- Kang, K.E., Chung, D.-P., Kim, Y., Chung, B.-W., Choi, G.-W., 2015. High-titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system. *Fuel* 145, 18–24.
- Kataria, R., Mol, A., Schulten, E., Happel, A., Mussatto, S.I., 2017a. Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis. *Ind. Crops Prod.* 106, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.050>
- Kataria, R., Mol, A., Schulten, E., Happel, A., Mussatto, S.I., 2017b. Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis. *Ind. Crops Prod., Challenges in Building a Sustainable Biobased Economy* 106, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.050>
- Keshwani, D.R., Cheng, J.J., 2009. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresour. Technol.* 100, 1515–1523.
- Kono, H., Numata, Y., Erata, T., Takai, M., 2004. C-13 and H-1 resonance assignment of mercerized cellulose II by two-dimensional MAS NMR spectroscopies. *Macromolecules* 37, 5310–5316. <https://doi.org/10.1021/ma030465k>
- Koudou, J., Obame, L.-C., Kumulungui, B.S., Edou, P., Figueredo, G., Chalchat, C., Traore, A.S., 2009. Volatile constituents and antioxidant activity of *Aucoumea klaineana* Pierre essential oil. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3, 323–326.
- Kpogbemabou, D., 2011. Procédé de fabrication de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique biologiquement déstructurée (PhD Thesis). Poitiers.
- Laine, C., 2005. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Helsinki University of Technology.
- Lasserre, G., 1957. Les cahiers d'outre-mer [Tome VIII, 1955, n° 29, 30, 31 et 32.]. *Inf. Géographique* 21, 84–87.
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56, 1–24.
- Li, H., Pu, Y., Kumar, R., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E., 2014. Investigation of Lignin Deposition on Cellulose During Hydrothermal Pretreatment, Its Effect on Cellulose Hydrolysis, and Underlying Mechanisms. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 485–492. <https://doi.org/10.1002/bit.25108>
- Li, J., Gellerstedt, G., 2008. Improved lignin properties and reactivity by modifications in the autohydrolysis process of aspen wood. *Ind. Crops Prod., 7th Forum of the International Lignin Institute* 27, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.022>
- Li, J., Gellerstedt, G., Toven, K., 2009a. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresour. Technol.* 100, 2556–2561. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.004>
- Li, J., Gellerstedt, G., Toven, K., 2009b. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresour. Technol.* 100, 2556–2561.
- Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2007a. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 98, 3061–3068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.018>
- Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2007b. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 98, 3061–3068.
- Lin, S.Y., Dence, C.W., 2012. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Lloyd, T.A., Wyman, C.E., 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour. Technol.* 96, 1967–1977.
- Lora, J.H., Wayman, M., 1978. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. *Tappi* 61, 47–50.
- Malinen, R., Sjöstrom, E., 1973. Studies on Reactions of Carbohydrates During Oxygen Bleaching .3. Degradation of Cello-Oligosaccharides and Hydrocellulose. *Pap. Ja Puu-Pap. Timber* 55, 547–
- Mbadinga, M., 2006. État, entreprises et développement au Gabon: contribution à une étude géographique (PhD Thesis). Montpellier 3.

- Mbagou, J.B., 2017. Variabilité intra-arbre des propriétés physico-mécaniques et chimiques du "Tessmania africana" en provenance du Gabon.
- McIntosh, S., Zhang, Z., Palmer, J., Wong, H.-H., Doherty, W.O., Vancov, T., 2016a. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 10, 346–358.
- McIntosh, S., Zhang, Z., Palmer, J., Wong, H.-H., Doherty, W.O.S., Vancov, T., 2016b. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 10, 346–358. <https://doi.org/10.1002/bbb.1651>
- Mecagni, M.M., Marchettini, D., Maino, M.R., 2015. Evolving Banking Trends in Sub-Saharan Africa: Key Features and Challenges. International Monetary Fund.
- Medzegue, M.J., 2007. Etude comparative des bois d'Okoumé (*Aucoumea Klaineana* P.) issus des plantations et de la forêt naturelle : anatomie, durabilité naturelle (thesis). Bordeaux 1.
- Medzegue, M.J., Grelier, S., Bertrand, M., Nziengui, M., Stokes, A., 2007. Radial growth and characterization of juvenile and adult wood in plantation grown okoumé (*Aucoumea klaineana* Pierre) from Gabon. *Ann. For. Sci.* 64, 815–824.
- Medzegue, M.J., Stokes, A., Gardrat, C., Grelier, S., 2013. Analysis of volatile compounds in *Aucoumea klaineana* oleoresin by static headspace/gas chromatography/mass spectrometry. *J Nat Prod* 6, 81–89.
- Meshgini, M., Sarkanen, K., 1989. Synthesis and Kinetics of Acid-Catalyzed Hydrolysis of Some Alpha-Aryl Ether Lignin Model Compounds. *Holzforschung* 43, 239–243. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1989.43.4.239>
- Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M.E., Johnson, D.K., 2011. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-41>
- Monot, C., 2015. Contribution à l'étude des complexes lignine-hydrates de carbone (LCC) dans le bois: étude de l'impact des différentes étapes d'un procédé de bioraffinerie sans soufre sur les LCC (PhD Thesis).
- Montane, D., Farriol, X., Salvado, J., Jollez, P., Chornet, E., 1998a. Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 18, 171–191. <https://doi.org/10.1080/02773819809349575>
- Montane, D., Farriol, X., Salvado, J., Jollez, P., Chornet, E., 1998b. Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 18, 171–191. <https://doi.org/10.1080/02773819809349575>
- Montero, C., 2010. Caractérisation du comportement viscoélastique asymptotique du bois (PhD Thesis).
- Moore, W.E., Johnson, D.B., 1967. Procedures for the chemical analysis of wood and wood products (as used at the US Forest Products Laboratory). Forest Products Laboratory, Forest Service, US Department of Agriculture.
- Morjanoff, P., Gray, P., 1987. Optimization of Steam Explosion as a Method for Increasing Susceptibility of Sugarcane Bagasse to Enzymatic Saccharification. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 733–741. <https://doi.org/10.1002/bit.260290610>
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>
- Navi, P., Heger, F., 2005. Comportement thermo-hydomécanique du bois: applications technologiques et dans les structures. PPUR presses polytechniques.
- Newman, R.H., 1999. Estimation of the lateral dimensions of cellulose crystallites using C-13 NMR signal strengths. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 15, 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0926-2040\(99\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S0926-2040(99)00043-0)
- Newman, R.H., Hill, S.J., Harris, P.J., 2013. Wide-angle x-ray scattering and solid-state nuclear magnetic resonance data combined to test models for cellulose microfibrils in mung bean cell walls. *Plant Physiol.* 163, 1558–1567.

- Nguyen, Q.A., Tucker, M.P., Boynton, B.L., Keller, F.A., Schell, D.J., 1998a. Dilute acid pretreatment of softwoods - Scientific note. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–2, 77–87. <https://doi.org/10.1007/BF02920125>
- Nguyen, Q.A., Tucker, M.P., Boynton, B.L., Keller, F.A., Schell, D.J., 1998b. Dilute acid pretreatment of softwoods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70, 77–87.
- Nguyen, Q.A., Tucker, M.P., Keller, F.A., Eddy, F.P., 2000. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–6, 561–576. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:561>
- Nimz, H.H., Robert, D., Faix, O., Nemr, M., 1981. Carbon-13 NMR spectra of lignins, 8. Structural differences between lignins of hardwoods, softwoods, grasses and compression wood. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 35, 16–26.
- Nishikawa, N.K., Sutcliffe, R., Saddler, J.N., 1988. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 549–552.
- Nocquet, T., 2012. Torréfaction du bois et de ses constituants: expériences et modélisation des rendements en matières volatiles (PhD Thesis).
- Obame, S.N., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2019. Homolytic and Heterolytic Cleavage of β -Ether Linkages in Hardwood Lignin by Steam Explosion. *J. Agric. Food Chem.* 67, 5989–5996. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01744>
- Ogier, J.C., Leygue, J.P., Ballerini, D., Pourquie, J., Rigal, L., 1999. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil Gas Sci. Technol.* 54, 67–94.
- Ohgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., Zacchi, G., 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.* 126, 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.001>
- Overend, R., Chornet, E., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. -Math. Phys. Eng. Sci.* 321, 523–536. <https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>
- Overend, R.P., Chornet, E., 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Phil Trans R Soc Lond A* 321, 523–536.
- Pala, H., Mota, M., Gama, F.M., 2007. Enzymatic depolymerisation of cellulose. *Carbohydr. Polym.* 68, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.07.015>
- Palmowski, L.M., Müller, J.A., 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 41, 155–162.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74, 17–24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000c. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74, 17–24.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000d. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33.
- Pambou Nziengui, C.F., Ikogou, S., Moutou Pitti, R., 2018. Impact of cyclic compressive loading and moisture content on the mechanical behavior of *Aucoumea Klaineana* Pierre. *Wood Mater. Sci. Eng.* 13, 190–196.
- Pan, X., Kadla, J.F., Ehara, K., Gilkes, N., Saddler, J.N., 2006. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5806–5813.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels* 3, 10.
- Park, S., Johnson, D.K., Ishizawa, C.I., Parilla, P.A., Davis, M.F., 2009. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Cellulose* 16, 641–647.
- Pielhop, T., Amgarten, J., Studer, M.H., von Rohr, P.R., 2017. Pilot-scale steam explosion pretreatment with 2-naphthol to overcome high softwood recalcitrance. *Biotechnol. Biofuels* 10, 130. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0816-y>

- Pielhop, T., Larrazabal, G.O., Studer, M.H., Brethauer, S., Seidel, C.-M., von Rohr, P.R., 2015. Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation. *Green Chem.* 17, 3521–3532. <https://doi.org/10.1039/c4gc02381a>
- Pinto, I., Pereira, H., Usenius, A., 2004. Heartwood and sapwood development within maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) stems. *Trees* 18, 284–294. <https://doi.org/10.1007/s00468-003-0305-8>
- Pu, Y., Cao, S., Ragauskas, A.J., 2011. Application of quantitative ³¹P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. *Energy Environ. Sci.* 4, 3154–3166.
- Ramos, L.P., Carpes, S.T., Silva, F.T., Ganter, J.L.M., 2000a. Comparison of the susceptibility of two hardwood species, *Mimosa scabrella* Benth and *Eucalyptus viminalis* Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43, 195–206. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000200009>
- Ramos, L.P., Carpes, S.T., Silva, F.T., Ganter, J.L.M., 2000b. Comparison of the susceptibility of two hardwood species, *Mimosa scabrella* Benth and *Eucalyptus viminalis* Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43, 195–206. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000200009>
- Richel, A., 2012. La lignine, une molécule d'intérêt issue du bioraffinage. *Chim. Nouv.* 111, 18–22.
- Robert, D., Bardet, M., Lapierre, C., Gellerstedt, G., 1988. Structural changes in aspen lignin during steam explosion treatment. *Cellul. Chem. Technol.*
- Rollin, J.A., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Zhang, Y.-H.P., 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 22–30.
- Rothman, H., Greenshields, R., Rosillo, C., 1983. The alcohol economy: Fuel ethanol and the Brazilian experience. Frances Pinter (Publishers).
- Rowell, R.M., 2012. Handbook of wood chemistry and wood composites. CRC press.
- Safou-Tchiama, R., 2005a. Caractérisation physico-chimique stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales (PhD Thesis). Bordeaux 1.
- Safou-Tchiama, R., 2005b. Caractérisation physico-chimique stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales (thesis). Bordeaux 1.
- Safou-Tchiama, R., 2005c. Caractérisation physico-chimique stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales. Bordeaux 1.
- Safou-Tchiama, R., 2005d. Caractérisation physico-chimique stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales (thesis). Bordeaux 1.
- Safou-Tchiama, R., Barhé, T.A., Soulounganga, P., Akagah, A.G., De Jeso, B., 2017. A comparative study of the syringyl, guaiacyl and hydroxyl groups units distribution in some African tropical hardwoods' lignin by Py-GC/MS and spectroscopic techniques. *J ME S* 8, 2530–2540.
- Safou-Tchiama, R., Obame, S.N., Brosse, N., Soulounganga, P., Barhé, T.A., 2016. Investigating the potential of *Aucoumea klaineana* Pierre sapwood and heartwood wastes to produce cellulosic ethanol. *Afr. J. Biotechnol.* 15, 2587–2595.
- Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A., 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy Environ. Sci.* 4, 1306–1310. <https://doi.org/10.1039/c0ee00378f>
- Sannigrahi, P., Pu, Y., Ragauskas, A., 2010. Cellulosic biorefineries—unleashing lignin opportunities. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 2, 383–393.
- Santos Abreu, H. dos, Freire, M.F., 1995. Methoxyl content determination of lignins by ¹H NMR.
- Sauvageon, T., 2012. Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol (PhD Thesis). Université de Lorraine.
- Savard, J., Nicolle, J., André, A.M., 1959. Analyse chimique des bois tropicaux. Tome 2. CTFT.
- Schultz, T., Blermann, C., McGinnis, G., 1983. Steam Explosion of Mixed Hardwood Chips as a Biomass Pretreatment. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 22, 344–348. <https://doi.org/10.1021/i300010a034>
- Sebe, G., Ham-Pichavant, F., Ibarboure, E., Koffi, A.L.C., Tingaut, P., 2012. Supramolecular Structure Characterization of Cellulose II Nanowhiskers Produced by Acid Hydrolysis of Cellulose I Substrates. *Biomacromolecules* 13, 570–578. <https://doi.org/10.1021/bm201777j>

- Segal, L., Creely, J.J., Martin Jr, A.E., Conrad, C.M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794.
- Simangunsong, E., Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Girods, P., Wistara, N.J., Brosse, N., 2020. Steam Explosion of Beech Wood: Effect of the Particle Size on the Xylans Recovery. *Waste Biomass Valorization* 11, 625–633. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0522-4>
- Singh, J., Suhag, M., Dhaka, A., 2015. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydr. Polym.* 117, 624–631.
- Sjostrom, E., 1993. *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Gulf professional publishing.
- Söderström, J., Galbe, M., Zacchi, G., 2005. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. *J. Wood Chem. Technol.* 25, 187–202.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenergy* 24, 475–486. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00148-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00148-4)
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- Tanahashi, M., 1990. Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood.
- Tanahashi, M., Takada, S., Aoki, T., Goto, T., Higuchi, T., Hanai, S., 1983a. <Original>Characterization of Explosion Wood: 1. Structure and Physical Properties. *Wood Res. Bull. Wood Res. Inst. Kyoto Univ.* 69, 36–51.
- Tanahashi, M., TAKADA, S., AOKI, T., GOTO, T., HIGUCHI, T., HANAI, S., 1983b. <Original>Characterization of Explosion Wood: 1. Structure and Physical Properties.
- Tchiama, R.S., Arsene, B.B.A., Anris, P.S.E., Akagah, A.G., De Jeso, B., 2019. Characterization of some African tropical heartwood lignins by 1D C-13 and H-1-NMR: molecular structure and hydroxyl groups' distribution. *J. Indian Acad. Wood Sci.* 16, 73–86. <https://doi.org/10.1007/s13196-019-00239-8>
- Tchiama, R.S., Soulounganga, P., Anris, P.S.E., Athomo, A.B.B., Barhe, T.A., De Jeso, B., Charrier, B., Akagah, A.G., 2018. Understanding the natural durability of some African tropical heartwoods toward *Pycnoporus sanguineus* and *Antrodia* sp.: lignin structure and cellulose morphology control. *J. Indian Acad. Wood Sci.* 15, 162–171. <https://doi.org/10.1007/s13196-018-0222-5>
- Vallander, L., Eriksson, K.-E.L., 1990. Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, in: *Bioprocesses and Applied Enzymology, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 63–95.
- van Zyl, W.H., Chimphango, A.F.A., den Haan, R., Goergens, J.F., Chirwa, P.W.C., 2011. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. *Interface Focus* 1, 196–211. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2010.0017>
- Vignon, M.R., Dupeyre, D., GarciaJaldon, C., 1996. Morphological characterization of steam-exploded hemp fibers and their utilization in polypropylene-based composites. *Bioresour. Technol.* 58, 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00100-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00100-9)
- Wallis, A., Wearne, R., 1992. Chemical Cellulose from Eucalyptus-Regnans Wood by Autohydrolysis-Explosion-Extraction. *Carbohydr. Polym.* 17, 103–110. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90102-V](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90102-V)
- Wang, K., Jiang, J.X., Xu, F., Sun, R.C., 2009a. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1379–1388. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.05.019>
- Wang, Kun, Jiang, J.-X., Xu, F., Sun, R.-C., 2009a. Influence of steaming explosion time on the physico-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*). *Bioresour. Technol.* 100, 5288–5294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.019>
- Wang, K., Jiang, J.X., Xu, F., Sun, R.C., 2009b. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded

- cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1379–1388.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.05.019>
- Wang, Kun, Jiang, J.-X., Xu, F., Sun, R.-C., 2009b. Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*Lespedeza cryptobotrya*). *Bioresour. Technol.* 100, 5288–5294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.019>
- Wang, X., Guo, Y., Zhou, J., Sun, G., 2017. Structural changes of poplar wood lignin after supercritical pretreatment using carbon dioxide and ethanol-water as co-solvents. *Rsc Adv.* 7, 8314–8322. <https://doi.org/10.1039/c6ra26122a>
- Wayman, M., Lora, J., 1980. Simulated Autohydrolysis of Aspen Milled Wood Lignin in the Presence of Aromatic Additives - Structural Modifications. *J. Appl. Polym. Sci.* 25, 2187–2194. <https://doi.org/10.1002/app.1980.070251005>
- Wertz, J.-L., 2012. Prétraitements de la biomasse lignocellulosique. 9ième rencontre de la biomasse Rapport de synthèse, Document ValBiom
- Wertz, J.-L., Bédoué, O., 2013. *Lignocellulosic Biorefineries*. CRC Press.
- Willför, S., Sundberg, A., Pranovich, A., Holmbom, B., 2005. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Sci. Technol.* 39, 601–617.
- Wyman, C., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. CRC Press.
- Wyman, C.E., 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *TRENDS Biotechnol.* 25, 153–157.
- Wyman, C.E., Goodman, B.J., 1993. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39, 41. <https://doi.org/10.1007/BF02918976>
- Yaman, S., 2004. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. *Energy Convers. Manag.* 45, 651–671.
- Yang, S., Zhang, Y., Yue, W., Wang, W., Wang, Y.-Y., Yuan, T.-Q., Sun, R.-C., 2016. Valorization of lignin and cellulose in acid-steam-exploded corn stover by a moderate alkaline ethanol post-treatment based on an integrated biorefinery concept. *Biotechnol. Biofuels* 9, 238. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0656-1>
- Zhang, W., Yi, Z., Huang, J., Li, F., Hao, B., Li, M., Hong, S., Lv, Y., Sun, W., Ragauskas, A., 2013. Three lignocellulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus*. *Bioresour. Technol.* 130, 30–37.

Annexe

Annexe1

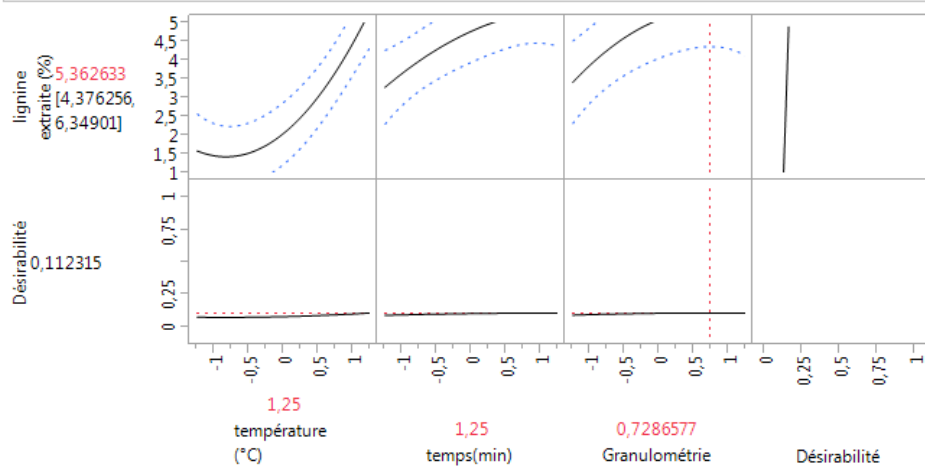
Données statistiques

Influence de la granulométrie

Cas de la lignine extraite

Tests des effets					
Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
température (°C)	1	1	9,6040000	79,1718	<,0001*
temps(min)	1	1	1,1560000	9,5296	0,0176*
Granulométrie	1	1	0,2560000	2,1104	0,1896
température (°C)*temps(min)	1	1	0,6050000	4,9874	0,0607
température (°C)*Granulométrie	1	1	0,5000000	4,1218	0,0819
temps(min)*Granulométrie	1	1	0,3200000	2,6380	0,1484
température (°C)*température (°C)	1	1	2,1906139	18,0586	0,0038*
temps(min)*temps(min)	1	1	0,2343875	1,9322	0,2071
Granulométrie*Granulométrie	1	1	0,6585384	5,4287	0,0526

Profil de prévision

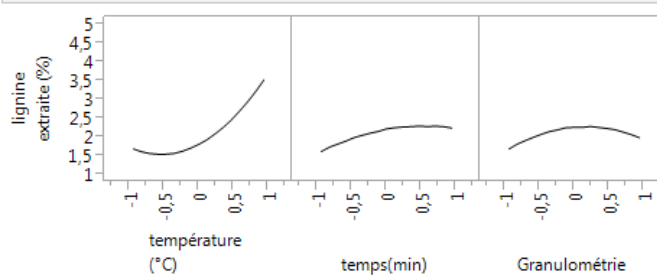


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
température (°C)	0,808	0,816		
temps(min)	0,104	0,113		
Granulométrie	0,063	0,07		

Graphiques du modèle marginal

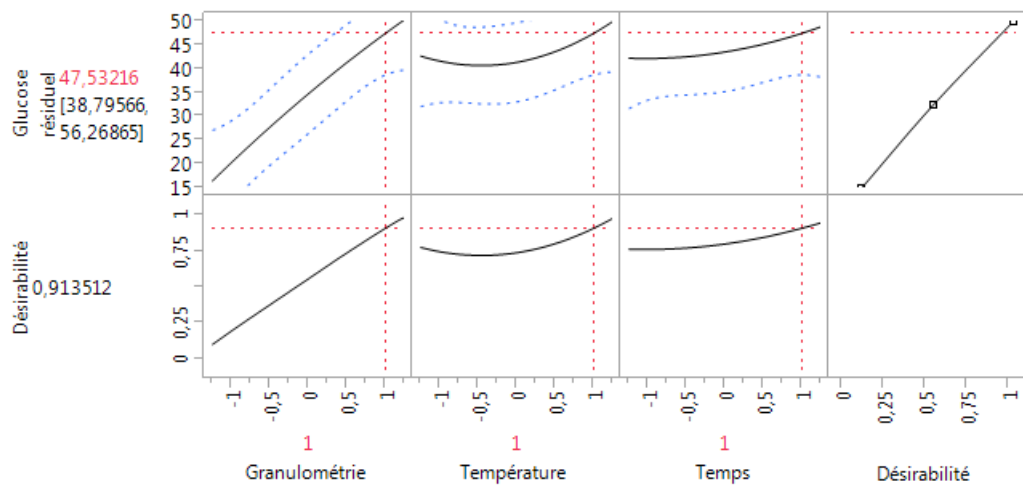


Cas de la cellulose résiduelle

Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	13,68900	0,8544	0,3910
Temps	1	1	24,64900	1,5385	0,2611
Diametre	1	1	746,49600	46,5943	0,0005*
Température*Temps	1	1	8,61125	0,5375	0,4911
Température*Diametre	1	1	62,16125	3,8799	0,0964
Temps*Diametre	1	1	35,70125	2,2284	0,1861
Température*Température	1	1	26,56176	1,6579	0,2453
Temps*Temps	1	1	4,27995	0,2671	0,6237
Diametre*Diametre	1	1	2,02245	0,1262	0,7345

Profilleur de prévision

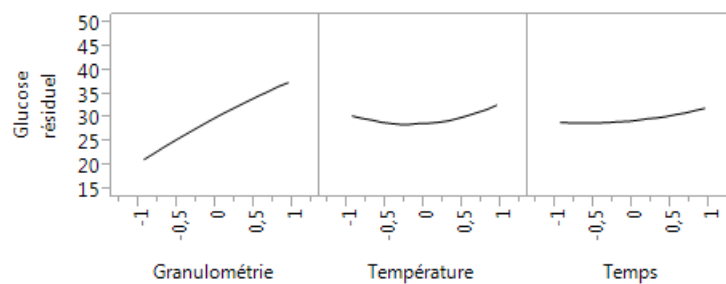


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet		,2	,4	,6	,8
	principal	Effet total				
Granulométrie	0,868	0,895				
Température	0,061	0,077				
Temps	0,059	0,059				

Graphiques du modèle marginal

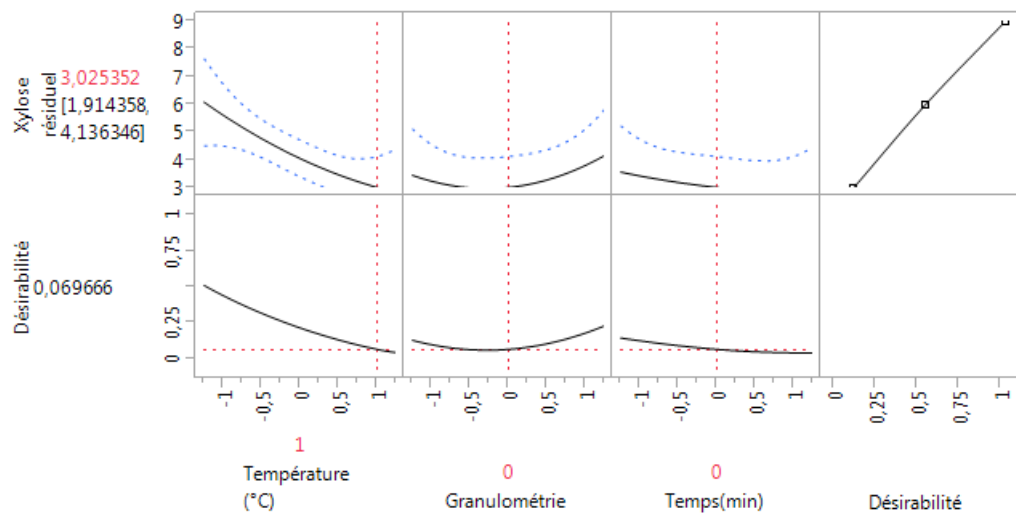


Cas des hémicelluloses résiduelles

Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température (°C)	1	1	16,900000	39,4648	0,0004*
Temps(min)	1	1	0,169000	0,3946	0,5498
Granulométrie	1	1	6,561000	15,3212	0,0058*
Température (°C)*Temps(min)	1	1	0,245000	0,5721	0,4741
Température (°C)*Granulométrie	1	1	2,205000	5,1491	0,0575
Temps(min)*Granulométrie	1	1	0,500000	1,1676	0,3157
Température (°C)*Température (°C)	1	1	0,179942	0,4202	0,5375
Temps(min)*Temps(min)	1	1	0,031923	0,0745	0,7927
Granulométrie*Granulométrie	1	1	0,694564	1,6219	0,2435

Profileur de prévision

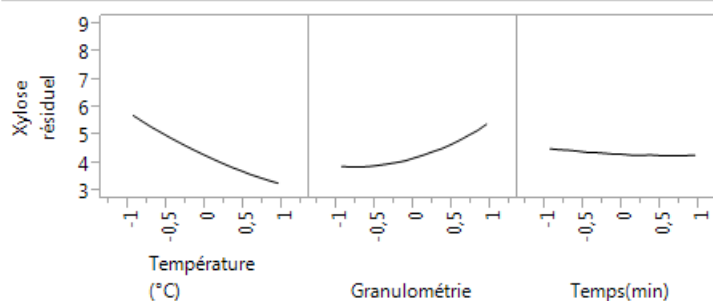


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
Température (°C)	0,677	0,694		
Granulométrie	0,295	0,316		
Temps(min)	0,027	0,027		

Graphiques du modèle marginal



Cas de la lignine résiduelle.

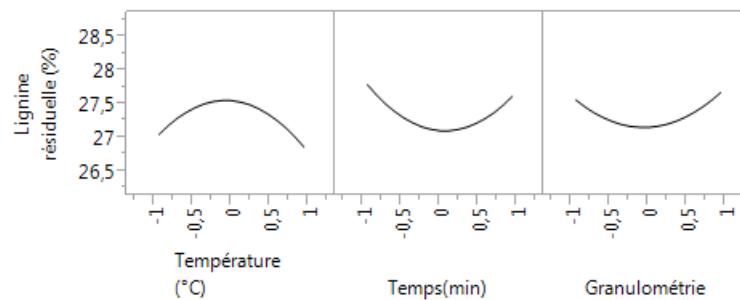
Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température (°C)	1	1	0,1000000	0,3241	0,5870
Temps(min)	1	1	0,0810000	0,2625	0,6242
Granulométrie	1	1	0,0360000	0,1167	0,7427
Température (°C)*Temps(min)	1	1	0,1012500	0,3281	0,5847
Température (°C)*Granulométrie	1	1	0,5512500	1,7866	0,2232
Temps(min)*Granulométrie	1	1	0,3612500	1,1708	0,3151
Température (°C)*Température (°C)	1	1	1,2245549	3,9687	0,0866
Temps(min)*Temps(min)	1	1	1,2169134	3,9439	0,0874
Granulométrie*Granulométrie	1	1	0,7354983	2,3837	0,1665

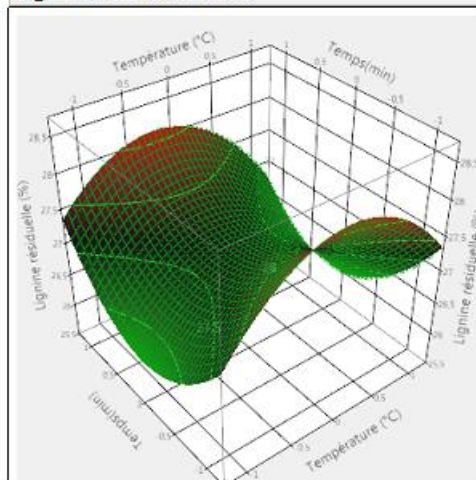
Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4 ,6 ,8
Température (°C)	0,373	0,373		
Temps(min)	0,361	0,361		
Granulométrie	0,266	0,266		

Graphiques du modèle marginal



Lignine résiduelle (%)

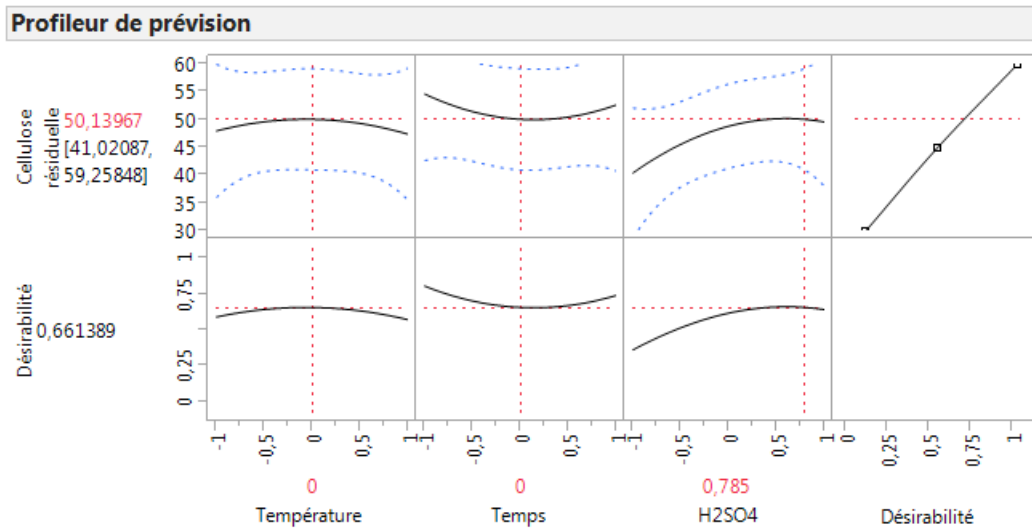


Influence du type d'imprégnation

Cas de la cellulose résiduelle

Tests des effets					
Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	1,68100	0,0392	0,8497
Temps	1	1	2,40100	0,0559	0,8209
H2SO4	1	1	209,76400	4,8869	0,0691
Température*Temps	1	1	60,50000	1,4095	0,2800
Température*H2SO4	1	1	6,84500	0,1595	0,7035
Temps*H2SO4	1	1	27,38000	0,6379	0,4549
Température*Température	1	1	15,22912	0,3548	0,5732
Temps*Temps	1	1	34,10185	0,7945	0,4071
H2SO4*H2SO4	1	1	39,14753	0,9120	0,3765

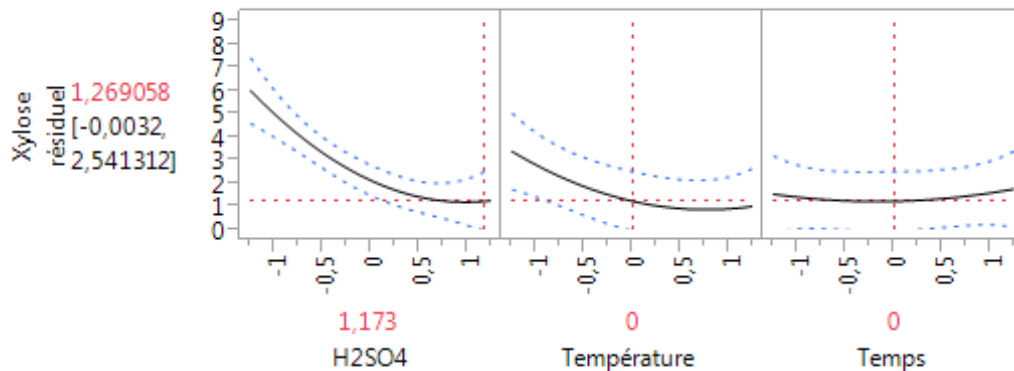
Rapport résumé						
Colonne	Effet					
	principal	Effet total	,2	,4		,6
H2SO4	0,666	0,666				
Temps	0,187	0,187				
Température	0,147	0,147				



Cas des hémicelluloses résiduelles :

Tests des effets					
Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	22,500000	70,1286	0,0002*
Temps	1	1	0,225000	0,7013	0,4344
H2SO4	1	1	35,721000	111,3362	<,0001*
Température*Temps	1	1	0,605000	1,8857	0,2188
Température*H2SO4	1	1	1,805000	5,6259	0,0554
Temps*H2SO4	1	1	0,020000	0,0623	0,8112
Température*Température	1	1	1,004420	3,1306	0,1272
Temps*Temps	1	1	0,188284	0,5868	0,4727
H2SO4*H2SO4	1	1	2,466466	7,6875	0,0323*

Profilur de prévision

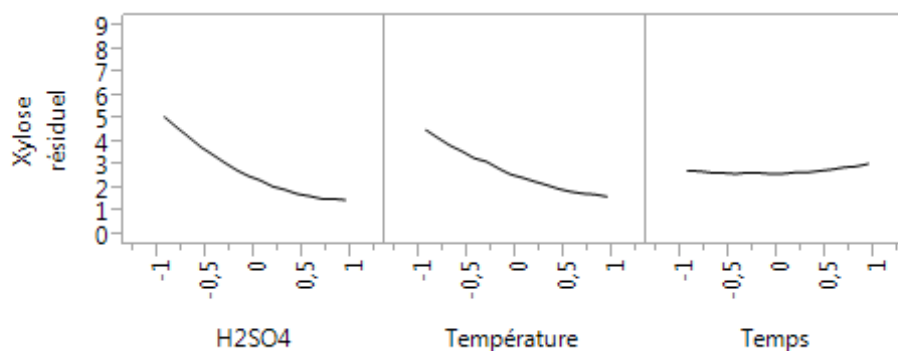


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
H2SO4	0,605	0,61		
Température	0,376	0,385		
Temps	0,006	0,006		

Graphiques du modèle marginal

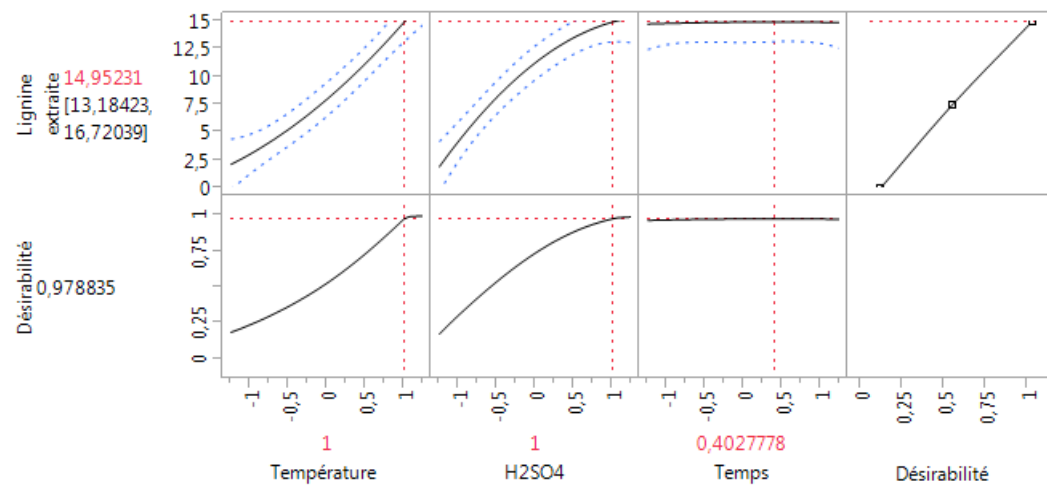


Cas de la lignine extraite

Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	134,68900	175,9411	<,0001*
Temps	1	1	0,40000	0,5225	0,4970
H2SO4	1	1	104,32900	136,2826	<,0001*
Température*Temps	1	1	0,08000	0,1045	0,7575
Température*H2SO4	1	1	39,60500	51,7351	0,0004*
Temps*H2SO4	1	1	0,50000	0,6531	0,4498
Température*Température	1	1	2,57311	3,3612	0,1164
Temps*Temps	1	1	0,01016	0,0133	0,9121
H2SO4*H2SO4	1	1	7,72766	10,0945	0,0191*

Profileur de prévision

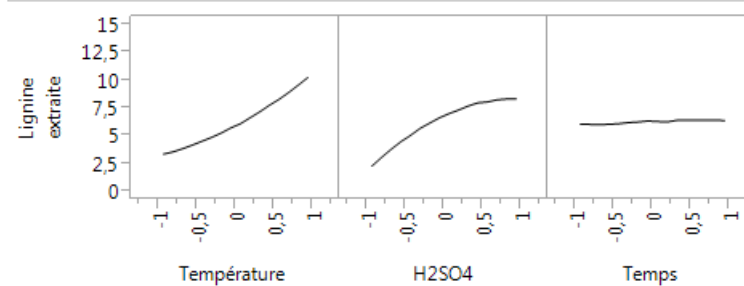


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

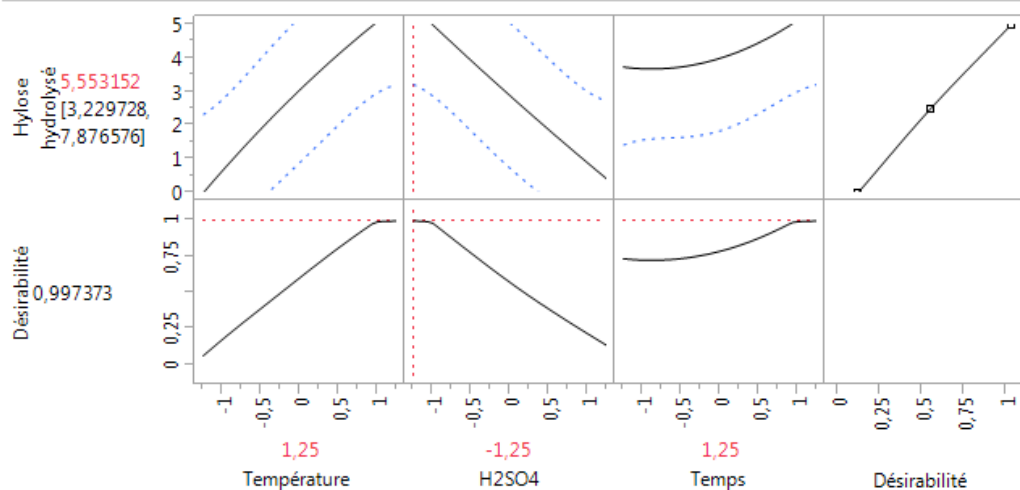
Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
Température	0,529	0,572		
H2SO4	0,438	0,478		
Temps	0,006	0,006		

Graphiques du modèle marginal



Cas du xylose solubilisé

Profilur de prévision

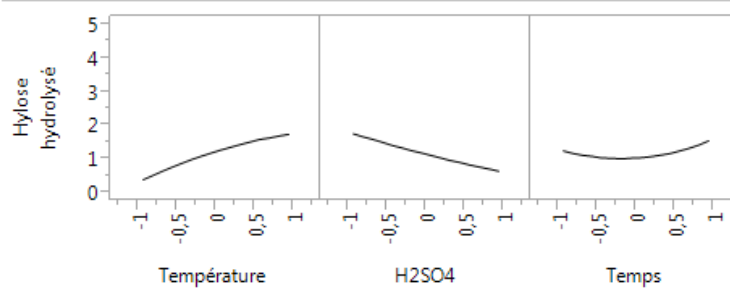


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
Température	0,411	0,655		
H2SO4	0,277	0,522		
Temps	0,054	0,075		

Graphiques du modèle marginal

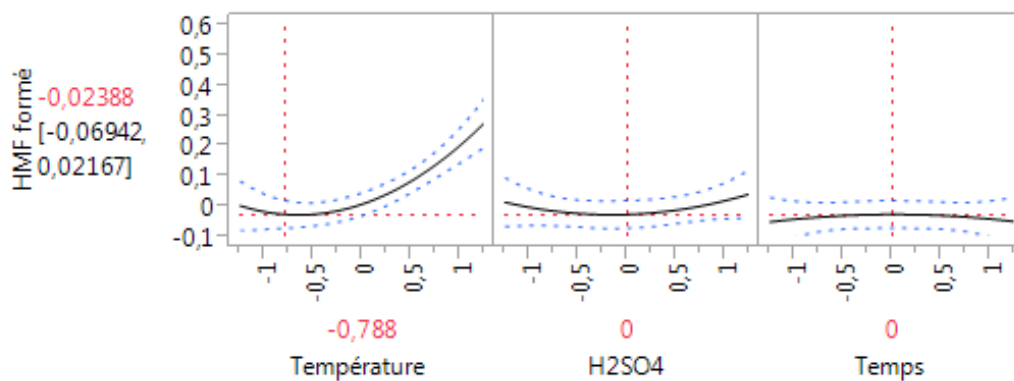


Cas du HMF formé

Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	0,12100000	113,6518	<,0001*
Temps	1	1	0,00900000	8,4534	0,0271*
H2SO4	1	1	0,06400000	60,1134	0,0002*
Température*Temps	1	1	0,01125000	10,5668	0,0175*
Température*H2SO4	1	1	0,06125000	57,5304	0,0003*
Temps*H2SO4	1	1	0,00125000	1,1741	0,3202
Température*Température	1	1	0,01881661	17,6739	0,0057*
Temps*Temps	1	1	0,00063480	0,5962	0,4693
H2SO4*H2SO4	1	1	0,00313480	2,9444	0,1370

Profileur de prévision

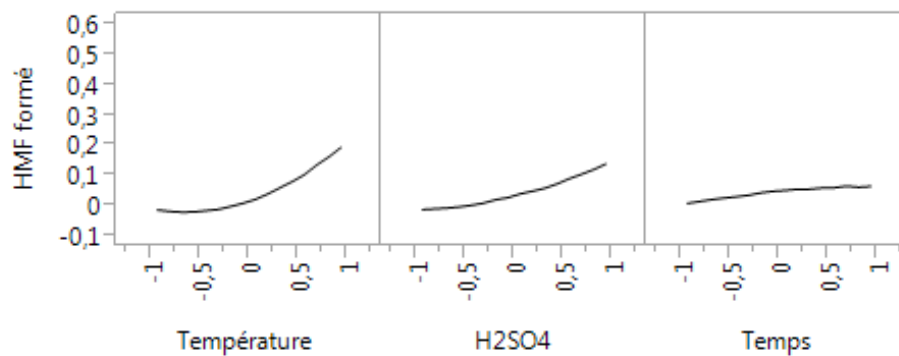


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet		,2	,4	,6	,8
	principal	Effet total				
Température	0,571	0,695				
H2SO4	0,266	0,373				
Temps	0,04	0,063				

Graphiques du modèle marginal

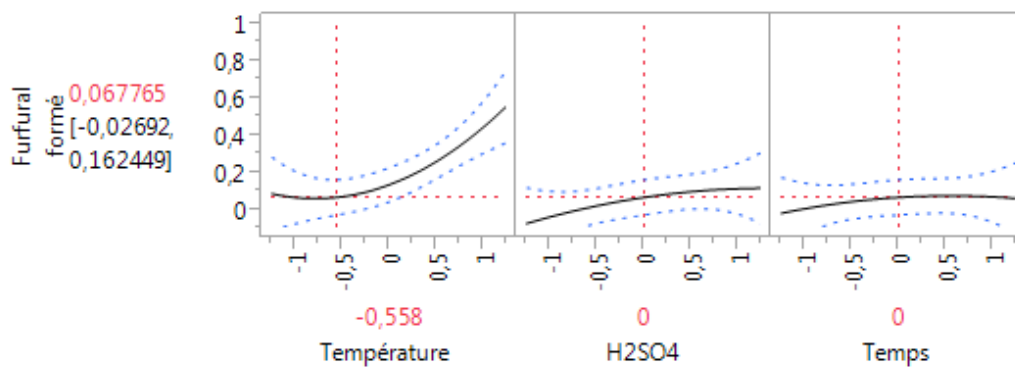


Cas du furfural formé

Tests des effets

Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	0,36100000	57,4694	0,0003*
Temps	1	1	0,03600000	5,7310	0,0537
H2SO4	1	1	0,25600000	40,7539	0,0007*
Température*Temps	1	1	0,02000000	3,1839	0,1246
Température*H2SO4	1	1	0,18000000	28,6551	0,0017*
Temps*H2SO4	1	1	0,02000000	3,1839	0,1246
Température*Température	1	1	0,03840125	6,1133	0,0483*
Temps*Temps	1	1	0,00226489	0,3606	0,5702
H2SO4*H2SO4	1	1	0,00226489	0,3606	0,5702

Profil de prévision

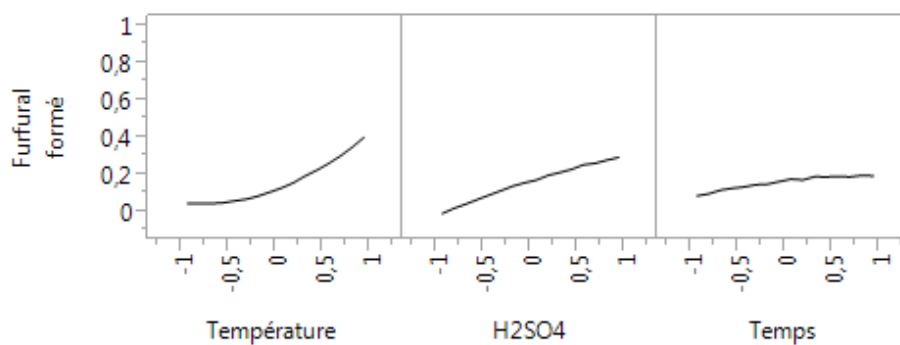


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4
Température	0,508	0,608		
H2SO4	0,333	0,43		
Temps	0,052	0,072		

Graphiques du modèle marginal



Cas de la lignine résiduelle

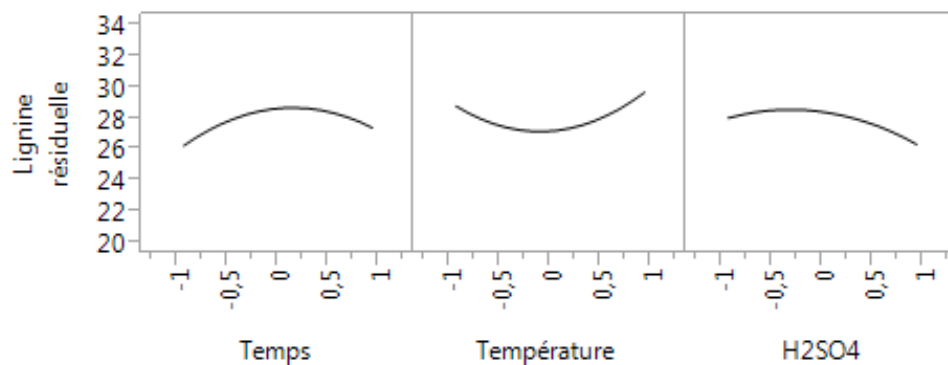
Tests des effets					
Source	Nombre de coefficients	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
Température	1	1	2,209000	0,3137	0,5957
Temps	1	1	3,721000	0,5284	0,4946
H2SO4	1	1	8,100000	1,1503	0,3247
Température*Temps	1	1	21,780000	3,0931	0,1291
Température*H2SO4	1	1	2,880000	0,4090	0,5461
Temps*H2SO4	1	1	10,580000	1,5025	0,2662
Température*Température	1	1	14,367680	2,0404	0,2031
Temps*Temps	1	1	11,247680	1,5973	0,2532
H2SO4*H2SO4	1	1	5,282453	0,7502	0,4197

Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

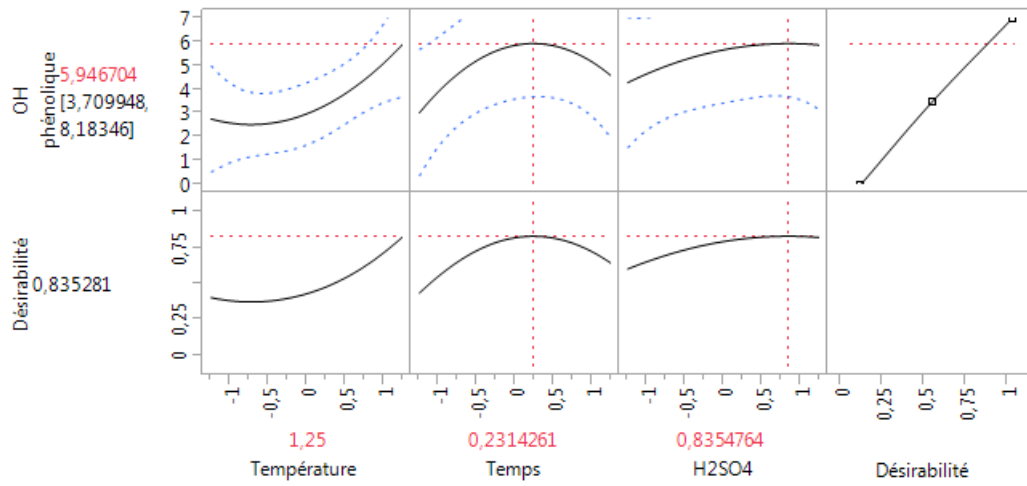
Colonne	Effet			
	principal	Effet total	,2	,4 ,6 ,8
Temps	0,329	0,366		
Température	0,361	0,361		
H2SO4	0,311	0,311		

Graphiques du modèle marginal



Cas de la teneur en OH phénolique

Profilleur de prévision

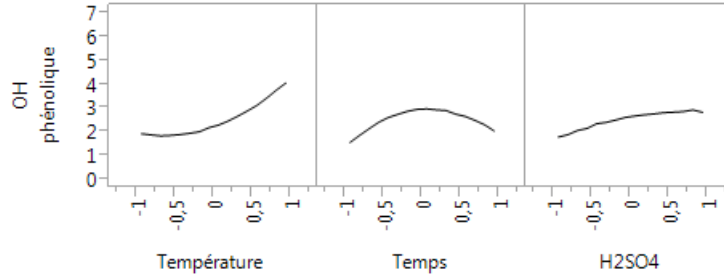


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

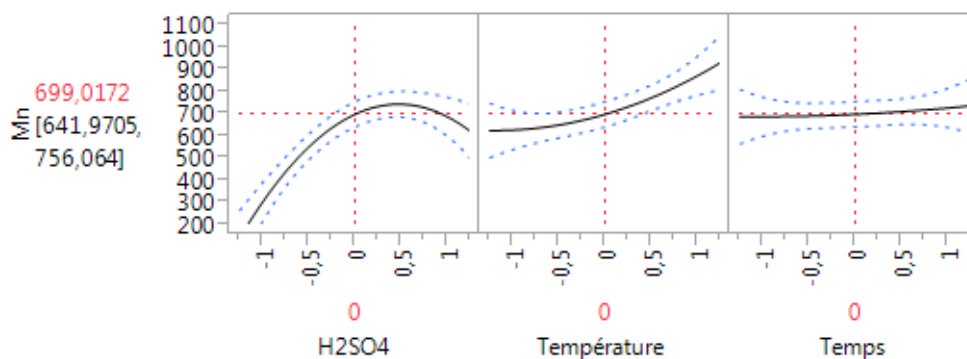
Colonne	Effet		,2	,4	,6	,8
	principal	Effet total				
Température	0,637	0,64				
Temps	0,219	0,222				
H2SO4	0,145	0,145				

Graphiques du modèle marginal



Cas de la masse moléculaire en nombre de la lignine

Profilleur de prévision

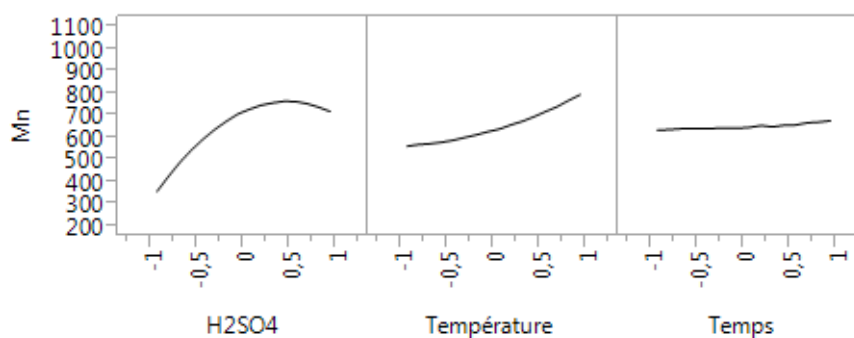


Importance des variables : entrées indépendantes uniformes

Rapport résumé

Colonne	Effet				
	principal	Effet total	,2	,4	,6 ,8
H2SO4	0,731	0,731			
Température	0,252	0,252			
Temps	0,017	0,017			

Graphiques du modèle marginal



Test de Student

- Test T de Student de la différence de rendement en cellulose entre aubier et cœur
t = -7,7304, df = 1.4706, p-value = 0,0363
- Test T de Student de la différence de rendement en Mannose entre aubier et cœur
t = -4,2426, df = 2, p-value = 0,05132
- Test T de Student de la différence de rendement en lignine entre aubier et cœur
t = 9,4206, df = 3,7314, p-value = 0,0009816

Annexe 2

Données chimiques

Rendements des produits de dégradation formés lors du prétraitement EV : les valeurs sont exprimées en pourcentage de masse de matière sèche de départ

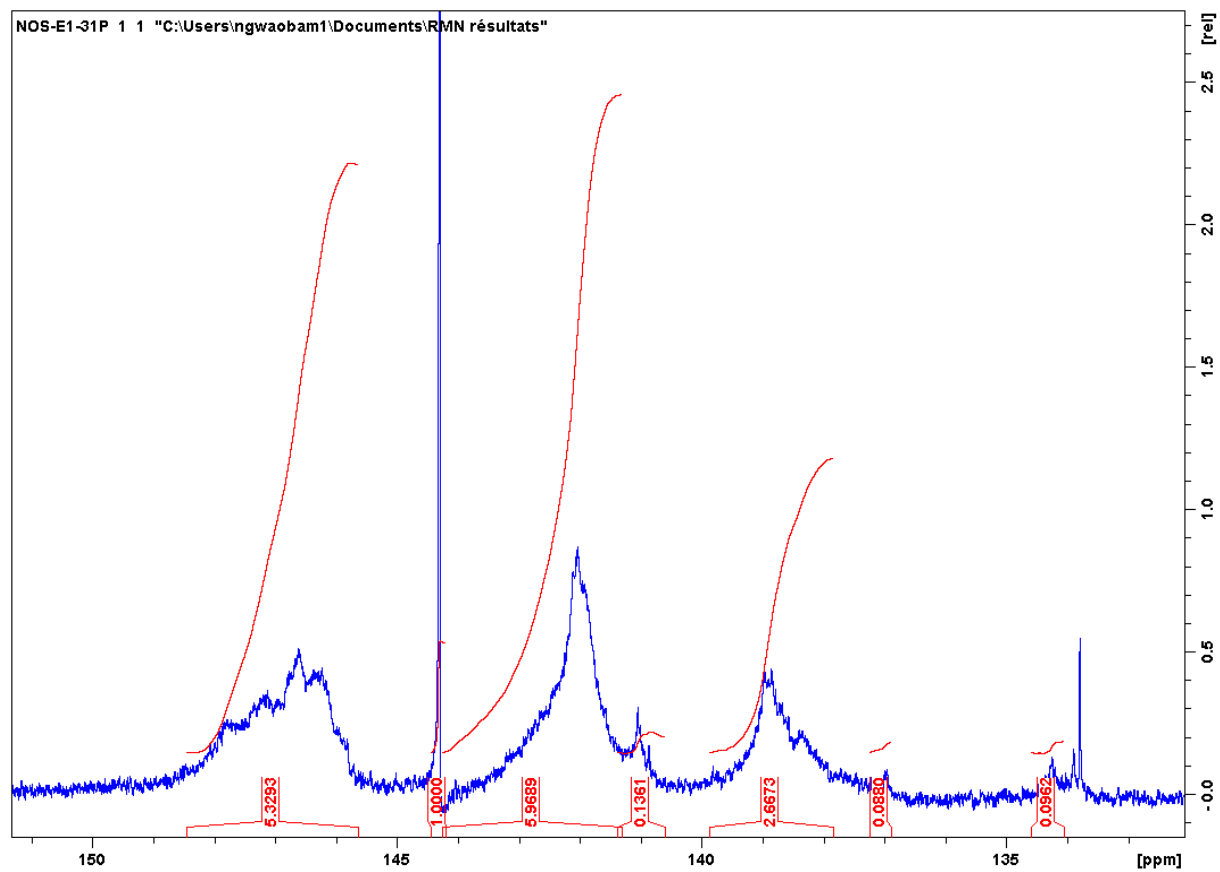
Echantillons	t (min)	T°C	H ₂ SO ₄ ^a (%)	S ₀	Acide formique (%)	Acide acétique (%)	Acide lévulinique (%)	HMF (%)	Furfural (%)
E5	170	5	0,25	2,8	0.6	0.4	0.4	0.0	0.0
E10	190	2,5	0,25	3,1	4.1	0.7	0.0	0.0	0.1
E12	190	5	0,25	3,4	8.4	1.2	0.0	0.0	0.2
E6	190	5	0,25	3,4	4.9	0.7	0.0	0.0	0.1
E7	190	7,5	0,25	3,5	6.3	0.9	0.0	0.0	0.1
E14	210	5	0,25	3,9	7.5	1.5	0.1	0.2	0.5
E9	2,5	170	0,5	2,5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0
E4	7,5	170	0,5	2,9	3.0	1.2	0.2	0.0	0.1
E1	5,0	190	0,5	3,4	6.0	1.2	0.0	0.1	0.2
E8	2,5	210	0,5	3,6	5.6	1.5	0.2	0.4	0.5
E15	7,5	210	0,5	4,1	11.3	2.2	0.3	0.5	0.9

Caractéristiques structurales de la LEV calculées à partir des données RMN ³¹P. Les valeurs sont exprimées en mmoles/g de lignine.

N° échantillons	Sévérité combiné	mo-lignine	n (stand inte)	OH aliphatique	S-OH	G-OH	OH-S	OH acide	OH Aromatique	Total OH phénolique	S/G	OH aliphatique/phénolique
E13	2,46	0,025	5,9994E-06	2,08	0,09	0,10	0,00	0,00	0,19	2,27	0,95	11,01
E3	2,94	0,025	5,9994E-06	2,91	0,38	0,49	0,03	0,00	0,90	3,81	0,77	3,24
E2	3,35	0,025	5,9994E-06	4,11	0,93	1,06	0,03	0,07	2,02	6,19	0,88	2,04
E11	3,64	0,025	5,9994E-06	3,42	1,01	0,78	0,02	0,00	1,81	5,23	1,29	1,89
E16	4,11	0,025	5,9994E-06	3,61	1,51	1,01	0,02	0,14	2,53	6,28	1,50	1,43
E9	2,46	0,025	5,9994E-06	3,17	1,34	0,74	0,06	0,00	2,14	5,32	1,80	1,48
E5	2,76	0,025	5,9994E-06	2,62	0,83	0,46	0,02	0,00	1,32	3,94	1,80	1,98
E4	2,94	0,025	5,9994E-06	1,72	0,86	0,42	0,03	0,00	1,30	3,01	2,06	1,32
E10	3,05	0,025	5,9994E-06	2,29	0,98	0,38	0,02	0,00	1,38	3,67	2,57	1,66
E6	3,35	0,025	5,9994E-06	2,41	1,75	0,75	0,03	0,00	2,53	4,94	2,32	0,95
E12	3,35	0,025	5,9994E-06	3,37	2,26	0,95	0,04	0,00	3,24	6,61	2,38	1,04
E1	3,35	0,025	5,9994E-06	1,88	1,98	0,83	0,01	0,15	2,81	4,84	2,40	0,67
E7	3,52	0,025	5,9994E-06	2,04	1,00	0,46	0,01	0,00	1,48	3,52	2,16	1,38
E8	3,64	0,025	5,9994E-06	1,12	1,86	0,67	0,02	0,00	2,56	3,67	2,76	0,44
E14	3,94	0,025	5,9994E-06	2,64	4,26	1,72	0,01	0,00	5,99	8,63	2,48	0,44
E15	4,11	0,025	5,9994E-06	1,75	3,27	1,13	0,01	0,00	4,41	6,16	2,88	0,40
	3,64	0,0250	5,9994E-06	3,00	1,09	1,04	0,19	0,08	2,31	5,40	1,05	1,30
E2	3,35	0,025	5,9994E-06	3,23	0,95	1,19	0,26	0,05	2,40	5,68	0,80	1,35
MWL		0,0252	5,9994E-06	3,04	0,15	1,96	0,00	0,08	2,11	5,24	0,08	1,44

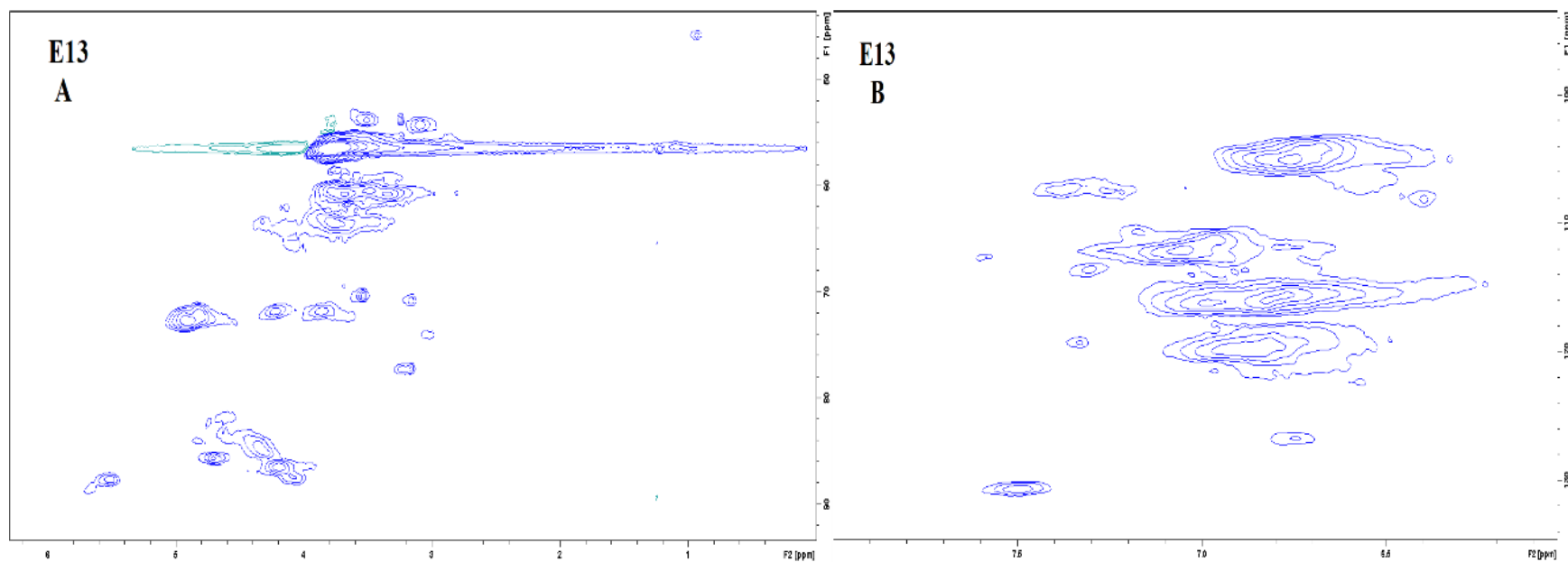
Annexe 3

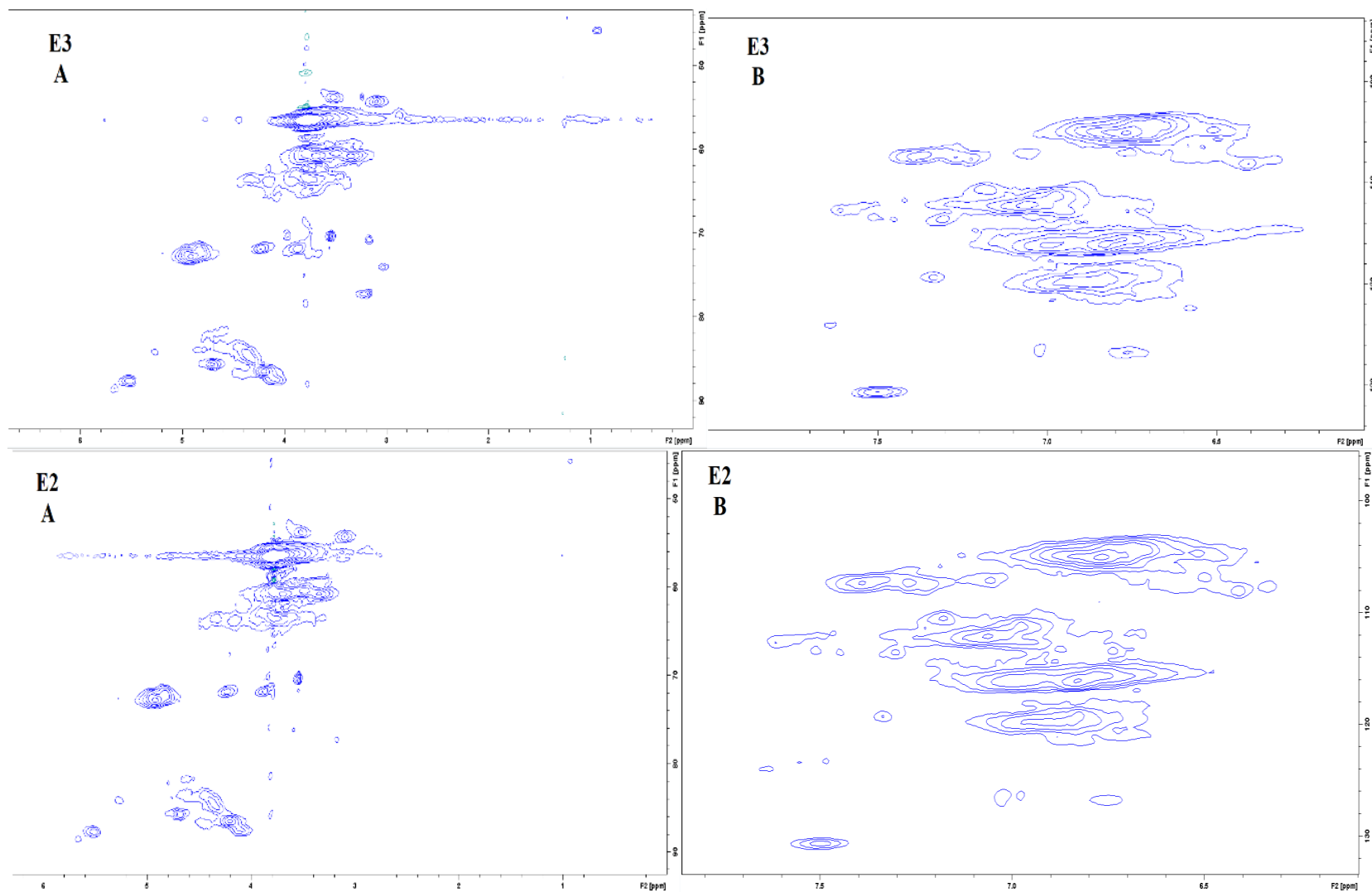
Spectre ^{31}P de la LEV

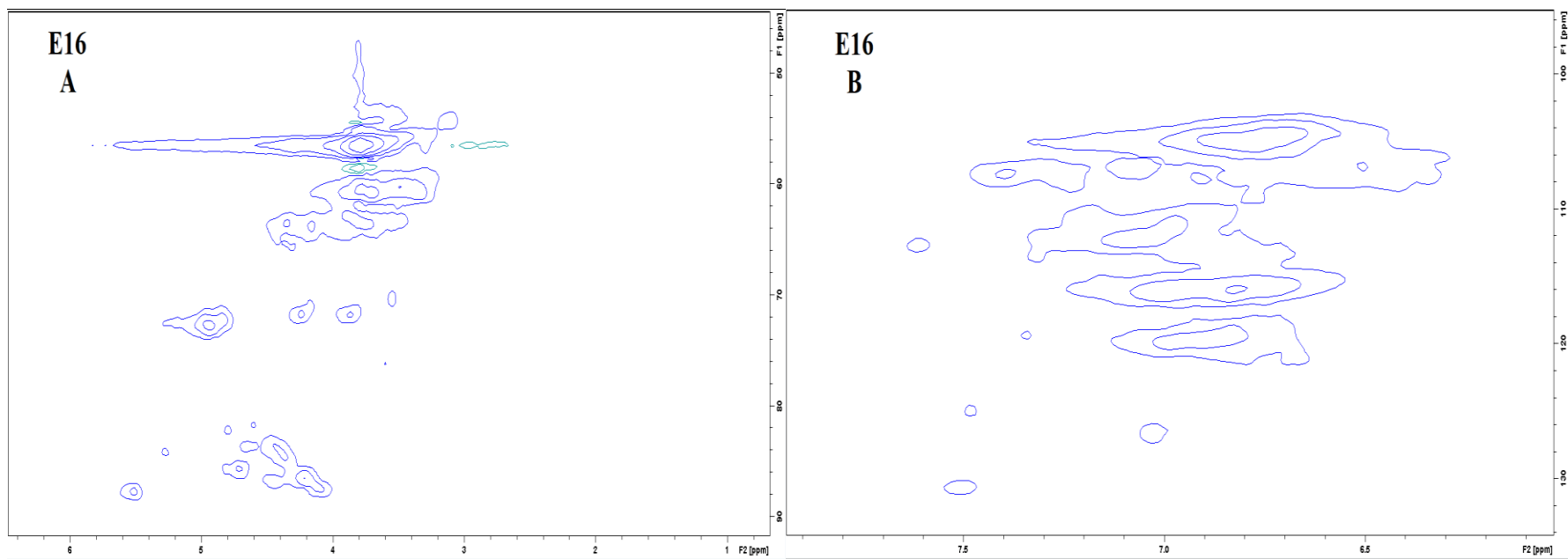


Spectres RMN HSQC des lignines non acétylées du bois exposé de l'Okoumé

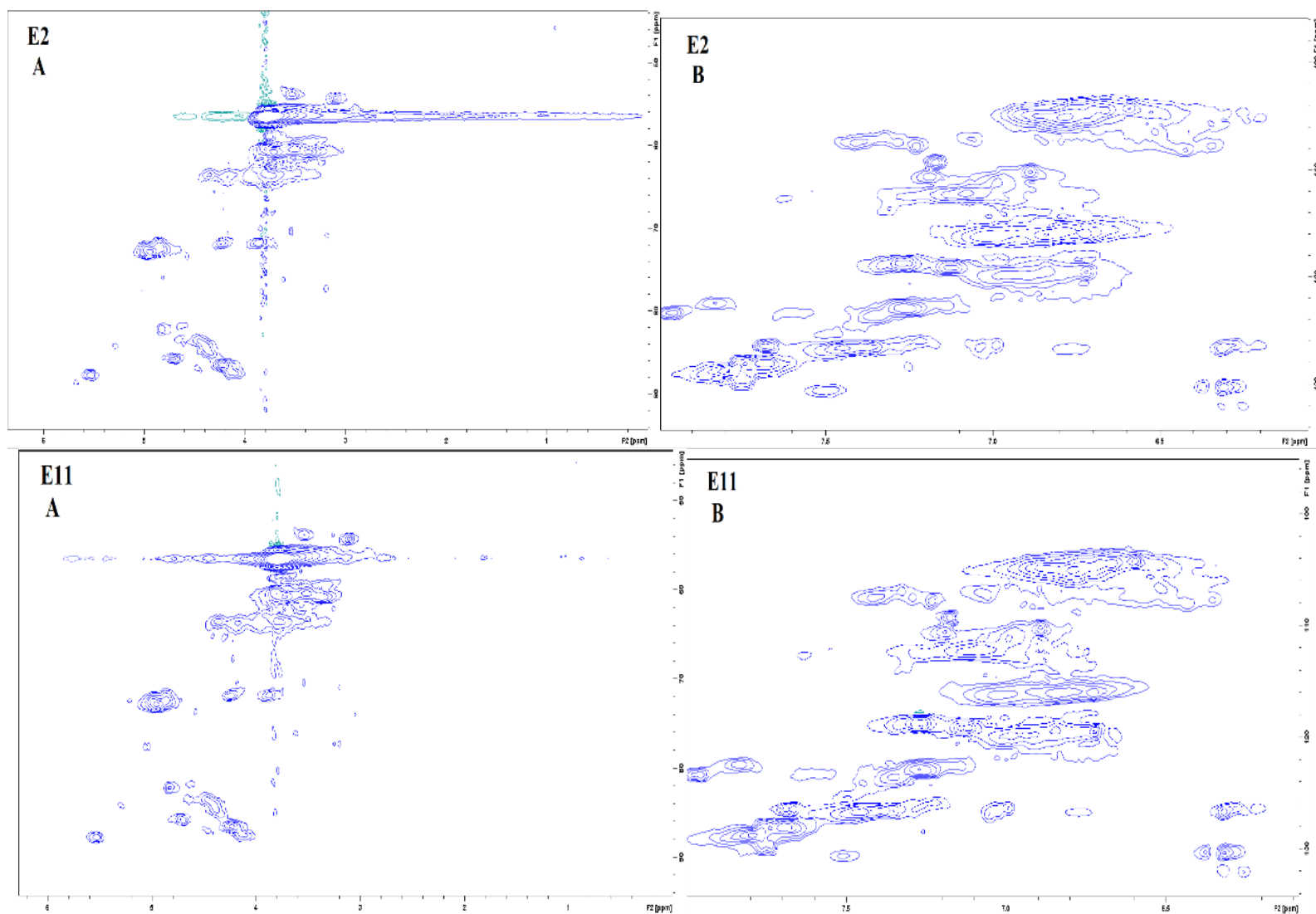
Cas du traitement à l'eau







Cas du traitement au naphthol



Cas du traitement acide à 0,5% H₂SO₄

